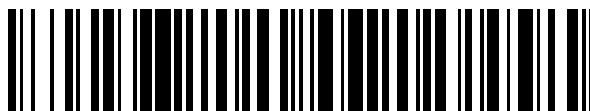


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 812**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2008 E 11166466 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 2385119**

54 Título: **Ensayo de detección de la carga viral con el virus sincitial respiratorio (RSV)**

30 Prioridad:

06.04.2007 EP 07105823

15.05.2007 EP 07108211

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

16.02.2016

73 Titular/es:

JANSSEN DIAGNOSTICS BVBA (50.0%)

Turnhoutseweg 30

2340 Beerse, BE y

SPEEDX PTY LTD (50.0%)

72 Inventor/es:

NAUWELAERS, DAVID;

STUYVER, LIEVEN JOZEF;

TODD, ALISON VELYIAN;

MOKANY, ELISA y

YOUNG, PAUL EAN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 559 812 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

Ensayo de detección de la carga viral con el virus sincitial respiratorio (RSV)

El virus sincitial respiratorio (RSV = acrónimo de respiratory syncytial virus) humano es un virus de ARN de una sola hebra de sentido negativo, que pertenece a la familia de los Paramyxoviridae, y que incluye unos virus respiratorios corrientes tales como los que causan el sarampión y las paperas. El RSV es un miembro de los paramyxovirus de la subfamilia de los Pneumoviridae. El virión es variable en cuanto a la forma y al tamaño (con un diámetro medio comprendido entre 120 y 300 nm), es inestable en el entorno (sobreviviendo solamente durante unas pocas horas sobre las superficies del medio ambiente), y es desactivado con jabón y agua y con agentes desinfectantes.

Características clínicas: El virus sincitial respiratorio (RSV) es la causa más corriente de bronquiolitis y neumonía entre niños y niños con una edad situada por debajo de 1 año. La enfermedad comienza lo más frecuentemente con fiebre, goteo nasal, tos y algunas veces resuello. Durante su primera infección causada por los RSV, entre el 25 % y el 40 % de los niños y niños pequeños tienen signos o síntomas de bronquiolitis o neumonía, y del 0,5 % al 2 % requieren una hospitalización. La mayor parte de los niños se recuperan de la enfermedad en 8 a 15 días. La mayoría de los niños que son hospitalizados para curar una infección causada por los RSV tienen una edad situada por debajo de los 6 meses. Los RSV causan repetidas infecciones a lo largo de la vida, usualmente asociadas con unos síntomas desde moderados hasta graves del tipo de un catarro; sin embargo, una grave enfermedad del tracto respiratorio inferior puede aparecer en cualquier edad, especialmente entre la edad madura o entre los que tienen unos sistemas cardíacos, pulmonares o inmunitarios comprometidos.

Características epidemiológicas: Un RSV se propaga a partir de las secreciones respiratorias por medio de un estrecho contacto con las personas infectadas o de un contacto con superficies u objetos que se han contaminado. Una Infección puede aparecer cuando un material infeccioso entra en contacto con las membranas mucosas de los ojos, de la boca o de la nariz, y posiblemente por medio de la inhalación de las gotitas generadas por un estornudo o una tos. En unos climas templados, una infección causada por los RSV aparece usualmente durante brotes anuales en colectividades, durando con frecuencia de 4 a 6 meses, durante los meses de final de otoño, invierno o principio de primavera. La regulación en el tiempo y la gravedad de los brotes en una colectividad pueden variar de año an año. Un RSV se propaga eficientemente entre niños durante los brotes anuales, y la mayor parte de los niños tendrán una evidencia serológica de una infección causada por los RSV a la edad de 2 años.

Diagnóstico: El diagnóstico de una infección causada por los RSV se puede hacer por aislamiento de los virus, detección de los antígenos virales, detección de ARN virales, demostración de un aumento en la cantidad de anticuerpos séricos, o una combinación de estos enfoques. Los laboratorios clínicos usan o bien unos ensayos de detección de antígenos para diagnosticar una infección o unas técnicas de amplificación de ácidos nucleicos para detectar ácidos nucleicos virales.

Con el fin de demostrar una actividad antiviral de los compuestos farmacéuticos que se encuentran en el mercado o en fase de desarrollo, se necesita un sensible ensayo o análisis de la carga viral con el fin de medir cualquier caída en la carga viral de RSV al efectuar el tratamiento con el o los compuesto(s).

La carga viral es una medida de la gravedad de una infección vírica, y se puede calcular determinando la cantidad de virus que hay en un fluido corporal implicado, por ejemplo se puede dar en forma de copias de ácidos nucleicos por mililitro de sangre. La determinación de la carga viral es parte de la vigilancia de una terapia durante unas infecciones virales crónicas, por ejemplo en unos pacientes que están comprometidos inmunológicamente.

Por lo tanto hay una necesidad continua en la especialidad de disponer de unos métodos simples, rápidos y baratos para detectar, identificar y cuantificar los RSV en unas muestras biológicas en términos de carga viral. Las muestras biológicas se pueden obtener a partir de cualquier organismo pero preferentemente son de origen humano o animal.

Preferiblemente, dicho método debe de ser capaz de procesar a un ARN que se deriva de un esputo y de un lavado naso-faríngeo (NPW, acrónimo de naso-pharyngeal wash). Como una consecuencia de ello, el, es decir el ensayo de detección de la carga viral con los RSV debe de incluir un método de tratamiento de un esputo y de un NPW como preparación para la extracción del ARN a partir de estas muestras. El análisis debe también ser cuantitativo y capaz de distinguir entre un RSV-A y un RSV-B con el fin de no pasar por alto un desplazamiento potencial de un brote de RSV en una cierta estación.

El problema que se presenta con un esputo y un NPW consiste en que unas partes alícuotas de los mismos son bastante difíciles de manipular, especialmente en lo que se refiere a la extracción del material de ácido nucleico a partir de dichas partes alícuotas. El uso del denominado proceso EasyMAG[®] (de BioMérieux) para la extracción de un material de ácido nucleico (tal como un ARN) a partir de una muestra requiere una solución más o menos líquida

para la extracción del ácido nucleico a partir de dicha solución. Es evidente que un esputo, un tejido pulmonar, pero también un NPW o unas fracciones celulares que contienen los RSV que se han de detectar, no se cualifican como una solución líquida factible para una extracción ulterior de ácido nucleico a partir de ellos/as.

5 Se divulga un método de tratamiento de unas muestras, especialmente de un esputo y un NPW, antes de la extracción del ácido nucleico a partir de dichas muestras. Después de la extracción del ácido nucleico a partir de las muestras, el ácido nucleico es cuantificado p.ej. por detección de la carga viral o bien por medio de una adicional reacción en cadena de la polimerasa (q-RT-PCR) en tiempo real o adicionalmente mediante la denominada tecnología de enzima de ácido nucleico de componentes múltiples (MNAzima).

10 El método de extracción que se usa para el aislamiento y la detección subsiguiente de ácidos nucleicos (ARN y/o ADN), no se limita a unas muestras que contienen el ARN de los RSV, sino que se puede aplicar para la detección de cualquier patógeno respiratorio vírico (ARN o ADN) o bacteriano (ADN) tal como, pero sin limitarse a los de Influenza A y B, los de Para-Influenza tipos 1, 2, 3 y/o 4, de meta-neumovirus, rinovirus y adenovirus.

Una parte del presente invento es un método para la extracción de ácidos nucleicos a partir de una muestra biológica, del que se ha encontrado que comprende las siguientes etapas:

- 15 a) obtener una muestra biológica (p.ej. un material tisular a partir de un ser humano o una especie de animal,
 b) añadir una mezcla de una solución salina tamponada con fosfato y de 10 % de ditiotreitolo a dicho material tisular de la etapa a),
 20 c) incubar en condiciones ultrasónicas,
 d) añadir un tampón para lisis,
 e) obtener un material tisular lisado y
 f) extraer dicho ácido nucleico a partir de dicho material tisular lisado.

25 La etapa c) más arriba mencionada se realiza preferiblemente con un aparato ultrasónico denominado Covaris S2 mientras que la etapa de extracción f) se realiza preferiblemente usando el denominado proceso EasyMAG (de BioMérieux).

La etapa c) más arriba mencionada puede ser alternativamente una etapa de mezclado que usa un aparato Dyspomix específicamente para un tejido (de pulmón).

30 El ácido nucleico puede ser uno cualquiera o ambos de los ADN o ARN procedentes de patógenos tales como unos virus o cualquier otro microorganismo mientras que dicho material tisular puede ser o bien un esputo, un lavado nasofaríngeo (NPW) o un tejido de pulmón congelado, en donde dicho virus es por ejemplo un virus sincitial respiratorio (RSV) humano.

De acuerdo con el invento, dicho ácido nucleico se cuantifica adicionalmente por la denominada tecnología de enzima de ácido nucleico de componentes múltiples (MNAzima).

35 La combinación del método de extracción de ácido nucleico, que se ha descrito más arriba, preferiblemente a partir de unas muestras de pacientes que contienen los RSV con la cuantificación ulterior o bien por una q-RT-PCR o la una tecnología de MNAzima, es también una parte del presente invento.

El invento se refiere además parcialmente a un método para identificar, detectar o cuantificar la presencia de por lo menos un virus sincitial respiratorio (RSV) diana, que comprende las siguientes etapas:

- 40 (a) proporcionar dos o más componentes oligonucleótidos, en los que por lo menos un primer componente oligonucleótido y por lo menos un segundo componente oligonucleótido son capaces de autoensamblarse en la presencia de dicha diana para formar una enzima de ácido nucleico de componentes múltiples (MNAzima) catalíticamente activa;
 (b) poner en contacto dichos componentes oligonucleótidos con una muestra que putativamente contiene dicha por lo menos una diana en unas condiciones de:
 45 (1) permitir la fijación de dicha diana a dichos componentes oligonucleótidos y
 (2) permitir la actividad catalítica de la MNAzima; y
 (c) identificar, detectar o cuantificar la presencia de la actividad catalítica de la MNAzima, en donde la presencia de la actividad catalítica es indicativa de la presencia de dicha diana.

Preferiblemente, la carga viral de la diana, RSV, es cuantificada por el método más arriba mencionado.

Para ofrecer una explicación detallada de una tecnología de q-RT-PCR, se hace referencia al documento de patente europea EP 543. 942 presentada por F.Hoffmann-La Roche AG, Suiza, mientras que la tecnología de MNAzima es explicada con gran detalle en el documento de solicitud de patente australiana PCT/AU2006/001473 presentada por Johnson & Johnson Research Pty Limited, Australia) y ambos documentos se incorporan aquí por su referencia con el objeto de proporcionar una explicación detallada de ambas tecnologías.

En lo que se refiere a la tecnología de MNAzima, se presenta a continuación una descripción general de dicha tecnología.

Una divulgación de una molécula de componentes múltiples que se usa en un ensayo se puede encontrar en el documento de solicitud de patente internacional WO03/089650. Las MNAzimas (solicitud de patente PCT/AU2006/001473 presentada por Johnson & Johnson Research Pty Limited, Australia) son unos nuevos ácidos nucleicos catalíticos que están basados en ADNzimas. Las MNAzimas consisten en dos o más secuencias de oligonucleótidos (p.ej. partzimas) que, solamente en la presencia de una molécula facilitadora del ensamble de una MNAzima forman una enzima de ácido nucleico activa que es capaz de modificar catalíticamente a un sustrato, por ejemplo a un sustrato reportero. Una MNAzima ilustrativa, que comprende la partzima A y la partzima B, se describe en la Figura 2. Con referencia a la Figura 2, las partzimas A y B ADN se fijan, cada una de ellas, a una diana, es decir a la molécula facilitadora del ensamble de una MNAzima (p.ej. mediante un emparejamiento de bases según Watson-Crick con una diana de ácido nucleico). La MNAzima se forma solamente cuando los brazos de sensores de las partzimas A y B se hibridan adyacentemente uno con otro en la diana. Los brazos de sustrato de la MNAzima se aplican al sustrato reportero, cuya disociación es catalizada por el núcleo catalítico de la MNAzima, que se ha formado por la interacción de los dominios catalíticos de las partzimas A y B. La MNAzima disocia al sustrato entre un fluoróforo y un par de tintes desactivadores, generando de esta manera una señal. La disociación de una quimera de ADN y ARN (sustrato reportero) se ilustra como ejemplo en el dibujo. Al término de "MNAzima" se hace referencia también como "una enzima de ácido nucleico de componentes múltiples". Una MNAzima puede comprender también un oligonucleótido estabilizador, que proporciona estabilidad a la MNAzima interactuando con una facilitadora del ensamble o un sustrato. Es evidente que la formación de una MNAzima requiere el ensamble de por lo menos los componentes partzimas con la diana (o la facilitadora del ensamble), así como la fijación de un sustrato reportero, para que la actividad catalítica sea detectable, y para que la ausencia de cualquiera de estos componentes dé como resultado una falta de actividad catalítica.

El sustrato reportero que se usa con las MNAzimas puede ser marcado por uno cualquiera de una gran diversidad de medios que incluyen, por ejemplo, unos fluoróforos (con o sin uno o más componentes adicionales, tales como desactivadores) unas marcas radiactivas, una marcación con biotina (p.ej. una biotilación) o unas marcas quimioluminiscentes. Unos sustratos reporteros para ácidos nucleicos catalíticos pueden incluir también unas enzimas de proteínas o ácidos nucleicos, por ejemplo, unidas por enlaces covalentes a sus extremos terminales.

Los sustratos reporteros usados con las MNAzimas pueden ser unos sistemas de sustratos reporteros genéricos, que permiten un desarrollo rápido de los ensayos, permitiendo unos fáciles cambios de diseño para crear nuevas MNAzimas que reconozcan a diferentes dianas.

La porción de brazo de sustrato y la porción de núcleo catalítico de las partzimas puede permanecer inalteradas, requiriéndose cambios solamente en la porción de brazo de sensor de una o más partzimas que se requiere para nuevas dianas. Se proporcionan unas secuencias de sustratos genéricos y el mismo sustrato puede por lo tanto ser incorporado en unos ensayos para muchas diferentes dianas. Además, el mismo sustrato puede ser incorporado en los métodos en diversas formas de realización del presente caso, incluyendo unos ensayos en los que el sustrato está libre en disolución o está trabado o unido a un soporte. Se puede usar una serie de sustratos genéricos en una reacción multiplex que permite la detección simultánea de múltiples dianas. Unas estrategias con MNAzimas que usan unos sustratos genéricos ofrecen una ventaja mayoritaria con respecto a unas tecnologías tales como las TaqMan® o Beacons, que requieren el diseño y el uso de unas sondas que sean específicas para cada nueva diana.

Como se describirá seguidamente con más detalle, las MNAzimas tienen en ciertas formas de realización la ventajosa propiedad de ser capaces de utilizar un sustrato reportero universal o genérico. Dicho sustrato se muestra en la Figura 2 en una configuración actualmente preferida, en la que el sustrato reportero comprende a la vez una porción detectable y una porción desactivadora. La porción desactivadora está adaptada para disminuir o eliminar una señal detectable a partir de la porción detectable del sustrato hasta que la MNAzima disocia al sustrato. Por ejemplo, la porción desactivadora puede comprender el "Desactivador de Agujero Negro = Desactivador de Agujero Negro 1" (BHQ1) o "el Desactivador de Agujero Negro 2" (BHQ2). Por lo tanto, la MNAzima disocia al sustrato reportero entre la porción detectable y la porción desactivadora permitiendo que las dos porciones se separen en una solución, permitiendo de esta manera que la señal detectable aparezca o aumente cuando la porción desactivadora sea distanciada, o eliminada de manera efectiva, desde el entorno local de la porción detectable.

El uso del sustrato reportero genérico o universal es habilitado mediante el diseño de las partzimas componentes de las MNAzimas. Alterando solamente los brazos de sensores de las partzimas, pero dejando inalterados a los brazos de sustrato, se puede diseñar una gran variedad de MNAzimas que sean específicas para cada una de una pluralidad de dianas, todas las cuales utilizan un sustrato reportero universal para la detección. Un profesional experto apreciará las ventajas que esto ofrece en términos de eliminar la necesidad de tener unos sustratos ajustados a medida o únicos para cada diana. Cada nueva diana requiere solamente uno o más cambios en una o más de las porciones de brazos de sensores; la porción de brazo de sustrato y la porción de núcleo catalítico pueden permanecer constantes. Por lo tanto, un único sustrato reportero se puede usar para una única diana usando una MNAzima, y múltiples dianas en una serie de ensayos que usan unas MNAzimas alteradas. Una pluralidad de sustratos reporteros permite una multiplexión para detectar múltiples dianas en un único ensayo usando múltiples MNAzimas, una para cada diana. Dichos métodos multiplexados de usar MNAzimas se ejecutan con facilidad en disolución o con unión a un sistema de soporte. Se considera en el presente contexto que unos ensayos multiplexados se pueden ejecutar de esta manera en unos sistemas que implican unir uno o más de los elementos sustrato reportero o las partzimas de MNAzimas o la facilitadora del ensamble, o unas actividades adicionales de las enzimas, a un soporte, como aquí se ha descrito.

Los sustratos pueden ser modificados por una MNAzima proporcionando de esta manera un efecto detectable. En el proceso de detección, la modificación del sustrato reportero por una MNAzima puede implicar, por ejemplo, una disociación, una ligación, una metalación de porfirinas y una formación de enlaces de carbono y carbono, de enlaces de éster o de enlaces de amida. Como una consecuencia de la modificación del sustrato reportero por una MNAzima, se genera un efecto detectable y la magnitud del efecto puede ser, por lo tanto, indicativa de la cantidad de la diana que se desea medir. El efecto detectable puede ser detectado por medio de una diversidad de métodos, incluyendo una espectroscopia por fluorescencia, una resonancia de plasmones en la superficie, una espectroscopia de masas, una resonancia magnética nuclear (RMN), una resonancia de espín de electrones, una espectroscopia de fluorescencia con polarización, un dicroísmo circular, un inmunoensayo, una cromatografía, una radiometría, una fotometría, una escintigrafía, unos métodos electrónicos, una espectroscopia de rayos UV (ultravioletas), luz visible o infrarrojos, unos métodos enzimáticos o cualquier combinación de ellos.

Las MNAzimas pueden contener una o más sustituciones, tales como compuestos análogos, derivados, bases modificadas o alteradas, ribonucleótidos, alteraciones de la cadena principal de azúcar o de fosfato, diversas supresiones, inserciones, sustituciones, duplicaciones u otras modificaciones, o cualquier combinación de éstas, que son bien conocidas por los expertos en la especialidad. Tales modificaciones, sustituciones, supresiones, inserciones, etc. se pueden hacer en los brazos de sensores y/o de sustrato y/o en las porciones de núcleo catalítico de manera tal que la molécula retenga la actividad catalítica. Unas sustituciones y modificaciones en los brazos que se fijan al sustrato o a la facilitadora del ensamble pueden ser bien toleradas y de hecho son la base para permitir el ajuste a medida de las moléculas a diferentes sustratos y/o facilitadoras del ensamble. Por ejemplo, una modificación de los brazos de sensores permitirá el ajuste a medida a diferentes facilitadoras del ensamble, mientras que una modificación de los brazos de sustrato permitirá el ajuste a medida a diferentes sustratos.

Un profesional experto apreciará que las MNAzimas comprenden o bien unos desoxirribonucleótidos o unos ribonucleótidos, o incluso ambos. Se prefieren especialmente aquellas MNAzimas que comprenden por lo menos uno y, más preferiblemente, todos los componentes oligonucleótidos de los desoxirribonucleótidos. También se prefieren las MNAzimas que comprenden por lo menos una base de desoxirribonucleótido o su compuesto análogo, dentro del núcleo catalítico de la MNAzima. Son incluso más preferidas aquellas formas de realización en la que dicha base es requerida por su actividad catalítica.

Un ejemplo básico de una estructura de MNAzima se representa en la Figura 2. La estructura mostrada comprende la partzima A y la partzima B que se han emparejado en bases con una molécula facilitadora del ensamble de una MNAzima, que se muestra aquí simplemente como la Diana. Las enzimas partzimas A y B, por interacción con una Diana, han permitido que el núcleo catalítico llegue a una estrecha proximidad y de esta manera se forme. Los brazos de sustrato de la MNAzima han interactuado con un sustrato y han emparejado bases con él, aquí denominado el Sustrato Reportero. De esta manera la MNAzima se ha autoensamblado y este proceso es facilitado mediante la presencia de la molécula facilitadora del ensamble de una MNAzima Diana. En ausencia de la Diana, no se formará ninguna MNAzima. Una modificación (en este caso, una disociación) del sustrato es catalizada por el núcleo catalítico de la MNAzima en el Sitio de Disociación de MNAzimas dentro del sustrato designado por la flecha vertical. El sustrato, en esta forma de realización particular del invento, comprende una porción detectable que tiene una señal detectable, por ejemplo un fluoróforo F, y una porción desactivadora que tiene un efecto de desactivación de la señal detectable F mediante la acción del desactivador Q. Después de la disociación en el Sitio de Disociación de una MNAzima, hay un aumento sustancial en una señal detectable, que aquí es una fluorescencia, que es detectada o cuantificada con facilidad.

De acuerdo con el invento, la partzima A y la partzima B, mostradas en la Figura 2, comprenden, cada una de ellas, una porción de brazo de sustrato, una porción de núcleo catalítico y una porción de brazo de sensor. En la presencia de una diana, las porciones de brazos de sensores de la partzima A y de la partzima B pueden comenzar a hibridarse an, y emparejar bases con porciones complementarias de la diana, por ejemplo una secuencia de ADN o ARN. Después de haberse puesto en contacto con la diana de esta manera, la MNAzima se autoensambla formando un núcleo catalítico, que puede modificar a un sustrato que está unido por los brazos de sustrato. De manera preferible, la presencia de la MNAzima es detectada mediante la detección o medición de su actividad catalítica. Los brazos de sustrato de la MNAzima ensamblada de esta manera pueden ajustarse a un sustrato, por ejemplo al sustrato reportero mostrado en la Figura 2, mediante la interacción de las secuencias complementarias de los brazos de sustrato y del sustrato. Una vez que el sustrato se ha aplicado de esta manera con los brazos de sustrato, el núcleo catalítico puede favorecer la modificación (p.ej. la disociación) del sustrato, que a su vez puede ser medido, o detectado, ya sea directamente o indirectamente.

Múltiples MNAzimas son útiles en el presente invento puesto que ellas permiten la detección de unas secuencias relacionadas, que difieren en tan poca cosa como por un único nucleótido. Similarmente, se requiere un único sustrato reportero para detectar a cada una de las diversas dianas. En algunos casos, para multiplexar el método requiere el uso de una señal detectable distinguible o única para cada sustrato reportero, con el fin de facilitar el diseño del método.

El ácido nucleico diana puede ser amplificado de acuerdo con un proceso para amplificar ese ácido nucleico (es decir, un ADN o ARN). Preferiblemente, se usan unos métodos clásicos de amplificación in vitro. Los amplicones generados durante la amplificación sirven como unas dianas para una MNAzima, y por lo tanto una actividad de MNAzima es indicativa de la presencia de la diana. Un profesional experto apreciará que dicha vigilancia se puede realizar dentro de un único recipiente en unas condiciones que permiten a la vez la amplificación y el ensamble de la MNAzima y la actividad catalítica, o el ensayo de MNAzima se puede realizar en un momento posterior, o en algunos momentos posteriores a lo largo de la amplificación, sacando muestras al final o durante el curso de las tandas de reacción de amplificación.

El método para detectar la presencia de por lo menos una diana o facilitadora del ensamble puede comprender además proporcionar por lo menos unos componentes oligonucleótidos tercero y cuarto, en donde dicho por lo menos un tercer componente oligonucleótido y dicho por lo menos un cuarto componente oligonucleótido son capaces de autoensamblarse en la presencia de por lo menos una adicional diana o facilitadora del ensamble para formar por lo menos una adicional MNAzima activa catalíticamente, y en donde está presente en la muestra por lo menos un sustrato reportero adicional, siendo dicho sustrato reportero adicional capaz de ser modificado solamente por la adicional MNAzima, en donde dicha modificación proporciona dicho efecto detectable adicional.

Se obtienen unas curvas patrón de valores de ciclo de umbral (Ct acrónimo de Cycle threshold) a lo largo del tiempo para la(s) diana(s) y se representan gráficamente sobre las curvas patrón, generalmente obtenidas a partir de un gen testigo o casero, y se visualiza y calcula la proporción de una diana establecida en la población vírica o en un entorno establecido.

Los protocolos y productos del presente invento se pueden usar para diversas finalidades de diagnóstico, clínicas, toxicológicas, de investigación y forenses, incluyendo el descubrimiento de fármacos, el diseño de terapias de los pacientes, el ensayo de la eficacia de los fármacos y la gestión del tratamiento de los pacientes. Los presentes métodos se pueden usar en combinación con estos ensayos. Los resultados se pueden implementar en modelos de ordenador y en bases de datos. Adicionalmente, los protocolos y productos del presente invento permiten también vigilar el efecto de unos compuestos anti-RSV sobre la carga viral.

Definiciones

Los términos "molécula facilitadora del ensamble", "facilitadora del ensamble", "molécula facilitadora del ensamble de una MNAzima", "facilitadora" y "facilitadora del ensamble de una MNAzima", tal como se usan en el presente contexto, se refieren a unas entidades que pueden facilitar el autoensamble de partzimas componentes para formar una MNAzima activa catalíticamente. En unas formas de realización preferidas, se requiere una facilitadora del ensamble para realizar el autoensamble de una MNAzima. Una facilitadora del ensamble en algunas formas de realización comprende una diana tal como un analito de ácido nucleico o que no sea de ácido nucleico. Las moléculas facilitadoras del ensamble pueden comprender una o más regiones o moléculas que pueden emparejarse con, o fijarse a, una o más "partzimas" de oligonucleótidos, que constituyen unos componentes o unas porciones de una "MNAzima". No se requiere que la facilitadora del ensamble interactúe con, se empareje con, o se fije a cada partzima o oligonucleótido con la condición de que ella interactúe con, se empareje con o se fije a, por lo menos una de las partzimas componentes de una MNAzima. Tal como se usan en el presente contexto, las moléculas facilitadoras del ensamble de una MNAzima están pensadas para abarcar la más amplia gama de constituyentes, que pueden facilitar el autoensamble de una MNAzima. En algunas formas de realización, una facilitadora del

ensamble puede comprender cualquier célula o cualquier porción de la misma, por ejemplo cualquier célula eucariótica o procariótica, virus, prion, levadura u hongo, o cualquier otra molécula que, por ejemplo, incluya, pero no esté limitada a, una proteína, un polipéptido, un péptido o un ácido nucleico. En otras formas de realización, una facilitadora del ensamble puede comprender un virus, un prion, una levadura o un hongo, o cualquier otra molécula que, por ejemplo, incluya, pero no esté limitada a, glicoproteínas, lípidos, lipoproteínas, organismos enteros, células, virus, bacterias, arqueas, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, pequeñas moléculas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones o cualesquiera derivados, porciones o combinaciones de los/as mismos/as.

El término "diana", tal como se usa en el presente contexto, incluye cualquier entidad, constituyente o analito, natural o sintético/a que se desee detectar, identificar o cuantificar por medio de una(s) particular(es) MNAzimas. Por lo tanto, las dianas abarcan la más amplia gama de entidades, constituyentes o analitos detectables para los/las que sean deseables unos sensibles métodos de detección, identificación y/o cuantificación. En algunas formas de realización, una diana comprende una facilitadora del ensamble. Algunas dianas ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, proteínas, polipéptidos, péptidos o ácidos nucleicos, glicoproteínas, lípidos, lipoproteínas, organismos enteros, células, virus, bacterias, arqueas, levaduras, hongos, anticuerpos, metabolitos, patógenos, toxinas, contaminantes, venenos, pequeñas moléculas, polímeros, iones metálicos, sales metálicas, priones o cualesquiera derivados, porciones o combinaciones de los/as mismos/as. Otras dianas se consideran también para su uso en el presente contexto.

Los términos "substrato", "molécula de substrato" y "substrato químico" como se usan en el presente contexto, incluyen cualquier molécula que sea apta para ser reconocida y afectada o modificada químicamente por una molécula catalítica. En unas formas de realización particulares, un substrato puede ser reconocido y modificado por una enzima. En otras formas de realización, un substrato puede ser reconocido y modificado por una molécula de ácido nucleico catalítico. La modificación química de un substrato puede ser medida por la aparición de, o el aumento en, un producto de la reacción de modificación, o por la desaparición de, o la disminución en, un substrato de las tandas de reacción de modificación. Una molécula catalítica particular puede reconocer a una o más diferentes moléculas de substratos, con tal de que cada molécula de substrato tenga por lo menos una estructura mínima, que sea reconocible en cuanto a una actividad catalítica por la molécula catalítica.

Los términos "substrato reportero", "sonda reportera" o "substrato de sonda reportera" como se usan en el presente contexto, se refieren a un substrato que está particularmente adaptado para facilitar la medición de, o bien la desaparición de un substrato o la aparición de un producto en conexión con una reacción catalizada. Los substratos reporteros pueden presentarse libremente en disolución o unidos (o "trabados"), por ejemplo, a un substrato, o a otra molécula. Un substrato reportero puede ser marcado por uno cualquiera de una gran diversidad de medios, incluyendo, por ejemplo fluoróforos (con o sin uno o más componentes adicionales, tales como desactivadores), marcas radiactivas, una marcación con biotina (p.ej. una biotilación) o unas marcas quimioluminiscentes. Unos substratos reporteros para ácidos nucleicos catalíticos pueden incluir también unas enzimas de proteínas o ácidos nucleicos, unidas covalentemente a sus extremos terminales.

Como se usan en el presente contexto, los términos "partzima", "componente de partzima" y "componente de oligonucleótido" se refieren a un oligonucleótido que contiene un ADN o que contiene un ARN o que contiene un ADN y un ARN, dos o más de los cuales, solamente en la presencia de una molécula facilitadora del ensamble de una MNAzima, pueden formar conjuntamente una "MNAzima". En ciertas formas de realización preferidas, una o más partzimas componentes, y preferiblemente por lo menos dos de ellas, pueden comprender tres regiones o dominios: un dominio "catalítico" que forma parte del núcleo catalítico de la MNAzima, que cataliza una modificación química; un "brazo de sensor" que puede asociarse con, y fijarse a, una facilitadora del ensamble (p.ej. a una diana); y a un dominio de "brazo de substrato" que puede asociarse con, y/o fijarse a, un substrato. Una descripción de estas regiones o estos dominios se puede ver, por ejemplo, en la Figura 2. Una partzima puede comprender una o más moléculas.

Abreviaturas

MNAzima : enzima de ácido nucleico de componentes múltiples, o enzima de ácido nucleico multipartita;

ADNzima : enzima de ácido desoxirribonucleico;

ARNzima : enzima de ácido ribonucleico, o ribozima;

PCR : reacción en cadena de la polimerasa;

dH₂O : agua destilada desionizada;

F : fluoróforo

Q : desactivador

JOE o 6-JOE : 6-Carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína;

FAM o 6-FAM : 6-Carboxifluoresceína;

BHQ1 : Desactivador de Agujero Negro 1;

BHQ2 : Desactivador de Agujero Negro 2.

Figuras

La Figura 1 es un diagrama de flujos de trabajos de diagnóstico para la determinación de la carga viral con RSV.

- 5 La Figura 2 es una representación de un diseño ilustrativo para una MNAzima, en el que unas porciones de brazos de sustrato (A) de unas enzimas parciales A y B se fijan a un sustrato reportero, con el que se unen una marca fluorescente (a la izquierda) y un desactivador (a la derecha). Unas porciones de núcleo catalítico (C) están situadas entre unas porciones de brazos de sustrato (A) y unas porciones de brazos de sensor (B). Después de haber fijado las porciones de brazos de sensor (B) a una diana, el sustrato reportero es disociado en el Sitio de Disociación de una MNAzima, aumentando de esta manera la fluorescencia.
- 10 La Figura 3: es una representación esquemática de un análisis multiplex ilustrativo de múltiples dianas: Dos o más dianas pueden ser detectadas simultáneamente usando dos o más sustratos, siendo cada uno de ellos específico para una MNAzima. Los sustratos son marcados preferiblemente con diferentes fluoróforos. En este ejemplo, la Diana 1 puede ser detectada vigilando el aumento en la fluorescencia de FAM y la Diana 2 puede ser detectada vigilando el aumento en la fluorescencia de JOE. Q: desactivador; FAM, JOE: fluoróforos.
- 15 La Figura 4: es una representación esquemática de las secuencias de Testigos de Control de la Cuantificación Externa clonadas en el vector TOPO-TA (Invitrogen, Merelbeke): EQC-A (A) y EQC-B (B). Los vectores indican el promotor de T7 y los cebadores flanqueadores se usan para generar el amplicón que había sido clonado. También se muestran los dos cebadores que se usaron durante el ensayo de q-RT-PCR en cada vector así como la situación del sitio de restricción con Ndel, usado para linealizar los vectores antes de la transcripción.
- 20 Las Figuras 5a/b: Son unas representaciones esquemáticas de las secuencias de testigos de control de la extracción Interna. La amplificación por q-RT-PCR usa una secuencia conservada y específica de RSV-A y RSV-B en el genoma de RSV. Estas secuencias están situadas en el gen F para RSV-A (1) y en el gen N para RSV-B (3). Los cebadores para amplificar los ARN de los RSV y el testigo de control de la extracción interna de los RSV son idénticos por cada sub-cepa. Las secuencias entre los cebadores son específicas para ciertas sondas: RSV-A ARN = RSVA-Fgen-TP sonda (1), RSV-A testigo de control de la extracción interna = RSVA-EC-Fgen-TP sonda (2); RSV-B ARN = RSVB-Ngen-TP sonda (3), RSV-B testigo de control de la extracción interna = RSVB-EC-Ngen-TP sonda (4).
- 25

- 30 La Figura 6: Es una representación esquemática de las secuencias de testigo de control de la extracción interna (IEC) clonadas en el vector TOPO-TA (Invitrogen, Merelbeke): pIEC-A (A) y pIEC-B (B). Los vectores indican el promotor T7, los dos cebadores y la situación de las sondas para cada vector así como la situación de los sitios de restricción ApaI que se usaron para linealizar los vectores antes de la transcripción.

Los siguientes Ejemplos no limitativos ayudan a ilustrar los principios del invento.

Ejemplos

Ejemplo 1

- 35 Los esputos y los NPW se recibieron a partir de diversas fuentes (REGA, Leuven, Bélgica; O.L.V. Ziekenhuis, Aalst, Bélgica). Las muestras de esputos y NPW que se usaron en estos experimentos cuando no estaban infectadas con RSV fueron entresacadas de unas existencias de virus RSV (RSV-A: RSV-GFP 011828) en su caso.
- 40 Adicionalmente se usaron un Dyspomix (de Wilten Instruments, N° de catálogo 900,021,00, Berchem, Bélgica), un AFA (de Covaris, Hoddesdon, Reino Unido) y un ABI9700HT (de Applied Biosystems, CA, EE.UU.) en el curso de estos experimentos.

Tratamiento de las muestras como preparación para una extracción automática de ARN

- 45 Se desarrolló un método para la preparación de diferentes muestras de RSV para una extracción automática de ARN (véase la Figura 1 para el esquema de flujos de trabajos).
- Diferentes clases de tratamiento podrían realizarse con diferentes clases de muestras (como las que se describen en la Tabla 1).

Tabla 1. Reseña de diferentes tipos de muestras y diferentes métodos de preparación.
NPW: Lavado Nasofaríngeo; BAL: Lavado Bronquioalveolar

	Espuito (humano)	NPW (humano)	Fluido BAL (de ratón)	Cultivo de Virus (Sobrenadante)	Cultivo de Virus (Fracción celular)	Tejido de pulmón (de rata)
Covaris S2	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No
Dyspomix	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
EasyMAG	No	Sí	Sí	Sí	No	No

5 Las muestras se almacenaron en el mismo laboratorio a -80 °C. El peso de las muestras congeladas se determinó mientras que éstas todavía estaban congeladas, se añadió 1 volumen de una mezcla de PBS y 10 % de DTT a las muestras con un volumen final mínimo de 2,2 ml (en un tubo de fondo redondo de polipropileno de Becton Dickinson con una capacidad de 14 ml, número de referencia 352059 (25 por bolsa, estéril)). Unas muestras con un volumen inicial estimado mayor que 1,5 ml fueron en primer lugar transferidas a un tubo de 50 ml antes de la adición de un volumen de PBS y 10 % de DTT por medio de un ligero calentamiento del tubo de 15 ml hasta que las muestras congeladas pudieran ser deslizadas dentro del tubo Falcon de 50 ml (Tapón rojo). La muestra congelada en PBS-10 % de DTT se colocó en el instrumento de Covaris S2 y se trató con el SonoLAB Single v2,4,3 con los siguientes ajustes:

15 Modalidad = Seguimiento de la energía, Número de ciclos = 10, Límite de la temperatura del baño = 15°C

Tratamiento 1: "Ciclo de Trabajo" = 20 %, "Intensidad" = 10 y "Ciclos/Ráfaga" = 100 durante 30 s.

Tratamiento 2: "Ciclo de Trabajo" = 0,1 %, "Intensidad" = 0,1 y "Ciclos/Ráfaga" = 50 durante 10 s.

20 En la mayor parte de los casos era suficiente un (1) ciclo para disolver a la muestra, en el caso de que no fuese así, se añadieron tantos ciclos suplementarios como se necesitasen.

El enfriamiento del Covaris se ajustó a 1 °C.

25 Después del tratamiento de Covaris, se añadieron 4 volúmenes de muestras iniciales de un Tampón de lisis (EasyMAG, de BioMérieux) y se incubaron durante 10 minutos.

30 El instrumento de Covaris S2 que se ha descrito más arriba puede ser encontrado en el sitio web de Covaris viz www.covarisinc.com. En resumen, el proceso de Covaris produce un campo acústico controlado dentro de un recipiente que está cerrado herméticamente. El proceso se basa en una tecnología de energía acústica enfocada controlada por ordenador. El proceso Adaptive Focused Accoustics (con el acrónimo AFA) de Covaris trabaja enviando unos paquetes de ondas de energía acústica a partir de un transductor en forma de plato, que converge y enfoca en una pequeña zona localizada (él es visualizado algunas veces como un cono vibrante de altavoz). En este punto focal, la densidad de energía puede ser enfocada de una manera controlable en la muestra que interesa, lo que ha probado ser beneficioso para numerosas aplicaciones de preparación de muestras. Esencialmente, el proceso hace posible que la energía mecánica sea aplicada a una muestra sin entrar en contacto directamente con la muestra.

35 Un instrumento de Covaris avanzado comprende un denominado intensificador que está unido con el transductor que produce las ondas. Dichas ondas, comenzando a partir del centro del intensificador cóncavo, son reflejadas por el cono y las ondas verticales obtenidas producen un calentamiento suplementario en el fondo del recipiente.

40 Extracción automática de ARN

El ARN fue extraído usando la plataforma de EasyMAG (de BioMérieux) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el suministrador con la siguiente adaptación: se usaron 3 ml del volumen de la muestra lisada (No se dispensaba lisis en el EasyMAG), por 8 muestras que se habían de extraer: 110 µl de IEC-B (testigo de control de la extracción interna para los RSV-B, almacenados a -80 °C) se mezclaron con 440 µl del Tampón 3 de EasyMAG y 550 µl de perlas magnéticas. En total, 125 µl de esta mezcla se dispensaron en pocillos separados usando los ajustes previamente programados número 2 de la pipeta dispensadora de EasyMAG. Usando los ajustes previamente programados número 3 de la pipeta dispensadora de EasyMAG se añadieron 100 µl de esta mezcla a cada una de las muestras. Se realizó una elución en 110 µl (Tampón 3, de EasyMAG). Tan pronto como se hubo completado la extracción, se ejecutó la tecnología de q-RT-PCR o la tecnología de MNAzima tal como se describirá en los Ejemplos 2 (A) y (B) respectivamente. El resto del ARN se almacenó a -80 °C.

Se usaron dos posibilidades para realizar la cuantificación, o bien una q-RT PCR usando la tecnología de Taqman (tecnología de q-RT PCR y unas sondas de Taqman) o la tecnología de MNAzima.

- 5 Para una explicación detallada de la tecnología de q-RT PCR se hace una referencia específica al documento de patente europea EP 543. 942 presentada por F.Hoffmann-La Roche AG, Suiza, mientras que la tecnología de MNAzima se explica con gran detalle en la solicitud de patente PCT/AU2006/001473 presentada por Johnson & Johnson Research Pty Limited, Australia) y ambas se incorporan por la presente para obtener una explicación detallada de ambas tecnologías.

10 Ejemplo 2

(A) *Uso de la tecnología de q-RT PCR y de sondas de Taqman para la cuantificación de unas cepas virales de RSV-A y RSV-B y unas secuencias de ácidos nucleicos testigos por intermedio de una PCR en tiempo real multiplex*

Sondas y Cebadores:

Los cebadores para la amplificación por q-RT-PCR de RSV-A (y por lo tanto también del pIEC-A) fueron:

15

Oligonucleótido	Secuencia	
RSV-A-Fgen-FW	5'-CTGTGATAGA RTTCCAACAA AAGAACA-3'	SeqID No. 1
RSV-A-Fgen-RV	5'-AGTTACACCT GCATTAACAC TAAATTCC-3'	SeqID No. 2

Los cebadores para la amplificación por q-RT-PCR de RSV-B (y por lo tanto también del pIEC-B) fueron:

Oligonucleótido	Secuencia	
RSV-B-Ngen-FW	5'-GGCTCCAGAA TATAGGCATG ATTC-3'	SeqID No. 3
RSV-B-Ngen-RV	5'-TGGTTATTAC AAGAGCAGCT ATACACAGT-3'	SeqID No. 4

- 20 La sonda para RSV-A fue:

Sonda	Secuencia	
RSV-A-Fgen-TP	FAM 5'-CAGACTACTAGAGATTACC-3' NFQ-MGB*	SeqID No. 5
RSV-B-Ngen-TP	FAM 5'-TATCATCCCACAGTCTG-3' NFQ-MGB	SeqID No. 6

*NFQ-MGB: Secuencia de Non-Fluorescent Quencher - Minor Groove Binding [de Fijación a Muesca Menor - desactivador no fluorescente]:

La sonda para pIEC-A fue:

Sonda	Secuencia	
RSV-A-EC-Fgen-TP	FAM 5'-AATGACCAATCCATACGCA-3' NFQ-MGB	SeqID No. 7

25

La sonda para pIEC-B fue:

Sonda	Secuencia	
RSV-B-EC-Ngen-TP	FAM 5'-TACCGTACTCTAGCCTA-3' NFQ-MGB	SeqID No. 8

Para cada muestra, se prepararon tres mezclas para q-RT-PCR en duplicado:
RSV-A, RSV-B y IEC

Muestras	1				
Volumen de reacción (µl)	30				
Detalle de la mezcla	Concentración			Volumen para (µl)	
	Unidad	Existencias	Final	1 muestra	X muestras
Agua libre de Rnasa				0,77	2,31
ARNt de levadura	ng/ml	10.000	120	0,360	1,08
2x Tampón de reacción	X	2,00	1,000	15,000	45,00
Euroscript RT	kU/ml	50,00	0,250	0,150	0,45
Sonda de RSV	µM	25,00	0,100	0,120	0,36
Cebador FW de RSV	µM	20,00	0,900	1,350	4,05
Cebador RV de RSV	µM	20,00	0,900	1,350	4,05
MgCl ₂	mM	50,00	1,500	0,900	2,70
	Volumen total de la mezcla (µl)				60,00
	Volumen de la mezcla / tubo (µl)			20,00	
	ARN total de RSV-A			10,00	

5 Cuando todos los componentes se hubieron añadido a la placa, la placa fue cerrada herméticamente con una Tapa Adhesiva Óptica (de ABI) y centrifugada durante 1 minuto a 1,500 rpm (revoluciones por minuto). Antes de tratar en la ABI7900HT, la placa fue tapada con una Snap-On Optical Film Compression Pad [Almohadilla de Compresión de Película Óptica de Salto Elástico] MicroAmp™ (de ABI).

10 El perfil térmico fue:

"Escalón 1" reacción de la transcriptasa inversa: 48 °C, 30 minutos

"Escalón 2" activación de la polimerasa: 95 °C, 10 minutos

"Escalón 3": 45 repeticiones:

Desnaturalización a 95 °C, 15 segundos

15 Elongación a 60 °C, 1 minuto

Construcción del testigo de control de la cuantificación externa (EQC) para el ensayo por q-RT PCR de RSV

Con el fin de definir el intervalo dinámico del ensayo por q-RT-PCR, se construyeron unos controles de la cuantificación externa. Esto incluía:

- El diseño de las siguientes construcciones artificiales plasmídicas que contenían:
 - 20 ○ La secuencia situada entre los cebadores directo (EQC-RSV-A-FW) e inverso (EQC-RSV-A-RV) que cubre una región de RSV-A de 1.004 pares de bases incluyendo la región en donde se reanillan los cebadores y las sondas de ensayo por q-RT-PCR de RSV-A. Esta construcción artificial es marcada como testigo de control de la cuantificación externa de RSV-A (pEQC-A).
 - 25 ○ La secuencia situada entre los cebadores directo (EQC-RSV-B-FW) e inverso (EQC-RSV-B-RV) que cubre una región de RSV-A de 1.399 pares de bases incluyendo la región en donde se reanillan los cebadores y las sondas de ensayo por q-RT-PCR de RSV-B. Esta construcción artificial es marcada como testigo de la cuantificación externa de RSV-B (pEQC-B).

Cebadores y sondas

Los cebadores encargados para las construcciones artificiales de pEQC-A (EQC-RSV-A-FW, EQC-RSV-A-RV y EQC-RSV-A-RVret) y de pEQC-B (EQC-RSV-B-FW, EQC-RSV-B-RV y EQC-RSV-B-RVret) se describen aquí debajo.

5

Oligonucleótido			
EQC-RSV-A-FW	5'-AATCAAATAAACTCTGGGGC-3'	pb 5631-5651*	SeqID No. 9
EQC-RSV-A-RV	5'-GTTGGTTGTACATAGAGGGG-3'	pb 6634-6615*	SeqID No. 10
EQC-RSV-A-RVret	5'-TACATGTTTCAGCTTGTGGG-3'	pb 6734-6715*	SeqID No. 11
EQC-RSV-B-FW	5'-ATATTTATCAATCATGGCGGG-3'	pb 908-928**	SeqID No. 12
EQC-RSV-B-RV	5'-CTACATCATCTTCTTTGGGG-3'	pb 2306-2286**	SeqID No. 13
EQC-RSV-B-RVret	5'-GTGCCAGATGTTATCGGGC-3'	pb 2524-2507**	SeqID No. 14
* Posiciones que están basadas en la cepa Long (AY911262, RSV-A)			
** Posiciones que están basadas en AY353550 (RSV-B)			

Muestras de RSV

Para este experimento se usaron unas partes alícuotas de una existencia de virus RSV-A-GFP (GST011828) y RSV-B-P3-Hep2 (REGA).

10

Extracción y amplificación del ARN de deseados fragmentos del genoma de RSV

Unas existencias de virus RSV-A-GFP (GST011828) y RSV-B-P3-Hep2 (REGA) se extrajeron en el EasyMAG: entrada 1,000 µl, salida 55 µl. El ARN se sometió subsiguientemente a una amplificación por PCR hemianidada con RT. Las mezclas y condiciones de PCR se especifican aquí abajo.

15

Reseña de las diferentes mezclas de amplificación por PCR (RT) y condiciones para generar los productos de amplificación hemianidada para RSV-A (1.004 pb) y RSV-B (1.399 pb). Las secuencias exactas de los cebadores se han mencionado más arriba.

Preparación de la mezcla de PCR

RT-PCR

Nº de Muestras	1				
Volumen de Reacción (µl)	35				
Detalle de la Mezcla	Concentración			Volumen para (µl)	
	Unidad	Existencias	Final	1 muestra	x muestras
Agua libre de Rnasa				6,10	12,20
2x Tampón de reacción HiFi	X	2,00	1,000	17,50	35,00
Cebador FW	µM	20,00	0,200	0,35	0,70
Cebador RVret	µM	20,00	0,200	0,35	0,70
SobreescritoTM III HiFi	U/µl	100,00	2,000	0,70	1,40
Volumen total de la mezcla (µl)				25,00	50,00
Volumen de ARN total (µl)				10,00	

20

Ciclado térmico

etapa	temp. (°C)	tiempo	ciclos
1	53	30'	
2	94	2'	
3	92	15''	40
4	55	30''	
5	68	1'30''	
6	68	7'	
7	4	retención	

Hemianidado

Muestras	1				
Volumen de reacción (µl)	50				
Detalle de la mezcla	Concentración			Volumen para (µl)	
	Unidad	Existencias	Final	1 muestra	x muestras
Agua libre de Rnasa				39,17	78,34
Tampón de PCR (MgCl ₂ 15 mM)	X	10,00	1,000	5,00	10,00
dNTPs	mM	25,00	0,200	0,40	0,80
Cebador FW	µM	20,00	0,200	0,50	1,00
Cebador RV	µM	20,00	0,200	0,50	1,00
Expand TM HF PCR	mM	3,50	0,030	0,43	0,86
Volumen total de la mezcla (µl)				46,00	92,00
Volumen total de la mezcla para RT-PCR (µl)				4,00	

5 **Ciclado térmico**

Etapa	temp. (°C)	tiempo	ciclos
1	94	2 min	
2	94	15''	35
3	60	30''	
4	68	1'	
5	68	7'	
6	4	Retención	

Clonación en TOPO-TA

Los fragmentos de PCR obtenidos fueron clonados usando el estuche de clonación TOPO TA (de Invitrogen, Merelbeke, Bélgica) siguiendo las instrucciones del fabricante. Dicho brevemente, 4 µl de un producto de PCR (no purificado) se mezclaron con 1 µl de una solución de sal y 1 µl de un vector.

10 La mezcla de reacción de ligación se transformó en el seno de células *E.coli* TOP10 químicamente competentes siguiendo las instrucciones del fabricante.

Después de haber crecido los cultivos de *E.coli* durante una noche, 10 colonias por construcción artificial (pEQC-A y pEQC-B) fueron transferidas a un medio líquido de LB/Ampicilina, se dejaron crecer durante una noche y se ejecutó una miniprep (de Qiagen, Hilden, Alemania). Volumen final = 50 µl, no se midió la concentración.

15 **Secuenciación**

En total 0,75 µl del ADN generado se sometieron a una secuenciación. La secuenciación se hizo usando el estuche de secuenciación Big Dye Terminator (BDT) Cycle Sequencing Kit v3,1 (Nº de catálogo 4337457, Applied Biosystems, CA, EE.UU.).

20 La composición de la mezcla de cada pocillo se indica en la tabla presentada más abajo. Las tandas de reacción de secuenciación se ejecutaron usando el conjunto de cebadores

"T3" (5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3') (SeqID No. 15) y

"T7" (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') (SeqID No. 16) que están situados en el vector TOPO-TA.

La secuenciación por PCR se hizo usando el 9800 Fast Thermal Cycler (de Applied Biosystems (ABI), N° de catálogo 4356204, CA, EE.UU.). Las condiciones de PCR fueron 96 °C durante 5 segundos, 50 °C durante 5 segundos, 60 °C durante 1 minuto y 15 segundos y esto durante 25 ciclos en total seguidos por una retención final a 12 °C.

Tabla : La composición de la mezcla de una única reacción de secuenciación, con un volumen final de 5,75 µl. (* se usó el cebador de secuenciación T7 o T3). "BDT" = acrónimo de Big Dye Terminator, "DB" = acrónimo de La dilución Buffer (tampón de dilución)

Preparación de la mezcla de secuenciación (µl):

	x pocillos		
	1 pocillo	20	
BDT	0,25	5,25	µl
DB	1,25	26,25	µl
Agua	1,50	31,50	µl
Cebador*	2,00	42,00	µl
Mezcla total	5,00	105,00	µl
Amplificación	0,75		

Programa de PCR rápida:

Temperatura	Tiempo	Nº de ciclos
96 °C	5"	25
50 °C	5"	
60 °C	1'15"	
12 °C	Retención	

Transcripción de ARN in Vitro

Un clon correcto de cada una de las construcciones artificiales EQC (Clon 6 para la EQC-A y Clon 3 para la EQC-B) se linealizó usando la enzima de restricción Ndel (Fig. 4 A & B). La digestión con la enzima de restricción se ejecutó a 37 °C para 3 horas usando el tampón 4 para la enzima de restricción. Las reacciones fueron detenidas por incubación a 65 °C (20 minutos) y se purificó. A la mezcla digerida por restricción, se le añadieron 1/20 volúmenes de EDTA 0,5 M (1 µl), 1/10 volúmenes de NaOAC (2 µl) y 2 volúmenes de EtOH (40 µl). La mezcla se puso a -20 °C durante como mínimo 15 minutos, y luego se centrifugó durante 15 minutos a la velocidad máxima. El material sobrenadante se desechó y el sedimento se disolvió en 50 µl del tampón TE. Las construcciones artificiales linealizadas fueron luego transcritas usando el estuche MEGAshortscript™ T7 Kit (de Ambion, N° de catálogo 1354, Texas, EE.UU.). Las mezclas de reacción fueron incubadas a 37 °C durante 4 horas. Se predijo que la longitud total del ARN transcrito era de 1.250 (para EQC-A) y 1.600 (para EQC-B) nucleótidos. Múltiples reacciones paralelas fueron ajustadas para cada una de las EQC.

Retirada de ADN

Las mezclas de transcripción fueron tratadas con TURBO DNase™ (se añadieron 2 µl a la mezcla de transcripción, Ambion, N° de catálogo 2238, Texas, EE.UU.). El tratamiento con DNase perduró durante 1 hora a 37 °C en un volumen final de 100 µl. El ARN se purificó por medio de una extracción del ARN en el EasyMAG (de BioMérieux) eluyendo en 100 µl. Los materiales eluidos purificados fueron agrupados dando como resultado un volumen final de aproximadamente 1 ml por EQC.

Cuantificación de una EQC en tiempo real

Los transcritos purificados fueron sometidos a una cuantificación por PCR en tiempo real o bien en la presencia o la ausencia de la enzima RT. Las composiciones mezcladas de las diversas mezclas se pueden encontrar aquí después de esto:

EQC-A

Nº de muestras	1				
Volumen de reacción (µl)	30				
Detalle de la mezcla	Concentración			Volumen para (µl)	
	Unidad	Existencias	Final	1 muestra	X muestras
Agua libre de Rnasa				1,670	5,01
tARN de levadura	ng/ml	10.000	120	0,360	1,08
2x Tampón de reacción	X	2,00	1,000	15,000	45,00
Euroscript RT	kU/ml	50,00	0,250	0,150	0,45
Sonda de RSV-A	µM	25,00	0,100	0,120	0,36
Cebador FW de RSV-A	µM	20,00	0,900	1,350	4,05
Cebador RV de RSV-A	µM	20,00	0,900	1,350	4,05
Volumen total de la mezcla (µl)					60,00
Volumen de la mezcla / Tubo (µl)				20,00	
ARN total				10,00	

EQC-B

Nº de Muestras	1				
Volumen de reacción (µl)	30				
Detalle de la mezcla	Concentración			Volumen para (µl)	
	Unidad	Existencias	Final	1 muestra	X muestras
Agua libre de Rnasa				1,670	5,01
tARN de levadura	ng/ml	10,000	120	0,360	1,08
2x Tampón de reacción	X	2,00	1,000	15,000	45,00
Euroscript RT	kU/ml	50,00	0,250	0,150	0,45
Sonda de RSV-B	µM	25,00	0,100	0,120	0,36
Cebador FW de RSV-B	µM	20,00	0,900	1,350	4,05
Cebador RV de RSV-B	µM	20,00	0,900	1,350	4,05
Volumen de la mezcla total (µl)					60,00
Volumen de la mezcla / Tubo (µl)				20,00	
ARN total				10,00	

5 El programa usado en el equipo de PCR en tiempo real ABI9700 HT fue de 48 °C durante 30 minutos, de 95 °C durante 10 minutos seguido por 45 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y de 60 °C durante 1 minuto. Para todos los experimentos se usaron solamente sondas marcadas con FAM (ensayos Monoplex).

Reproducibilidad de las EQC (partes alícuotas congeladas)

A partir de las agrupaciones de ARN de EQC (evaluadas en cuanto al contenido residual de ADN), se hicieron unas series de diluciones a lo largo de 8 logs (8 partes alícuotas, diluidas a 1/10) con un volumen total de 2.500 μ l. A partir de estas existencias se tomaron unas partes alícuotas de 23 μ l cada una y se almacenaron a -80 °C hasta que se realizó el tratamiento.

Tratamiento de las muestras, un ejemplo

En total se trataron 5 muestras clínicas (Esquema de flujos, véase la Figura 1). Todas muestras se transfirieron a un tubo Falcon de 15 ml y se añadió PBS/1 % de DTT a un volumen final de 2,2 ml. Esta mezcla se trató en el AFA (de Covaris) durante 60 segundos antes de la adición de 4 ml de un tampón de lisis (EasyMAG, de BioMérieux). A partir de estos 6,2 ml por muestra, se trataron 3 ml en el EasyMAG (de BioMérieux) y el ARN se eluyó en 110 μ l de los que 10 μ l se trataron en la q-RT-PCR en duplicado. El experimento se repitió una vez comenzando a partir de la extracción con los restantes 3 ml.

Resultados**PCR**

Las tandas de reacción de PCR hemianidadas por RT se organizaron en duplicado y ambas generaron buenos resultados para cada uno de los amplicones. El tamaño esperado para el amplicón de RSV-A fue de 1.004 pb y para el de RSV-B fue de 1.399 pb. Estos fragmentos de PCR amplificados fueron ligados en un vector TOPO-TA y transformados en el seno de *E.coli* competentes. Los transformantes se dejaron crecer durante una noche sobre placas sólidas de LB/ ampicilina. En total 10 colonias fueron transferidas a un medio líquido de LB/Ampicilina y se dejaron crecer de nuevo durante una noche. Se preparó una miniprep (de Qiagen, Hilden, Alemania) a partir de estos cultivos y el resultante ADN se sometió a una secuenciación.

Secuenciación

No todos los fragmentos de PCR se ligaron en la misma dirección en el vector TOPO-TA. En total, 2 clones para el pEQC-A y 6 clones para el pEQC-B se clonaron en la correcta dirección dentro del vector TopoTA. De estos clones, se escogieron el Clon 6 (pEQC-A) y el Clon 3 (pEQC-B) para la transcripción in Vitro.

Transcripción in Vitro

El Clon 6 (pEQC-A) y el Clon 3 (pEQC-B) se sometieron a una digestión por restricción usando *Nde*I y se purificaron como se ha descrito más arriba. Las construcciones artificiales linealizadas y purificadas se sometieron a una transcripción in Vitro (usando el estuche MEGAShortscript™ T7 Kit (de Ambion)). El ADN residual se retiró usando la TURBO DNase™ (de Ambion). Los transcritos se purificaron por medio de una extracción del ARN en el EasyMAG (de BioMérieux) que se ha descrito más arriba.

Resultados de la PCR en tiempo real

Los transcritos puros se diluyeron a 1/1.000 y se sometieron a una reacción de cuantificación en tiempo real PCR con la enzima RT (produciéndose una señal de color azul oscuro) y sin ella (produciéndose una señal de color azul claro) para determinar el contenido de ADN residual de los transcritos. El transcrito en la hora 4 de pEQC-A mostró una diferencia de 12 Cts entre la reacción ejecutada sin RT y la reacción ejecutada en la presencia de RT. El ADN residual en los transcritos de RSV-B era comparable al de pEQC-A con una diferencia de aproximadamente 10 Cts entre las tandas de reacción ejecutadas en la presencia o en la ausencia de la enzima RT. Ambos testigos contienen menos que 1 molécula de ADN en 1.000 moléculas de ARN. Esto es aceptable para un uso como un testigo de ARN.

Estabilidad (reproducibilidad) de la determinación de los valores de Ct en una serie de diluciones de EQC

A lo largo de varios días y por diferentes operadores se analizaron unas series de diluciones de EQC (A y B) congeladas por medio de una cuantificación por q-RT-PCR. Los resultados de estos ensayos ($n = 6$) muestran un margen dinámico de 6-7 logs. Los repetidos experimentos indicaron una buena reproducibilidad con una pendiente promediada de -3,39 (para EQC-A) y de -3,33 (para EQC-B), una ordenada en el origen del eje de las Y de 42,56 (para EQC-A) y 41,51 (para EQC-B) y una correlación de 0,999 de los puntos de datos para ambos EQC-A y EQC-B. Para la EQC-A, 5/6 tandas tenían un margen lineal de 7 logs. El valor medio de Ct de la dilución más baja ($n = 6$) era de 11,98511 (desviación típica 0,484211) y el de la dilución más alta era de 35,90961 (desviación típica 0,988846) ($n = 5$, para la tanda 5 no se midió la dilución más alta). Para la EQC-B 4/6 tandas solamente tenían un margen lineal de 6 logs. El valor medio de Ct de la dilución más baja ($n = 6$) era de 10,98107 (desviación típica 0,569094) y el de la dilución común más alta ($n = 6$) era de 30,8342 (desviación típica 0,657034).

Interpretación de la curva patrón, un ejemplo

En total se trataron 4 muestras de NPW y una muestra de esputo. Para ambos experimentos también se tomaron conjuntamente los testigos de las cuantificaciones externas EQC-A y EQC-B. Dos ajustes se ensayaron para investigar cuál era el mejor modo de interpretación para las curvas patrones (es decir, cuál permitiría calcular "el valor 1 de Ct" de una muestra en un experimento de acuerdo con la curva patrón 1, y "el valor 2 de Ct" de la misma muestra en un segundo experimento de acuerdo con la curva patrón 2 de tal manera que ambos valores de Ct estuviesen más próximos uno de otro): ¿ajustar el idéntico umbral para todos los experimentos o ajustar la idéntica ordenada en el origen del eje de las Y para todos los experimentos?

En un primer ajuste, el umbral de las curvas patrones en ambos experimentos se ajustó en 0,1. Como se puede observar, ninguna de las mediciones se desvió por más de 1 Ct. La media de las diferencias era de 0,56 Ct con una desviación típica de 0,39.

En otro ajuste, se intentó reducir al mínimo la diferencia de las curvas patrones concernientes a la ordenada en el origen del eje de las Y. Como tal, el umbral del experimento de repetición se modificó para hacer que la ordenada en el origen del eje de las Y de la segunda curva patrón de EQC-A se moviese más próxima a 42,43 (42,428). Con este ajuste, una medición difería en más que 1 Ct (NPW 5: 1,04). El promedio de las diferencias, sin embargo, era solamente de 0,47 con una desviación típica de 0,43.

CONCLUSIÓN

Dos vectores se construyeron y secuenciaron. Ambos de ellos contenían una parte del genoma de RSV (RSV-A 1.004 pb y RSV-B 1.399 pb). Los transcritos purificados tratados con DNase se analizaron en la presencia o en la ausencia de la enzima RT en un ensayo de cuantificación por PCR en tiempo real. Esto indicó que para ambas EQCs, se obtuvo un idóneo transcrito testigo de ARN que contenía menos que 1 molécula de ADN en 1.000 moléculas de ARN.

Unos experimentos repetidos indicaron que las series de diluciones de EQC suministraron unos resultados estables y reproducibles a lo largo de diferentes días y diferentes operadores con un margen dinámico de 6 a 7 logs.

Las secuencias de pEQC-A (clon 6) y de pEQC-B (clon 3) respectivamente se representan más abajo.

Secuencia de pEQC-A: (SeqID No. 17)

(**Letras negras** = una secuencia de cebador; subrayadas = una secuencia de sonda)

TGCACTGGCCAGGGGATCACCATCCGTCGCCCCGGCGTGTCAATAATATCACTCTGTACATCCACAAAC
 AGACGATAACGGCTCTCTCTTTTATAGGTGTAAACCTTAAACTGCCGTACGTATAGGCTGCGCAACTGTT
 GGGAAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCG
 ATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTCCAGTCACGACGTTGTA AACGACGGCCAGTGAATTGTAATAC

GACTCACTATAGGGCGAATTGAATTTAGCGGCCGCGAATTCGCCCTTAATCAAAATAAACTCTGGGGCAA
ATAACAATGGAGTTGCCAATCCTCAAAGCAAATGCAATTACCACAATCCTCGCTGCAGTCACATTTTGTCT
TTGCTTCTAGTCAAAACATCACTGAAGAATTTTATCAATCAACATGCAGTGCAGTTAGCAAAGGCTATCT
TAGTGCTCTAAGAACTGGTTGGTATACTAGTGTATAAATATAGAATTAAGTAATATCAAGGAAAATAAG
TGTAATGGAACAGATGCTAAGGTAATAATGATAAACCAAGAATTAGATAAATAAAAAATGCTGTAAACAG
AATTGCAGTTGCTCATGCAAAGCACAACAGCAGCAAACAATCGAGCCAGAAGAGAACTACCAAGGTTTAT
GAATTATACACTCAACAATACCAAAAAACCAATGTAACATTAAGCAAGAAAAGGAAAAGAAGATTTCTT
GGTTTTTTGTTAGGTGTTGGATCTGCAATCGCCAGTGGCATTGCTGTATCTAAGGTCCGCACTTAGAAG
GAGAAGTGAACAAGATCAAAAGTGTCTACTATCCACAAACAAGGCCGTAGTCAGCTTATCAAAATGGAGT
TAGTGCTTTAACAGCAAAGTGTAGACCTCAAAAATATATAGATAAACAATTGTTACCTATTGTGAAT
AAGCAAAGCTGCAGAATATCAAAATATAGAAACTGTGATAGAGTTCCAACAAAAGAACAACAGACTACTAG
AGATTACCAGGGAATTTAGTGTAAATGCAGGTGTAACCTACACCTGTAAGCACTTACATGTTAACTAATAG
TGAATTATTGTCAATTAATCAATGATATGCCATAAACAATGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAACAATGTT
CAAATAGTTAGACAGCAAAGTTACTCTATCATGTCCATAATAAAGAGGAAGTCTTAGCATATGTAGTAC
AATTACCACTATATGGTGTGATAGATACACCTTGTGGAAATTACACACATCCCCTCTATGTACAACCAA
CAAGGGCGAATTCGTTTAAACCTGCAGGACTAGTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTCTGAGCTTGGCGTAAT
CATGGTCATAGCTGTTTCCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCGGAAG
CATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATGCGTTGCGCTCAC TGCCC
GCTTTCAGTTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTT
TGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTCGCTCGGTCGTTCCGCTGCGGCGAGC
GGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATG
TGAGCAAAAGGCCAGCAAAGCCAGGAACCGTAAAAAGCCGCTTGC TGCGTTTTTCCATAGGC TCC
GCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAG
ATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCGGCTTACCGGATAC
CTGTCGCCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGG
TGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTAGCCCGACCGCTGCGCCTTATC
CGGTAACCTATCGTCTTGTAGTCCAACCCGGTAAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAAC
AGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTC TTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACA
CTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTC
TTGATCCGGCAAACAACCCAGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGA
AAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTCAC
GTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAG
TTTTAAATCAATCTAAAGTATATATAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCA
CCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGTTTCATCCATAGTTGCC T GACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGA
TACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGA
TTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAGTGGTCTGCAAC TTTATCCGCCCTCC
ATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGGCAACGTTG
TTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATT CAGCTCCGGTCCCA
ACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATC
GTTGTGAGAAGTAAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTTCTTACTG

TCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTAT
 GCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACCTTTAAAA
 GTGCTCATCATTGAAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTT
 CGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGC
 AAAAAACGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTC
 TTCCTTTTTCAATATATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTA
 TTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTCCACCTGTATGCGGTGTGAA
 ATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGAAATGTAAGCGTTAATAATTCAGAAGAACT
 CGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGCGATACCGTAAAGCACGAGGAAGCG
 GTCAGCCATTTCGCCCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCTGATAGCGGTCC
 GCCACACCAGCCGGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCATGATATTCGGCAAGC
 AGGCATCGCCATGGGTACGACGAGATCCTCGCCGTCGGGCATGCTCGCCTTGAGCCTGGCGAACAGTTC
 GGCTGGCGGAGCCCTGATGCTCTTCGTCCAGATCATCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATCCGAGTA
 CGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTTGGTGGTCAATGGGCAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGCAGCC
 GCCGATTCGCATCAGCCATGATGGATACTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCCTGCC
 CGGCACTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAGGA
 ACGCCCGTCGTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCTCGTCTTGCAAGTTCATTACGGGCACCGGACAGGT
 CGGTCTTGACAAAAAGAACCGGGCGCCCTGCGCTGACAGCCGGAACACGGCGGCATCAGAGCAGCCGAT
 TGTCTGTTGTGCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACCCAAGCGGCCGAGAACCTGCGTGCAATCCA
 TCTTGTCAATCATGCGAAACGATCCTCATCTGTCTCTTGATCAGAGCTTGATCCCTGCGCCATCAGA
 TCCTTGCGGGCGAGAAAGCCATCCAGTTTACTTTGCAGGGCTTCCCAACCTTACCAGAGGGCGCCCCAGC
 TGGCAATTCGGTTTCGCTTGGCTGCCATAAAACCGCCAGTCTAGCTATCGCCATGTAAGCCCACTGCAA
 GCTACCTGCTTTCTCTTTGCGCTTGGTTCCTTGTCCAGATAGCCAGTAGCTGACATTCATCCGGG
 GTCAGACCGTTTTCTGCGACTGGCTTTCTACGTGAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCT
 CATGCCTGACATTTATATCCCCAGAACATCAGGTTAATGGCGTTTTTGTATGTCATTTTCGCGGTGGCTG
 AGATCAGCCACTTCTTCCCCGATAACGGAGACCGGCACACTGGCCATATCGGTGGTTCATCATGCGCCAGC
 TTTATCCCCGATATGCACCACCGGTAAGTTCACGGGAGACTTTATCTGACAGCAGACG

Secuencia de pEQC-B: (SeqID No. 18)

(**Letras negritas** = una secuencia de cebador; subrayadas = una secuencia de sonda)

TGCACTGGCCAGGGGATCACCATCCGTCGCCCCGGCGTCAATAATATCACTCTGTACATCCACAAAC
 AGACGATAACGGCTCTCTCTTTTATAGGTGTAACCTTAAACTGCCGTACGTATAGGCTGCGCAACTGTT
 GGGAAAGGGCGATCGGTGCGGGCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCG
 ATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTACGACGTTGTAACGACGGCCAGTGAATTGTAATAC
 GACTCACTATAGGGCGAATTGAATTTAGCGGCCGGAATTCGCCCTTATATTTATCAATCATGGCGGGTT
 TCTAGAATGTATTGCCATTAAGCCTACAAAACACACTCCTATAATATACAAATATGACCTCAACCCGTAA
 ATTCCAACAAAAACTAACCCATCCAACTAAGCTATTCCTTAAATAACAGTGCTCAACAGTTAAGAAGG
 GGCTAATCCATTTTAGTAATTAATAAAAGGTAAGCCAATAACATAAATTTGGGGCAAATACAAAGATG
 GCTCTTAGCAAAGTCAAGTTAATGATACATTAATAAGGATCAGCTGCTGTCATCTAGCAAATACACTA
 TTCAACGTAGTACAGGAGATAATATTGACTCCCAATTATGATGTGCAAAAACTTAAACAACTATG

TGGTATGCTATTAATCACTGAAGATGCAAATCATAAATTCACAGGATTAATAGGTATGTTATATGCTATG
TCCAGGTTAGGAAGGGAAGACACTATAAAGATACTTAAAGATGCTGGATATCATGTTAAAGCTAATGGAG
TAGATATAACAACATATCGTCAAGATATAAATGGAAAGGAAATGAAATTCGAAGTATTAACATTATCAAG
CTTGACATCAGAAATACAAGTCAATATTGAGATAGAATCTAGAAAGTCCACAAAAAATGCTAAAAGAG
ATGGGAGAAGTGGCTCCAGAATATAGGCATGATTCCTCCAGACTGTGGGATGATAA**ACTGTGTATAGCTG**
CACTTGTAAATAACCAAATTAGCAGCAGGAGATAGATCAGGTCTTACAGCAGTAATTAGGAGGGCAAACAA
TGCTTAAAAAACGAAATAAAACGCTACAAGGGCCTCATACCAAAGGATATAGCTAACAGTTTTTATGAA
GTGTTTGAAAAACACCCTCATCTTATAGATGTTTTGTGCACTTTGGCATTGCACAATCATCCACAAGAG
GGGGTAGTAGAGTTGAAGGAATCTTTGCGAGGATTATTTATGAATGCCTATGGTTCAGGGCAAGTAATGCT
AAGATGGGGAGTTTTAGCCAAATCTGTAAAAATATCATGCTAGGACATGCTAGTGTCCAGGCAGAAATG
GAGCAAGTTGTGGAAGTCTATGAGTATGCACAGAAGTTGGGAGGAGAAGCTGGATTCTACCATATATTGA
ACAATCCAAAAGCATCATTTGCTGTCAATTAACCTCAATTTCTCAAGTGTGGTCCTAGGCAATGC
AGCAGGTCTAGGCATAATGGGAGAGTATAGAGGTACACCAAGAAACCAGGATCTTTATGATGCAGCCAAA
GCATATGCAGAGCAACTCAAAGAAAATGGAGTAATAAACTACAGTGTATTAGACTTAACAGCAGAAGAAT
TGGAGGCCATAAAGCATCAACTCAACCCCAAAGAAGATGATGTAGAAAGGGCGAATTCGTTTTAAACCTGC
AGGACTAGTCCCTTTAGTGAGGGTTAATCTGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTG
AAATTGTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCC
TAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTGCT
GCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTC
CTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTA
ATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGCCCA
GGAACCGTAAAAAGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAA
TCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGC
TCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCCGATACTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAA
GCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTGTTCCGCTCCAAGCTGGG
CTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATCGTCTTGAGTCCAAC
CCGGTAAAGACAGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAG
GCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTG
CGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCT
GGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTT
TGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATT
ATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATAT
GAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCCTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTT
GTTTATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCC
CAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCC
GGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGG
AAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCAAGTTAATAGTTTGGCGAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGT
GTCACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCAATCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCC
CCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAG
TGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATCTCTTACTGTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTT

TGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCG
 GCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACCTTAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTT
 CGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCAA
 CTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCA
 AAAAAGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATATTGAAGCA
 TTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAATAAGGGGT
 TCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGTATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAA
 AATACCGCATCAGGAAATTGTAAGCGTTAATAATTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCGAT
 GCGTGCGAATCGGGAGCGGCGATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTCAGCCATTCGCCGCCAAGCTCT
 TCAGCAATATCAGGGTAGCCAACGCTATGTCTGATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGCCACAGTCGA
 TGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTACGACGAG
 ATCCTCGCCGTCGGGCATGCTCGCCTTGAGCCTGGCGAACAGTTCGGCTGGCGGAGCCCTGATGCTCT
 TCGTCCAGATCATCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCG
 CTTGGTGGTGAATGGGCAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGCAGCCGCCGATTGCATCAGCCATGATGGA
 TACTTTCGCGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCCTGCCCGGCACTTCGCCCAATAGCAGCCAG
 TCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAGGAACGCCGTCGTGGCCAGCCACGATA
 GCCGCGTGCCTCGCTTGCAGTTCATTCAGGGCACCGGACAGGTCGGTCTTGACAAAAAGAACCAGGCG
 CCCCTGCGCTGACAGCCGAACACGGCGGCATCAGAGCAGCCGATTGTCTGTTGTGCCAGTCATAGCCG
 AATAGCCTCTCCACCAAGCGGCCGGAGAACCTGCGTGCAATCCATCTTGTTCATCATGCGAAACGATC
 CTCATCCTGTCTCTTGATCAGAGCTTGATCCCTGCGCCATCAGATCCTTGCGGCGGAGAAAGCCATCCA
 GTTTACTTTGCAGGGCTTCCCAACCTTACCAGAGGGCGCCCGAGCTGGCAATTCCGGTTCGCTTGCTGTC
 CATAAAACCGCCAGTCTAGCTATCGCCATGTAAGCCCACTGCAAGCTACCTGCTTTCTTTGCGCTTG
 CGTTTTCCCTTGTCCAGATAGCCAGTAGCTGACATTCATCCGGGTGTCAGCACCGTTTTCTGCGGACTGGC
 TTTCTACGTGAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGCCTGACATTTATATCCCCAG
 AACATCAGGTTAATGGCGTTTTTGATGTCATTTTCGCGGTGGCTGAGATCAGCCACTTCTTCCCGATAA
 CGGAGACCGGCACACTGGCCATATCGGTGGTCATCATGCGCCAGCTTTCATCCCCGATATGCACCACCGG
 GTAAAGTTCACGGGAGACTTTATCTGACAGCAGACG

Un proceso similar al de para la EQC más arriba descrita se llevó a cabo para la construcción del testigo de control de la extracción interna (IEC) para dicho ensayo de q-RT PCR para los RSV.

Construcción del testigo de control de la extracción interna (IEC) para el ensayo de q-RT PCR para los RSV

5 Con el fin de vigilar la eficiencia de extracción de ARN se construyeron unos testigos de control de la extracción interna (IEC) EasyMAG (de BioMérieux, Boxtel, Holanda)

Esto incluía el diseño de las siguientes construcciones plasmídicas que contenían:

- 10 Una secuencia de cebador idéntica a la de los cebadores seleccionados para RSV-A con una secuencia aleatoria del tipo de 'dentro de - entre'. Una sonda Taqman que contiene el tinte fluorescente TET o FAM detectará a esta secuencia. Esta construcción artificial es marcada como testigo de control de la extracción interna de RSV-A (pIEC-A)
- 15 Una secuencia de cebador idéntica a la de los cebadores seleccionados para RSV-A con una secuencia aleatoria del tipo de 'dentro de - entre'. Una sonda Taqman que contiene el tinte fluorescente TET o FAM detectará a esta secuencia. Esta construcción artificial es marcada como testigo de control de la extracción interna de RSV-B (pIEC-B)

Cebadores y sondas

20 Los cebadores encargados para generar las secuencias que han de ser clonadas en pIEC-A (RSV-A-Fgen-EC-FW y RSV-A-Fgen-EC-RV) y en pIEC-B (RSV-B-Ngen-EC-FW y RSV-B-Ngen-EC-RV) se describen más abajo y cubren una secuencia de cebador y la mitad de la secuencia de sonda específica. Una representación esquemática de las secuencias de RSV y de los/las correspondientes cebadores y sondas se puede encontrar en la Fig. 5. Los cebadores se solapan parcialmente, lo cual les permite reanillarse durante una Amplificación por PCR (véase más abajo).

Oligonucleótido	Secuencia	
RSV-A-Fgen-EC-FW	5'-CTGTGATAGA GTTCCAACAA AAGAACAATG CGTATGGATT GGT -3'	SeqID No. 19
RSV-A-Fgen-EC-RV	5'-AGTTACACCT GCATTAACAC TAAATTCCT AATGACCAAT CCA-3'	SeqID No. 20
RSV-B-Ngen-EC-FW	5'-GGCTCCAGAA TATAGGCATG ATTCTCTACC GTA CTCTAGC C-3'	SeqID No. 21
RSV-B-Ngen-EC-RV	5'-TGGTTATTAC AAGTGCTGCT ATACACAGTA TTAGGCTAGA G-3'	SeqID No. 22

Amplificación y clonación

Las secuencias de cebadores complementarias (pIEC-A (RSV-A-Fgen-EC-FW y RSV-A-Fgen-EC-RV) y pIEC-B (RSV-B-Ngen-EC-FW y RSV-B-Ngen-EC-RV) se sometieron a una reacción PCR formando un corto trozo de ADN de doble hebra. Las mezclas y condiciones para la PCR se especifican más abajo:

5 **RSV-A**

		Nº de muestras		
Componente	Vol (µl)	8		
Agua libre de Rnasa	39,17	352,53		µl
Tampón para PCR (MgCl ₂ 15 mM)	5	45		µl
dNTPs	0,4	3,6		µl
RSV-A Fgen-EC-FW	0,5	4,5		µl
RSV-A Fgen-EC-RV	0,5	4,5		µl
PCR de Expand™HF	0,43	3,87		µl
Volumen total	46	414		µl

RSV-B

		Nº de muestras		
Componente	Vol (µl)	8		
Agua libre de Rnasa	39,17	352,53		µl
Tampón para PCR (MgCl ₂ 15 mM)	5	45		µl
dNTPs	0,4	3,6		µl
RSV-B Ngen-EC-FW	0,5	4,5		µl
RSV-B Ngen-EC-RV	0,5	4,5		µl
PCR de Expand™HF	0,43	3,87		µl
Volumen total	46	414		µl

El programa de PCR que se usó era de 94 °C durante 2 minutos seguido por 35 ciclos de 94 °C durante 15 segundos, de 54 °C-62 °C (gradiente, ejecutado en el ciclador 857) durante 30 segundos y de 68 °C durante 30 segundos. Una etapa final se ejecutó a 68 °C durante 10 minutos y concluyó con una retención final a 4 °C.

Clonación en TOPO-TA

- 5 Los fragmentos de PCR obtenidas fueron clonados usando el estuche de clonación TOPO TA (de Invitrogen, Merelbeke, Bélgica) siguiendo las instrucciones del fabricante. Dicho brevemente, 4 µl del producto de la PCR (sin purificación) se mezclaron con 1 µl de una solución de una sal y 1 µl de un vector. La mezcla de reacción de ligación se transformó en el seno de células *E.coli* TOP10 químicamente competentes siguiendo las instrucciones del fabricante.
- 10 Después de haber crecido los cultivos de *E.coli* durante una noche, 10 colonias por construcción artificial (pEQC-A y pEQC-B) fueron transferidas a un medio líquido de LB, se dejaron crecer durante una noche y se ejecutó una miniprep (de Qiagen, Hilden, Alemania) (en un volumen total de 50 µl de ADN plasmídico, no se midió la concentración).

Secuenciación

- 15 En total 0,75 µl del ADN de miniprep generado se sometieron a una secuenciación. La secuenciación se hizo usando el estuche de secuenciación en ciclo Big Dye Terminator (BDT) Cycle Sequencing Kit v3,1 (Nº de catálogo. 4337457, Applied Biosystems, CA, EE.UU.). La secuenciación de la mezcla con un volumen final de 5,75 microlitros en cada pocillo fue como sigue:

Componente	Volumen (µl)
BDT	0,25
Agua	1,50
Volumen total	5,00
Amplicón	0,75

BDT = Big Dye Terminator

- 20 Las tandas de reacción de secuenciación se ejecutaron usando el conjunto de cebadores "T3" (5'-ATTAACCCTCACTAAAGGA-3') (SeqID No. 15) y "T7" (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') (SeqID No. 16) que están situados en el vector TOPO-TA. La PCR de secuenciación se hizo usando el ciclador 9800 Fast Thermal Cycler (de Applied Biosystems (ABI), Nº de catálogo 4356204, CA, EE.UU.). Las condiciones de la PCR fueron de 96 °C durante 5 segundos, de 50 °C durante 5 segundos, de 60 °C durante 1 minuto y 15 segundos y esto durante 25 ciclos en total seguido por una retención final a 12 °C.

Transcripción de ARN in Vitro

- 30 Un clon correcto de cada construcción artificial de IEC se linealizó usando la enzima de restricción ApaI (Figura. 6). La digestión con la enzima de restricción (ApaI) se realizó a 37 °C durante 3 horas usando el tampón 4 de enzima de digestión por restricción y BSA. Después de la restricción, las tandas de reacción fueron purificadas. A la mezcla de digestión se le añadieron 1/20 volúmenes de EDTA 0,5 M (1 µl), 1/10 volúmenes de NaOAc (2 µl) y 2 volúmenes de EtOH (40 µl). La mezcla se dispuso a -20 °C durante 15 minutos como mínimo, y luego se centrifugó durante 15 minutos a una velocidad máxima. El material sobrenadante se desechó y el sedimento se disolvió en 50 µl del tampón de TE. Estos moldes purificados fueron luego transcritos usando el estuche MEGAscript™ T7 Kit (de Ambion, Nº de catálogo 1354, Texas, EE.UU.) Las mezclas de reacción fueron incubadas a 37 °C durante 4 horas. Después de la incubación a 37 °C las mezclas de reacción fueron llevadas a 4 °C. Se predijo que la longitud total del ARN transcrito era de 1.100 nucleótidos.

Retirada del ADN

- 40 Las mezclas de transcripción fueron tratadas con TURBO DNase™ (se añadieron 2 µl a la mezcla de transcripción, Ambion, Nº de catálogo 2238, Texas, EE.UU.). El tratamiento con DNase perduró durante 1 hora a 37 °C en un volumen final de 100 µl. El ARN se purificó por medio de una extracción del ARN en el EasyMAG (de BioMérieux) eluyendo en 100 µl.

Cuantificación del IEC en tiempo real

Los transcritos purificados se diluyeron a 1/1.000 y se sometieron a una cuantificación por PCR en tiempo real o bien en la presencia o en la ausencia de la enzima RT. Las composiciones de las diversas mezclas se representan más abajo.

- 5 El programa de amplificación que se usó en el equipo de PCR en tiempo real ABI9700 HT era de 48 °C durante 30 minutos, de 95 °C durante 10 minutos seguido por 45 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y de 60 °C durante 1 minuto.

Volumen de reacción (µl)	25				
Detalle de la mezcla	Concentración			Volumen para (µl)	
	Unidad	Existencias	Final	1 muestra	X muestras
Agua libre de Rnasa				0,325	7,15
tARN de Levadura	ng/ml	10,000	120	0,300	6,60
2x Mezcla Master w/o UNGr	X	2,00	1,000	12,500	275,00
40X MultiScribe y Mezcla Inhibidora de Rnase	X	40,00	0,013	0,625	13,75
Sonda de IEC-B	µM	5,00	0,100	0,500	11,00
Cebador 1	µM	20,00	0,300	0,375	8,25
Cebador 2	µM	20,00	0,300	0,375	8,25
Volumen total de la mezcla (µl)					330,00
Volumen de la mezcla / Tubo (µl)				15,00	
ARN total				10,00	

Tratamiento de las muestras, un ejemplo

- 10 En total se trataron 5 muestras clínicas. Cada una de las muestras clínicas se diluyó en PBS/1 % de DTT hasta llegar a un volumen final de 2,2 ml. Esta mezcla se trató en el AFA (de Covaris) durante 60 segundos antes de la adición de 4 ml del tampón de lisis (EasyMAG, de BioMérieux). A partir de estos 6,2 ml por muestra, 3 ml se trataron en el EasyMAG (de BioMérieux) y el ARN se eluyó en 110 µl de los que 10 µl se trataron en la q-RT-PCR en duplicado. El experimento se repitió una vez comenzando a partir de la extracción con los restantes 3 ml.

15 Reparto en partes alícuotas y almacenamiento de IEC

- 15 En total 24 muestras negativas (PBS, 10 % de DTT, volumen final 1 ml) se lisaron con 2 ml del Tampón de lisis (de BioMérieux) y se incubaron durante 10 minutos. Tres partes alícuotas de IEC-B (110 µl) se descongelaron y se diluyeron con el tampón 3 (440 µl, de BioMérieux). En total se añadieron 550 µl de perlas magnéticas de sílice (de BioMérieux) a esta dilución de IEC y las tres mezclas se agruparon para obtener un volumen final de 3.300 µl de una mezcla de IEC y perlas magnéticas de sílice. Esta mezcla se diluyó tal como se ha descrito para la adición al IEC del EasyQ (de BioMérieux), es decir, 125 µl de la mezcla se dispensaron en 24 pocillos (usando el protocolo "2" previamente programado en la pipeta dispensadora automática de BioMérieux) y de esta mezcla total, se añadieron 100 µl a cada una de las muestras, usando el protocolo "3" previamente programado en la pipeta dispensadora automática BioMérieux. Los IEC se extrajeron adicionalmente en el EasyMAG y se eluyeron en 110 µl. A partir de esta mezcla, 10 µl se sometieron a una amplificación por q-RT-PCR.

**Resultados
PCR**

- 30 El amplicón para la construcción artificial del testigo de control de la extracción interna de RSV-A tenía un tamaño de 77 pares de bases mientras que el amplicón para la construcción artificial del testigo de control de la extracción interna de RSV-B tenía un tamaño de 74 pares de bases. Estos fragmentos amplificados por PCR se ligaron en un vector TOPO-TA y se transformaron en el seno de *E. coli* competentes. Los transformantes se dejaron crecer durante una noche sobre unas placas de LB sólido/ampicilina. En total se transfirieron 10 colonias a un medio LB líquido/Ampicilina y de nuevo se dejaron crecer durante una noche. Se preparó un miniprep (de Qiagen, Hilden, Alemania) a partir de estos cultivos y el resultante ADN se sometió a una secuenciación.

Secuenciación

Como se esperaba, no todos los fragmentos de PCR se ligaron en la misma dirección en el vector TOPO-TA. Los fragmentos de PCR del testigo de control de la extracción interna de RSV-A en los clones 5, 8 y 10 se ligaron en la orientación correcta. Este fue también el caso para los clones 1, 3, 7 y 8 para el testigo de control de la extracción interna de RSV-B.

Transcripción in vitro

El clon 5 (pIEC-A) y el clon 1 (pIEC-B) se sometieron a una digestión por restricción usando ApaI y se purificaron tal como se ha descrito más arriba. Las construcciones artificiales linealizadas y purificadas se sometieron a una transcripción in vitro (usando el estuche MEGashortscript™ T7 Kit (de Ambion)). El ADN residual se retiró usando la TURBO DNase™ (de Ambion). Los transcritos se purificaron por medio de una extracción del ARN en el EasyMAG (de BioMérieux) que se ha descrito más arriba.

Resultados de la PCR en tiempo real

Los transcritos puros se diluyeron a 1/1.000 y se sometieron a una reacción de cuantificación por PCR en tiempo real con y sin la enzima RT para determinar el contenido de ADN residual de los transcritos. Para el IEC-A, la señal generada en la presencia de transcriptasa inversa (RT) emergió a Ct 8 mientras que en la ausencia de la enzima RT la señal solamente emergió a Ct 30-31. Para el IEC-B esto sucedió respectivamente a Ct 8 (+ RT) y a Ct 30 (- RT). Por lo tanto ambos IECs tenían una diferencia de 22 ciclos entre la señal con y sin RT. Esto corresponde a una diferencia de más que 6 logs ($22/3,3 = 6,6$), indicando 1 molécula de ADN residual para 10^6 moléculas de ARN. Esto es aceptable para el uso como un testigo de ARN. El ARN de IEC se diluyó a 1.000 000 veces (valor de Ct estimado 27,4 para el IEC-A y 27,6 para el IEC-B), se distribuyó en partes alícuotas de 90 µl y se almacenó a - 80 °C.

Análisis de Muestras Clínicas, un ejemplo

En este experimento, se trataron cinco muestras clínicas. Puesto que todos los ensayos se realizaron en monoplex, solamente se necesitó un IEC.

Curvas patrones

En las curvas patrones para la EQC-A la pendiente era de -3,34, con una ordenada en el origen del eje de las Y de 42,43 y un margen lineal de 7 logs.

Para la EQC-B la pendiente era de -3,34, con una ordenada en el origen del eje de las Y de 41,23 y un margen lineal de 7 logs.

IEC

Si se mirasen las señales IEC se podría observar que todas las señales emergían por encima del ruido en el mismo momento, alrededor de Ct 28. Este experimento se repitió una vez comenzando a partir de la extracción (por lo tanto una adición independiente de IEC-B a las muestras durante esta extracción), dando como resultado unos comparables valores. Todos los valores se combinaron y representaron gráficamente. El promedio de todas las mediciones del IEC-B era de 28,09, con una desviación típica de 0,36.

Análisis de las Muestras

3 de 5 muestras produjeron una señal para RSV-A: un esputo en 17,38 y 17,68, el "NPW 4" en 21,74 y 22,15 y el "NPW 6" en 24,61 y 25,60, No se detectó ninguna señal para el NPW 3 y el NPW 5 en la placa de análisis de RSV-A. Estas muestras producen una señal para RSV-B: el "NPW 3" en 21,63 y 22,15 y el "NPW 5" el 25,49 y 25,58.

CONCLUSIÓN

Dos vectores se construyeron y secuenciaron. Ambos de ellos contenían una secuencia única que cubría los cebadores específicos o bien para los RSV-A o para los RSV-B y una secuencia única entre las dos secuencias de cebadores que pueden reanillarse con una única sonda fluorescente. Los transcritos tratados con DNase se analizaron en la presencia o en la ausencia de la enzima RT en un ensayo de cuantificación por PCR en tiempo real. Esto indicó que para ambos IECs se obtuvo un idóneo transcrito de control de ARN que contenía menos que 1 molécula de ADN en 1.000.000 de moléculas ARN, cubriendo la diferencia de 2 log especificada como un criterio de aceptación

El IEC-B se diluyó a 1.000.000 de veces y se añadió a unas muestras clínicas durante su extracción en el EasyMAG. Este proceso se repitió durante un segundo análisis independiente de las muestras. Este experimento reveló unas señales comparables que emergían en alrededor de Ct 28,09, con una desviación típica de 0,36, independientemente del ARN de RSV que estaba presente en la muestra (subtipo A o B).

El IEC-B se repartió en partes alícuotas y se almacenó en partes alícuotas de 110 µl en -80 °C. El repetido ensayo de estas partes alícuotas reveló un valor de Ct de 26,32 cuando el umbral se había ajustado a 0,02.

ES 2 559 812 T3

Las secuencias de pIEC-A (clon 5) y pIEC-B (clon 1) respectivamente se representan más abajo:

Secuencia de pIEC-A (SeqID No. 23):

(**Letras negritas** = una secuencia de cebador; subrayadas = una secuencia de sonda)

TGCAC TGCCAGGGGATCACCATCCGTCGCCCGGCGTGTCAATAATATCACTCTGTACATCCACAAAC
AGACGATAACGGCTCTCTCTTTTATAGGTGTAAACCTTAAACTGCCGTACGTATAGGCTGCGCAACTGTT
GGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCG
ATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATAC
GACTCACTATAGGGCGAATTGAATTTAGCGGCCGGAATTCGCCCTTCTGTGATAGAGTTCCAACAAAAG
AACAATGCGTATGGATGGTCATTAGGGAATTTAGTGTTAATGCAGGTGTAACTAAGGGCGAATTCGTTT
AAACCTGCAGGACTAGTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTCTGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTT
5 CCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCT

GGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAA
 CCTGTGCTGCCAGTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCT
 TCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGGCAGCGGTATCAGCTCACTCAA
 AGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCA
 AAAGCCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGCGCTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCAT
 CACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCC
 CTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCC
 TTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGGTAGGTCGTTCCGCTCC
 AAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTAGCCCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACATATCGTCTTG
 AGTCCAAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGAACAGGATTAGCAGAGCGAG
 GTATGTAGGCGGTGTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTT
 GGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGA AAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAA
 CCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGA
 AGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTC
 ATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAA
 GTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTG
 TCTATTTGCTTTCATCCATAGTTGCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCA
 TCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACC
 AGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTG
 TTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTGCCAGTTAATAGTTTGC GCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGC
 ATCGTGGTGTACGCTCGTCTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTA
 CATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTT
 GGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGA
 TGCTTTTCTGTGACTGGTGTAGTACTCAACCAAGTCATTTCTGAGAATAGTGTATGCGGGCAGCGAGTTGCT
 CTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGTCTATCATTGGAAA
 ACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGT
 GCACCCAACGTATCTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAA
 ATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTTCAATATTA
 TTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAA
 ATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGTATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGT
 AAGGAGAAAATACCGCATCAGGAAATTGTAAGCGTTAATAATTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAG
 AAGGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTTCAGCCCATTCGCCGC
 CAAGCTCTTCAGCAATATCAGGGTAGCCAACGCTATGTCTGATAGCGGTCCGCCACCCAGCCGCC
 ACAGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTC
 ACGACGAGATCCTCGCCGTGGGCATGCTCGCTTGAGCCTGGCGAACAGTTCGGCTGGCGCGAGCCCT
 GATGCTCTTCGTCCAGATCATCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGTTCGATGCG
 ATGTTTCGCTTGGTGGTGAATGGGCAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGCAGCCGCCGATTCATCAGCC
 ATGATGGATACTTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCCTGCCCGGCACTTCGCCCAATA
 GCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAAGTACAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAGGAACGCCCGTCTGGCCAG
 CCACGATAGCCGCGCTGCCTCGTCTTGAGTTCATTCAGGGCACCGGACAGGTCGGTCTTGACAAAAAGA

ACCGGGCGCCCTGCGCTGACAGCCGGAACACGGCGGCATCAGAGCAGCCGATTGTCTGTTGTGCCAGT
 CATAGCCGAATAGCCTCTCCACCAAGCGGCCGAGAACCTGCGTGCAATCCATCTTGTTCATCATGCG
 AAACGATCCTCATCTGTCTCTTGATCAGAGCTTGATCCCCGCGCCATCAGATCCTTGCGGGCGAGAAA
 GCCATCCAGTTTACTTTGCAGGGCTTCCCAACCTTACCAGAGGGCGCCCCAGCTGGCAATTCCGGTTGCG
 TTGCTGTCCATAAAACCGCCAGTCTAGCTATCGCCATGTAAGCCACTGCAAGCTACCTGCTTTCTCTT
 TCGCTTGCCTTTCCCTTGTCCAGATAGCCAGTAGCTGACATTCATCCGGGGTCAGCACCGTTTCTGCG
 GGACTGGCTTTCTACGTGAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGCCTGACATTTATA
 TTCCCCAGAACATCAGGTTAATGGCGTTTTTGTATGTCATTTTCGCGGTGGCTGAGATCAGCCACTTCTTC
 CCCGATAACGGAGACCGGCACACTGGCCATATCGGTGGTCATCATGCGCCAGCTTTCATCCCCGATATGC
 ACCACCGGGTAAAGTTCACGGGAGACTTTATCTGACAGCAGACG

Secuencia de pIEC-B (SeqID No. 24):

(**Letras negras** = una secuencia de cebador; Subrayadas = una secuencia de sonda)

TGCAC TGGCCAGGGGATCACCATCCGTGCCCCGGCGTGTCAATAATATCACTCTGTACATCCACAAC
 AGACGATAACGGCTCTCTCTTTTATAGGTGTAAACCTTAAACTGCCGTACGTATAGGCTGCGCAACTGTT
 GGAAGGGCGATCGGTGCGGGCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCG
 ATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATAC
 GACTCACTATAGGGCGAATTGAATTTAGCGGCCGCGAATTCGCCCTTGGCTCCAGAATATAGGCATGATT
CTCTACCGTACTCTAGCCTAATACTGTGTATAGCAGCACTTGTAAATAACCAAGGGCGAATTCGTTTTAAA
 CCTGCAGGACTAGTCCCTTTAGTGAGGGTAAATCTGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCCT
 GTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGG
 GTGCCATAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCT
 GTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGCTATTGGGCGCTCTCC
 GCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGG
 CGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGAGGAAAGAATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAA
 GCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAC
 AAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTG
 GAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCCGACCTGCGGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTC
 GGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAG
 CTGGGCTGTGTGCAGAACCCCCGTTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATCGTCTTGAGT
 CCAACCCGGTAAGACAGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTA
 TGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGT
 ATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACCA
 CCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGA
 TCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCAATG
 AGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATAAAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTA
 TATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCT
 ATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCTTACTCCCGCTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCT
 GGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGGAGACCCACGCTCACCAGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGC
 CAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTG

CCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATC
 GTGGTGTACGCTCGTTCGTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACAT
 GATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGC
 CGCAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTTCATGCCATCCGTAAGATGC
 TTTTCTGTGACTGGTACTCAACCAAGTCATTTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTT
 GCCCCGGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTAAAAAGTGTCATCATTGGAAAAACG
 TTCTTCGGGGCAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCA
 CCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATG
 CCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTTATTG
 AAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGATTTAGAAAAATAACAAATA
 GGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGTATGCGGTGTGAATAACCGCACAGATGCGTAAG
 GAGAAAATACCGCATCAGGAAATTGTAAGCGTTAATAATTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAG
 GCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGCGATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTCAGCCCATTGCGCCCAA
 GCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCTGATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGGCCACA
 GTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTACAG
 ACAGATCCTCGCCGTCGGGCATGCTCGCCTTGAGCCTGGCGAACAGTTCGGCTGGCGCGAGCCCTGAT
 GCTCTTCGTCCAGATCATCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATG
 TTTGCTTGGTGGTGAATGGGCAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGCAGCCCGCGCATTCATCAGCCATG
 ATGGATACTTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCTGCCCGGCACTTCGCCCAATAGCA
 GCCAGTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAGGAACGCCCGTCTGTTGGCCAGCCA
 CGATAGCCGCGCTGCCTCGTCTTGCAAGTTCATTCAGGGCACCGGACAGGTCGGTCTTGACAAAAGAACC
 GGGCGCCCTGCGCTGACAGCCGGAACACGGCGGCATCAGAGCAGCCGATTGCTGTTGTGCCCAGTCAT
 AGCCGAATAGCCTCTCCACCCAAGCGCCGGAGAACCTGCGTGAATCCATCTTGTTCATCATCGCGAAA
 CGATCCTCATCCTGTCTTTGATCAGAGCTTGATCCCTGCGCCATCAGATCCTTGGCGGCGAGAAAAGCC
 ATCCAGTTTACTTTGCAAGGCTTCCCAACCTTACCAGAGGGCGCCCCAGCTGGCAATTCCGGTTCGCTTG
 CTGTCCATAAAACCGCCAGTCTAGCTATCGCCATGTAAGCCACTGCAAGCTACCTGCTTTCTCTTTGC
 GCTTGCCTTTTCCCTTGTCAGATAGCCAGTAGCTGACATTCATCCGGGGTTCAGCACCGTTTCTGCGGA
 CTGGCTTTCTACGTGAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTATAATCTCATGCCTGACATTTATATTC
 CCCAGAACATCAGGTTAATGGCGTTTTTGTATGTCATTTTTCGCGGTGGCTGAGATCAGCCACTTCTCCCC
 GATAACGGAGACCGGCACACTGGCCATATCGGTGGTTCATGCGCCAGCTTTCATCCCCGATATGCACC
 ACCGGGTAAAGTTCACGGGAGACTTTATCTGACAGCAGACG

(B) Uso de MNAzimas para la cuantificación de unas cepas virales de RSV-A y RSV-B y unas secuencias de ácidos nucleicos testigos por intermedio de una PCR en tiempo real triplex

- 5 Un ensayo de PCR triplex, que usaba tres MNAzimas para facilitar una vigilancia en tiempo real, se desarrolló para la detección y la cuantificación simultáneas de (i) RSV-A (secuencias del gen F), (ii) RSV-B (secuencias del gen N) y (iii) una secuencia de un testigo de control de la extracción interna (IEC B). Los cebadores y las partzimas de RSV-A, que tenían como diana una región del gen F, se diseñaron para ser plenamente complementarios con la secuencia de RSV-A pero para contener varios desemparejamientos de bases en la correspondiente región del genoma de RSV-B. Similarmente, los cebadores y las partzimas, que tenían como diana una región en el gen N, se diseñaron para ser plenamente complementarios con la secuencia de RSV-B pero para contener varios desemparejamientos de bases en la correspondiente región del genoma de RSV-A.

1 Oligonucleótidos de partzimas para un ensayo de RT-PCR triplex

- 15 Múltiples dianas se pueden detectar simultáneamente en una reacción multiplexada que comprende múltiples MNAzimas únicas en su género. Cada MNAzima tiene unos brazos de sensor específicos para una diana y unos brazos de sustrato específicos para un único miembro de una serie de sustratos reporteros genéricos, cada uno de los cuales está marcado con un diferente fluoróforo.

En el siguiente ejemplo, se diseñaron dos MNAzimas para detectar dos cepas de RSV a partir de unas muestras clínicas con una tercera MNAzima diseñada para detectar una secuencia testigo sintética, que se aplicó a la muestra antes de la extracción de ácidos nucleicos.

5 Tabla 2

SEQ ID NO	Diana	Nombre de la Partzima	Secuencia de partzima enumerada en la dirección de 5' a 3' (P = grupo de fosfato)
25	RSVA	RSVAA5/2-P	CAGACTACTAGAGATTACCATACAACGAGAG GAAACCTT-P
26	RSVA	RSVAB6/2-P	TGCCCAGGGAGGCTAGCGGGAATTTAGTGTT AATGCA-P
27	RSVB	RSVBA5/3-P	AGACTGTGGGATGATAATACTACAACGAGGT TGTGCTG-P
28	RSVB	RSVBB6/3-P	CGGTTGGTGAGGCTAGCTGTGTATAGCTGCA CTTGTA-P
29	IEC B	IEC3A5/6-P	ACCTGCAGGACTAGTCCCTTTACAACGAGAG GCGTGAT-P
30	IEC B	IEC3B6/6-P	CTGGGAGGAAGGCTAGCTAGTGAGGGTTAAT TCTGAG-P

2 Substratos Reporteros

En este ejemplo se usaron tres diferentes substratos reporteros, cada uno de ellos marcado con un diferente fluoróforo. Las secuencias de los substratos se escriben más abajo de 5' a 3'. En el actual ejemplo, un primer substrato SubBi-2 se marcó por un extremo con un resto 6-FAM en el extremo 5' y un resto BHQ1 en el extremo 3' y se designó como SubBi-2-FB. El substrato SubBi-2-FB se usó para vigilar la acumulación de amplicones de RSVA. La disociación de SubBi-2-FB se vigiló a 516 nm con excitación a 492 nm. Un segundo substrato SubBi-3 se marcó por un extremo con un resto 6-JOE en el extremo 5' y un resto BHQ1 en el extremo 3' y se designó como SubBi-3-JB. El substrato SubBi-3-JB se usó para vigilar la amplificación de la región del RSVB y la disociación de SubBi-3-JB se vigiló a 555 nm con excitación a 535 nm. El tercer substrato SubBi-6 se marcó por un extremo con un resto Quasar 670 en el extremo 5' y un resto BHQ2 en el extremo 3' y se designó como SubBi-6-Q6B2. El substrato SubBi-6-Q6B2 se usó para vigilar la amplificación del testigo de control de la extracción interna (IEC B) y la disociación de SubBi-3-Q6B2 se vigiló a 665 nm con excitación a 635 nm. Las secuencias de los tres substratos se enumeran más abajo. Las bases en letras minúsculas representan un ARN y las bases en letras mayúsculas representan ADN. Se indican los restos en los extremos 5' y 3'.

30 Tabla 3

SEQ. ID No.	Secuencia de substrato enumerada en dirección de 5' a 3'	Nombre
31	(FAM)AAGGTTTCCTCguCCCTGGGCA(BHQ1)	SubBi-2-FB
32	(JOE)CAGCACAACCguCACCAACCG(BHQ1)	SubBi-3-JB
33	(Q670)ATCACGCCTCguTCCTCCCAG(BHQ2)	SubBi-6-Q6B2

25 3. Cebadores de PCR para la amplificación de las secuencias dianas

Los cebadores 5RSVA/3 y 3RSVA/3 se usaron para la amplificación de la secuencia del gen F de RSVA. Los cebadores 5RSVB/3 y 3RSVB/3 se usaron para amplificar la secuencia del gen N de RSVB. Los cebadores 5IECB/1 y 3IECA/3 se usaron para amplificar la secuencia del testigo de control de la extracción interna (IECB). Las secuencias de los cebadores de PCR de oligonucleótidos se enumeran más abajo.

30

Tabla 4

SEQ. ID No.	Secuencia de cebador enumerada en dirección de 5' a 3'	Nombre
34	GTGATAGAGTTCCAACAAAAGA	5RSVA/3
35	AAGTGCTTACAGGTGTAGTTA	3RSVA/3
36	GCTCCAGAATATAGGCATGAT	5RSVB/3
37	GATCTATCTCCTGCTGCTAAT	3RSVB/3
38	CTTGTAATAACCAAAGGGCGA	5IECB/1
39	GGAAACAGCTATGACCATGATT	3IECA3/3

4. Componentes de la Reacción: Amplificación y cuantificación de secuencias dianas

La transcripción inversa, la amplificación en tiempo real y la cuantificación de las secuencias dianas se ejecutaron en un volumen total de reacción de 25 µl. Todas las reacciones se condujeron en un Sistema de QPCR Mx3005P™ (de Stratagene). Los parámetros de ciclación fueron de 50 °C durante 30 minutos (etapa de transcripción inversa), seguidos por 95 °C durante 7 minutos, luego 10 ciclos de 95 °C durante 15 segundos e inicialmente de 65 °C durante 30 segundos con una disminución de la temperatura a razón de 1 °C por ciclo hasta 55 °C, y finalmente 50 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y de 50 °C durante 120 segundos. Las tandas de reacción contenían 40 nM de 5RSVA/3, 40 nM de 5RSVB/3, 40 nM de 5IECB/1, 200 nM de 3RSVA/3, 200 nM de 3RSVB/3, 200 nM de 3IECA3/3, 200 nM de cada substrato (SubBi-2-FB, SubBi-3-JB y SubBi-6-Q6B2), 8 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 10 unidades de Arnsin (de Promega), 1 x Immobuffer (de Bioline), 1 unidad de Immolase (de Bioline) y 40 U de M-MLV(-H) (de Promega). Cada tanda de reacción en duplicado contenía una dilución de ambos ARN genómicos de RSVB y RSVB junto con una preparación de ARN de una transcripción con T7 de la secuencia de IECB, o ningún ácido nucleico de molde.

Se produjeron dos curvas patrón, cada una de ellas ejecutada en duplicado. La primera curva patrón se generó ejecutando cuatro veces las diluciones de ambos ARN genómicos virales de RSVB y el transcrito con T7 del IECB por medio de una constante concentración de fondo del ARN genómico viral de RSVB. La segunda curva patrón se generó ejecutando cuatro veces las diluciones de ambos ARN genómicos virales de RSVB y el transcrito con T7 del IECB por medio de una constante concentración de fondo del ARN genómico viral de RSVB

Tabla 5 : Curvas patrones de RSVB /IECB

	Umbral (Ct)		
	RSVA (FAM)	RSVB (JOE)	IECB (Quasar 670)
Patrón 1	22,9	19,6	11,6
Patrón 2	25,3	19,9	13,8
Patrón 3	28,1	20,4	15,9
Patrón 4	30,6	20,4	19,0
Patrón 5	32,9	20,3	20,8
Patrón 6	36,4	20,6	23,4
Agua solamente (no testigo de molde)	No Ct	No Ct	No Ct
Curva Patrón	R ² = 0,995 Pendiente = -4,102 Eficiencia = 75,2 %	N/A	R ² = 0,997 Pendiente = -3,954 Eficiencia = 79 %

25

Tabla 6 : Curvas patrones de RSVB /IECB

	Umbral (Ct)		
	RSVA	RSVB	IECB
	(FAM)	(JOE)	(Quasar 670)
Patrón 1	26,7	15,4	11,2
Patrón 2	27,1	17,6	13,7
Patrón 3	27,3	20,0	16,3
Patrón 4	27,4	22,4	18,6
Patrón 5	27,4	25,3	21,1
Patrón 6	27,3	28,3	22,2
Agua solamente (no testigo de molde)	No Ct	No Ct	No Ct
Curva Patrón	N/A	R ² =0,996 Pendiente = - 4,276 Eficiencia = 71,3 %	R ² =0,989 Pendiente = - 3,771 Eficiencia = 84,2 %

- 5 Cada una de las series de diluciones de calibración produjo una curva patrón que tenía un alto coeficiente de correlación ($\geq 0,989$), y una alta especificidad indicada por la falta de fondo en no testigos de molde). Por lo demás, el hecho de que el ciclo de umbral (Ct) para los RSVB permaneció relativamente constante (variando por un valor de $Ct \leq 1$) en unas reacciones, en donde había a cantidad constante de entrada de RSVB pero cantidades variables de los RSVA, indica la especificidad de los sistemas de cebadores y substratos para las específicas cepas virales que estaban siendo cuantificadas.
- 10 La idoneidad del ensayo de MNAzima en tiempo real para la detección y cuantificación de los RSVA y RSVB se ensayó adicionalmente analizando muestras humanas. Se analizó el ARN extraído a partir de esputos y/o lavados nasofaríngeos y se detectaron los RSVA y/o RSVB en varias muestras.

Resultados de la comparación entre el método A (= tecnología de q-RT PCR) y el método B (= tecnología de MNAzima)

15

ES 2 559 812 T3

Tabla 7: Análisis de esputos y/o lavados nasofaríngeos usando el Método A y el Método B respectivamente

Ct = ciclo de umbral/señal positiva; ND = no detectado; + = resultado positivo; - = resultado negativo

Muestra	Datos (Cts) Método B			Datos (Cts) Método A			Resultados Método B		Resultados Método A	
	RSVA	RSVB	IECB	RSVA	RSVB		RSVA	RSVB	RSVA	RSVB
Esputo 36	15,6/17,1	ND x 2r	30/27,3	21,2	ND		+	-	+	-
NPW 10	19,7/20,2	ND x 2r	28,2	25,0	ND		+	-	+	-
NPW 11	34,4/36,0	23,2/24,0	29,1	39,8	22,4		+	+	+	+
NPW 12	37,1/39,3	25,1/26,3	28,3	42,5	24,0		+	+	+	+
NPW 13	ND x 2r	27,2/39	28,8	ND	25,1		-	+	-	+
NPW 14	18,9/19,5	ND x 2r	ND	24,3	ND		+	-	+	-
NPW 15	18,4/18,9	ND x 2r	28,5	23,5	ND		+	-	+	-
NPW 16	ND/41,7	26,1/26,8	27,8	43,6	24,7		+(1/4)	+	+	+
NPW 17	38/37	ND x 2r	28,2	ND	40,7		+	-	-	+
NPW 18	ND x 2r	14,2/15,3	26,4	ND	15,1		-	+	-	+
NPW 19	37,1/ND	21,1/21,7	28,7	ND	20,8		+(1/4)	+	-	+
NPW 20	ND/41,4	19,7/20,0	27,5	ND	19,6		+(1/4)	+	-	+
NPW 21	19,2/20,1	ND x 2r	29,1	23,7	ND		+	-	+	-
NPW 22	41,8/ND	ND x 2r	28,6	ND	30,3		+(1/4)	-	-	+
NPW 23	38,3/36,4	23,5/23,8	28,3	ND	22,7		+(3/4)	+	-	+
NPW 24	40,6/ND	34,5/ND	27,9	ND	30,7		+(1/4)	+(1/4)	-	+
NPW 25	30,7/34,3	ND x 2r	28,5	34,8	42,5		+	-	+	+
NPW 26	18,6/19,3	ND x 2r	28,2	23,4	ND		+	-	+	-
NPW 27	ND x 2r	19,0/20,1	27,7	ND	19,6		-	+	-	+
NPW 30	18,1/19,2	ND x 2r	28,2	23,4	ND		+	-	+	-
NPW 32	ND x 2r	25,1/26,3	29,1	ND	24,3		-	+	-	+
NPW 33	15,2	ND	28,4	20,2	ND		+	-	+	-
NPW 34	21,4	ND	27,8	25,7	ND		+	-	+	-
NPW 36	19,4	ND	27,7	24,3	ND		+	-	+	-
NPW 37	ND	19,5	28,6	ND	20,7		-	+	-	+
NPW 38	17,1	ND	ND	21,8	42,0		+	-	+	+
NPW 39	36,7	21,5	27,3	40,6	21,2		+	+	+	+
Esputo 1	27,2/29,6	15,0/14,2	ND	35,4	15,8		+	+	+	+
Esputo 2	22,8/25,1	15,2/14,0	ND	28,0	15,5		+	+	+	+

5

Muestra	Método B		Método A				Método B Resultados		Método A Resultados	
	RSVA	RSVB	RSVA		RSVB		RSVA	RSVB	RSVA	RSVB
Esputo 3	27,5/29,2	NDx2r	NA	17,4	NA	-	+	-	+	-
NPW 6	25,4/26,5	NDx2r	38,0	-	22,9	21,6	+	-	+	+
NPW 7	23,8/25,1	NDx2r	25,9	21,7	-	-	+	-	+	-
NPW 8	23,7/25,6	NDx2r	NA	-	NA	25,5	+	-	-	+
NPW 9	26,8/28,7	NDx2r	26,1	24,6	-	-	+	-	+	-

Hasta (4) réplicas de cada muestra se analizaron y cuando solamente algunas de ellas fueron detectables, se indica el número de positivas por el número total de réplicas que se habían analizado (p.ej. 1 entre 4 = 1/4).

ES 2 559 812 T3

Cuando estaba presente suficiente material cada muestra se analizó en duplicado dos veces (es decir, duplicados en 2 tandas separadas).

5 Los resultados que aparecen en la Tabla muestran que hay una alta concordancia entre los dos métodos (A y B) usados en términos del valor de Ct (valor de ciclo de umbral).

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> Virco BVBA Speedx Pty Ltd	
5	<120> Ensayo de detección de la carga viral con el virus sincitial respiratorio (RSV)	
	<130> VIP 028 EPO/PCT/DIV	
	<150> EP07105823,4 < 151> 2007-04-06	
10	<150> EP07108211,9 < 151> 2007-05-15	
	<160> 39	
	<170> PatentIn versión 3.3	
15	<210> 1 < 211> 27 < 212> ADN < 213> virus sincitial respiratorio	
	<400> 1 ctgtgataga rtccaacaa aagaaca	27
20	<210> 2 <211> 28 <212> ADN < 213> virus sincitial respiratorio	
	<400> 2 agttacacct gcattaacac taaattcc	28
25	<210> 3 < 211> 24 < 212> ADN < 213> virus sincitial respiratorio	
30	<400> 3 ggctccagaa tataggcatg attc	24
	<210> 4 < 211> 29 < 212> ADN < 213> virus sincitial respiratorio	
35	<400> 4 tggttattac aagagcagct atacacagt	29
40	<210> 5 < 211> 19 < 212> ADN < 213> virus sincitial respiratorio	

ES 2 559 812 T3

	<400> 5 cagactacta gagattacc	19
5	<210> 6 < 211> 17 < 212> ADN < 213> virus sincitial respiratorio	
	<400>6 tatcatccca cagtctg	17
10	<210> 7 < 211> 19 < 212> ADN < 213> virus sincitial respiratorio	
	<400> 7 aatgaccaat ccatacgca	19
15	<210> 8 < 211> 17 < 212> ADN < 213> virus sincitial respiratorio	
20	<400> 8 taccgtactc tagccta	17
	<210> 9 < 211> 21 < 212> ADN < 213> virus sincitial respiratorio	
25	<400> 9 aatcaaaata aactctgggg c	21
	<210> 10 < 211> 20 < 212> ADN < 213> virus sincitial respiratorio	
30	<400> 10 gttggtgta catagagggg	20
	<210> 11 < 211> 20 < 212> ADN < 213> virus sincitial respiratorio	
35	<400> 11 tacatgtttc agcttgggg	20
	<210> 12 < 211> 21 < 212> ADN < 213> virus sincitial respiratorio	
40	<400> 12 atatttatca atcatggcgg g	21

ES 2 559 812 T3

	<210> 13 < 211> 20 < 212> ADN < 213> virus sincitial respiratorio	
5	<400> 13 ctacatcatc ttctttgggg	20
	<210> 14 < 211> 19 < 212> ADN < 213> virus sincitial respiratorio	
10	<400> 14 gtgccagatg ttatcgggc	19
	<210> 15 < 211> 20 < 212> ADN < 213> virus sincitial respiratorio	
15	<400> 15 attaaccctc actaaagga	20
	<210> 16 < 211> 20 < 212> ADN < 213> virus sincitial respiratorio	
20	<400> 16 taatagcact cactataggg	20
	<210> 17 < 211> 4961 < 212> ADN < 213> virus sincitial respiratorio	
25	<400> 17 tgcactggcc aggggatca ccatccgtcg ccccggtg tcaataatat cactctgtac	60
	atccacaaac agacgataac ggctctctct tttatagtg taaacctta actgccgtac	120
	gtataggtg cgcaactggt gggaaggcg atcgggtcgg gcctcttcgc tattacgcca	180
	gctggcgaaa ggggatgtg ctgcaaggcg attaagttgg gtaacgccag ggttttccca	240
	gtcacgacgt tgtaaaacga cggccagtga attgtaatac gactcactat agggcgaatt	300
	gaatttagcg gccgcgaatt cgcccttaat caaaataaac tctggggcaa ataacaatgg	360
30	agttgccaat cctcaaagca aatgcaatta ccacaatcct cgctgcagtc acatthtct	420

ES 2 559 812 T3

ttgcttctag tcaaaacatc actgaagaat tttatcaatc aacatgcagt gcagttagca	480
aaggctatct tagtgctcta agaactgggt ggtatactag tgttataact atagaattaa	540
gtaatatcaa ggaaaataag tgtaatggaa cagatgctaa ggtaaaattg ataaaccaag	600
aattagataa atataaaaat gctgtaacag aattgcagtt gctcatgcaa agcacaacag	660
cagcaaacaa tcgagccaga agagaactac caaggtttat gaattataca ctcaacaata	720
ccaaaaaac caatgtaaca ttaagcaaga aaaggaaaag aagatttctt ggtttttgt	780
tagtggttg atctgcaatc gccagtgga ttgctgtatc taaggctctg cacttagaag	840
gagaagtgaa caagatcaaa agtgctctac tatccacaaa caaggccgta gtcagcttat	900
caaatggagt tagtgtctta accagcaaa tgtagacct caaaaactat atagataaac	960
aattgttacc tattgtgaat aagcaaagct gcagaatatc aaatatagaa actgtgatag	1020
agttccaaca aaagaacaac agactactag agattaccag ggaatttagt gttaatgcag	1080
gtgtaactac acctgtaagc acttacatgt taactaatag tgaattattg tcattaatca	1140
atgatatgcc tataacaaat gatcagaaaa agttaatgtc caacaatgtt caaatagtta	1200
gacagcaaa ttactctatc atgtccataa taaaagagga agtcttagca tatgtagtac	1260
aattaccact atatggtgtg atagatacac cttggtggaa attacacaca tcccctctat	1320
gtacaaccaa caaggcgcaa ttcgtttaaa cctgcaggac tagtcccttt agtgagggtt	1380
aattctgagc ttggcgtaat catggtcata gctgtttctt gtgtgaaatt gttatccgct	1440
cacaattcca cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaatg	1500
agtgagctaa ctcacattaa ttgctgtgag ctcactgcc gctttccagt cgggaaacct	1560
gtcgtgccag ctgcattaat gaatcggcca acgcgcgagg agaggcgggt tgcgtattgg	1620
gcgctcttcc gcttctctgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc	1680
ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg	1740
aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa gcccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct	1800
ggcgtttttc cataggtctc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca	1860
gagggtggca aaccggacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct	1920
cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgt taccggatac ctgtccgcct ttctccctc	1980
gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggctgt	2040
tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc cccgttcag cccgaccgct gcgccttatc	2100
cggtaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc	2160
cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcgggt gctacagagt tcttgaagtg	2220

ES 2 559 812 T3

gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc	2280
agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag	2340
cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat ctcaagaaga	2400
tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat	2460
tttggtcatg agattatcaa aaaggatcct cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag	2520
ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttggctc gacagttacc aatgcttaat	2580
cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc	2640
cgctcgttag ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat	2700
accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag	2760
ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattggtg	2820
ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagttag cgcaacgttg ttgccattgc	2880
tacaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt tggtaggct tcattcagct ccggttccca	2940
acgatcaagc cgagttacat gatccccat gttgtgcaa aaagcggta gctccttcgg	3000
tcctccgacg gttgtcagaa gtaagtggc cgcagtgtta tcaactatgg ttatggcagc	3060
actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta	3120
ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgct	3180
aatacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg	3240
ttcttcgggg cgaaaactct caaggatcct accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc	3300
cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc	3360
aaaaacagga aggcaaaatg ccgcaaaaaa ggaataaagg gcgacacgga aatggtgaat	3420
actcatactc ttcctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag	3480
cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa taacaaata ggggttccgc gcacatttc	3540
ccgaaaagtg ccacctgtat gcggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac	3600
cgcacagga aattgtaagc gttaataatt cagaagaact cgtcaagaag gcgatagaag	3660
gcgatgcgct gcgaatcggg agcggcgata ccgtaaagca cgaggaagcg gtcagcccat	3720
tcgccgcaa gctcttcagc aatatcacgg gtagccaacg ctatgtcctg atagcggttc	3780
gccacacca gccggccaca gtcgatgaat ccagaaaagc ggccattttc caccatgata	3840
ttcggcaagc aggcacgcc atgggtcacg acgagatcct cgcgctcggg catgctcggc	3900
ttgagcctgg cgaacagttc ggctggcggc agcccctgat gctcttcgtc cagatcatcc	3960
tgatcgacaa gaccggcttc catccgagta cgtgctcgtc cgatgcgatg tttcgcttgg	4020

ES 2 559 812 T3

tggtcgaatg ggcaggtagc cggatcaagc gtatgcagcc gccgcattgc atcagccatg 4080
 atggatactt tctcggcagg agcaaggtga gatgacagga gatcctgccc cggcacttcg 4140
 cccaatagca gccagtcctt tcccgcttca gtgacaacgt cgagcacagc tgcgcaagga 4200
 acgcccgtcg tggccagcca cgatagccgc gctgcctcgt cttgcagttc attcagggca 4260
 ccggacaggt cggctctgac aaaaagaacc gggcgcccct gcgctgacag ccggaacacg 4320
 gcggcatcag agcagccgat tgtctgttgt gcccagtcac agccgaatag cctctccacc 4380
 caagcggccg gagaacctgc gtgcaatcca tcttgttcaa tcatgcgaaa cgatcctcat 4440
 cctgtctctt gatcagagct tgatccccct gcgccatcaga tccttggcgg cgagaaagcc 4500
 atccagttta ctttgcaggg cttcccaacc ttaccagagg gcgccccagc tggcaattcc 4560
 ggttcgcttg ctgtccataa aaccgcccag tctagctatc gccatgtaag cccactgcaa 4620
 gctacctget ttctctttgc gcttgcgttt tcccttgtcc agatagccca gtagctgaca 4680
 ttcacccggg gtcagcaccg tttctgcgga ctggctttct acgtgaaaag gatctaggtg 4740
 aagatccttt ttgataatct catgcctgac atttatattc cccagaacat caggttaatg 4800
 gcgtttttga tgcatcttc gcggtggctg agatcagcca cttcttcccc gataacggag 4860
 accggcacac tggccatata ggtggtcac atgcgccagc tttcatcccc gatatgcacc 4920
 accgggtaaa gttcacggga gactttatct gacagcagac g 4961

<210> 18

< 211> 5356

< 212> ADN

< 213> virus sincitial respiratorio

5

<400> 18

tgcactggcc agggggatca ccatccgtcg ccccggcgtg tcaataatat cactctgtac 60
 atccacaaac agacgataac ggctctctct tttataggtg taaaccttaa actgccgtac 120
 gtataggctg cgcaactggt ggggaaggcg atcgggtgcg gcctcttcgc tattacgcca 180
 gctggcgaaa ggggatgtg ctgcaaggcg attaagttgg gtaacgccag ggttttccca 240
 gtcacgacgt tgtaaaacga cggccagtga attgtaatac gactcactat agggcgaatt 300
 gaatttagcg gccgcgaatt cgcccttata tttatcaatc atggcgggtt tctagaatgt 360
 attggcatta agcctacaaa acacactcct ataataaca aatatgacct caaccgtaa 420
 attccaacaa aaaactaacc catccaaact aagctattcc ttaaataaca gtgctcaaca 480
 gttaagaagg ggctaataca ttttagtaat taaaaataaa ggtaaagcca ataacataaa 540
 ttggggcaaa tacaagatg gctcttagca aagtcaagtt aatgatata ttaaataagg 600
 atcagctgct gtcacttagc aaatacacta ttcaacgtag tacaggagat aatattgaca 660

ES 2 559 812 T3

ctcccaatta tgatgtgcaa aaacacttaa acaaactatg tggatgcta ttaatcactg	720
aagatgcaaa tcataaattc acaggattaa taggtatggt atatgctatg tccaggttag	780
gaaggaaga cactataaag atacttaaag atgctggata tcatgttaa gctaatggag	840
tagatataac aacatatcgt caagatataa atggaaagga aatgaaattc gaagtattaa	900
cattatcaag cttgacatca gaaatacaag tcaatattga gatagaatct agaaagtcct	960
acaaaaaat gctaaaagag atgggagaag tggctccaga atataggcat gattctccag	1020
actgtgggat gataaactg tgtatagctg cacttgaat aaccaaatta gcagcaggag	1080
atagatcagg tcttacagca gtaattagga gggcaacaa tgtcttaaa aacgaaataa	1140
aacgctacaa gggcctcata ccaaagata tagctaacag tttttatgaa gtgtttgaa	1200
aacaccctca tcttatagat gttttgtgc actttggcat tgcacaatca tccacaagag	1260
gggtagtag agttgaagga atctttgcag gattatttat gaatgcctat gttcagggc	1320
aagtaatgct aagatgggga gttttagcca aatctgtaa aaatatcatg ctaggacatg	1380
ctagtgtcca ggcagaaatg gagcaagttg tggaagtcta tgagtatgca cagaagttg	1440
gaggagaagc tggattctac catatattga acaatccaaa agcatcattg ctgtcattaa	1500
ctcaatttc taacttctca agtgtggtcc taggcaatgc agcaggtcta ggcataatgg	1560
gagagtatag aggtacacca agaaaccagg atctttatga tgcagccaaa gcatatgcag	1620
agcaactcaa agaaaatgga gtaataaact acagtgtatt agacttaaca gcagaagaat	1680
tggaggccat aaagcatcaa ctcaacccca aagaagatga tgtagaaagg gcgaattcgt	1740
ttaaacctgc aggactagtc cctttagtga gggtaattc tgagcttggc gtaatcatgg	1800
tcatagctgt ttctgtgtg aaattgttat ccgctcaca ttccacaca catacgagcc	1860
ggaagcataa agtgtaaagc ctgggtgccc taatgagtga gctaactcac attaatgctg	1920
ttgcgctcac tgcccgttt ccagtcggga aacctgctgt gccagctgca ttaatgaatc	1980
ggccaacgcg cgggagagc cggtttgcgt attgggcgct cttccgctc ctgctcact	2040
gactcgctgc gctcgtcgt tcggctgcgg cgagcggat cagctcactc aaaggcggta	2100
atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag	2160
caaaagccca ggaaccgtaa aaaggcgcg ttgctggcgt tttccatag gctccgccc	2220
cctgacgagc atcacaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaacc gacaggacta	2280
taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgacctg	2340
ccgcttaccg gatacctgct cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc	2400
tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgctcgt ccaagctggg ctgtgtgcac	2460

ES 2 559 812 T3

```

gaacccccg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac 2520
ccggttaagac acgacttata gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg 2580
aggtatgtag gcggtgctac agagtctctg aagtgggtggc ctaactacgg ctacactaga 2640
aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt 2700
agctcttgat ccggcaaaaca aaccaccgct ggtagcggtg gttttttgt ttgcaagcag 2760
cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggctc 2820
gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgtaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg 2880
atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat 2940
gagtaaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc 3000
tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg 3060
gagggcttac catctggccc cagtgtgca atgataccgc gagaccacg ctcaccggct 3120
ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggcgg agcgcagaag tggctctgca 3180
actttatccg cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg 3240
ccagtaata gtttgcgcaa cgttgttgc attgctacag gcatcgtggt gtcacgctcg 3300
tcgtttgta tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc 3360
cccatgttgt gcaaaaaagc ggtagctcc ttcggctcct cgatcgttgt cagaagtaag 3420
ttggccgag tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg 3480
ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt gactactcaa ccaagtcatt ctgagaatag 3540
tgtatgcccg gaccgagttg ctcttgcgcc gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat 3600
agcagaactt taaaagtgct catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg 3660
atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taaccactc gtgcacccaa ctgatcttca 3720
gcatctttta ctttaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aatgcccga 3780
aaaaagggaa taaggcgac acggaatgt tgaatactca tactcttctt tttcaatat 3840
tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag 3900
aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgtatgagg 3960
gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgat caggaaattg taagcgtaa 4020
taattcagaa gaactcgtca agaaggcgtg agaaggcgtg gcgctgcgaa tcgggagcgg 4080
cgataccgta aagcacgagg aagcgtcag cccattcgcc gccaaagctct tcagcaatat 4140
cacgggtage caacgctatg tcctgatagc ggtccgccac acccagccgg ccacagtcga 4200
tgaatccaga aaagcggcca ttttccacca tgatattcgg caagcaggca tcgccatggg 4260

```

ES 2 559 812 T3

tcacgacgag atcctcgccg tcgggcatgc tcgccttgag cctggcgaac agttcggctg 4320
gcgcgagccc ctgatgctct tcgtccagat catcctgatc gacaagaccg gcttccatcc 4380
gagtacgtgc tcgctcgatg cgatgtttcg cttgggtggtc gaatgggcag gtagccggat 4440
caagcgtatg cagccgccgc attgcatcag ccatgatgga tactttctcg gcagagagcaa 4500
ggtgagatga caggagatcc tgccccggca cttcgcccaa tagcagccag tcccttcccg 4560
cttcagtgac aacgtcgagc acagctgcgc aaggaacgcc cgtcgtggcc agccacgata 4620
gccgcgctgc ctcgtcttgc agttcattca gggcaccgga caggtcggtc ttgacaaaaa 4680
gaaccgggcg ccctcgctg gacagccgga acacggcggc atcagagcag ccgattgtct 4740
gttgtgccca gtcatagccg aatagcctct ccaccaagc ggccggagaa cctgcgtgca 4800
atccatcttg ttcaatcatg cgaaacgatc ctcatectgt ctcttgatca gagcttgatc 4860
ccctgcgcca tcagatcctt ggcgggcaga aagccatcca gtttactttg cagggttcc 4920
caaccttacc agaggggcgc ccagctggca attccggttc gcttgctgtc cataaaaccg 4980
cccagtctag ctatcgccat gtaagcccac tgcaagctac ctgctttctc tttgcgcttg 5040
cgttttccct tgtccagata gcccagtagc tgacattcat ccggggtcag caccgtttct 5100
gcggactggc tttctacgtg aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat aatctcatgc 5160
ctgacattta tattccccag aacatcaggt taatggcggt tttgatgtca ttttcgcggt 5220
ggctgagatc agccacttct tccccgataa cggagaccgg cacactggcc atatcggtgg 5280
tcatcatgcg ccagctttca tccccgatat gcaccaccgg gtaaagtca cgggagactt 5340
tatctgacag cagacg 5356

5 <210> 19
< 211> 43
< 212> ADN
< 213> virus sincitial respiratorio

<400> 19
ctgtgataga gttccaaca aagaacaatg cgatggatt ggt 43

10 <210> 20
< 211> 43
< 212> ADN
< 213> virus sincitial respiratorio

<400> 20
agttacacct gcattaacac taaattccct aatgaccaat cca 43

15 <210> 21
< 211> 41
< 212> ADN
< 213> virus sincitial respiratorio

<400> 21
ggctccagaa tataggcatg attctctacc gtactctagc c 41

ES 2 559 812 T3

<210> 22
 < 211> 41
 < 212> ADN
 < 213> virus sincitial respiratorio

5 <400> 22
 tggttattac aagtgctgct atacacagta ttaggctaga g 41

10 <210> 23
 < 211> 4034
 < 212> ADN
 < 213> virus sincitial respiratorio

<400> 23
 tgcactggcc agggggatca ccatccgctc ccccggcgtg tcaataatat cactctgtac 60
 atccacaaac agacgataac ggctctctct tttataggtg taaaccttaa actgccgtac 120
 gtataggctg cgcaactggt ggaagggcg atcgggtgcgg gcctcttcgc tattacgcca 180
 gctggcgaaa gggggatgtg ctgcaaggcg attaagttgg gtaacgccag ggttttccca 240
 gtcacgacgt tgtaaaacga cggccagtga attgtaatac gactcactat agggcgaatt 300
 gaatttagcg gccgcgaatt cgccttctg tgatagagtt ccaacaaaag aacaatgcgt 360
 atggattggt cattagggaa tttagtgta atgcaggtg aactaaggcg gaattcgttt 420
 aaacctgcag gactagtccc tttagtgagg gtttaattctg agcttggcgt aatcatggtc 480
 atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg 540
 aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta atgagtgagc taactcacat taattgcgtt 600
 gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg 660
 ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgat tgggcgctct tccgcttcct cgctcactga 720
 ctcgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat 780
 acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca 840
 aaagcccagg aaccgtaaaa aggccgctt gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc 900
 tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaaccgca caggactata 960
 aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc 1020
 gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc 1080
 acgctgtagg tatctcagtt cggtgtaggt cgttcgtcc aagctgggct gtgtgcacga 1140
 , accccccgtt cagcccagacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaacct 1200

ES 2 559 812 T3

```

ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag 1260
gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct aactagaag 1320
gacagtatth ggtatctgcy ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaa gagttggtag 1380
ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtgg tttttgttt gcaagcagca 1440
gattacgcyg agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga 1500
cgctcagtyg aacgaaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat 1560
cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaa tcaatctaaa gtatatatga 1620
gtaaacttyg tctgacagtt accaatgctt aatcagtyg gacctatct cagcagctg 1680
tctatthcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgctgty tagataacta cgatacggga 1740
gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcyg gaccacgct caccggtcc 1800
agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg gtcctgcaac 1860
tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccggaa gctagagtaa gtagttcgc 1920
agttaatagt ttgcycaacg ttgthgcat tgctacagcy atcgtggtg cacgctcgtc 1980
gthtggtatg gcttcattca gctccgthc ccaacgatca aggcgagth catgatcccc 2040
catgthgtyc aaaaaagcgg thagctcctt cgtcctccg atcgtthtca gaagtaagth 2100
ggccgcyg thtatcactca tggthtggc agcactgcat aattctctta ctgctatgc 2160
atccgtaaga thgctthctg thgactgthg gtactcaacc aagtcattct gagaatagth 2220
tatgcygcyg ccgagthgct cthgcccggc thcaatacgg gataataccg cgcacatag 2280
cagaacttha aaagthtca thattggaa acgthctctg ggcgaaaa tctcaaggat 2340
cttaccgctg thgagatcca gthcagthg acccactcgt gcacccaact gatcttcagc 2400
atctthtact thcaccagcy thtctggtyg agcaaaaaa ggaaggcaaa atgccgcaaa 2460
aaagggaata agggcgacac ggaatgthg aatactcata ctctcctth thcaatatta 2520
thgaagcatt tatcaggyth attgtctcat gagcggatac atatthgat gththtagaa 2580
aaataaaca ataggygthc cgcgcacatt tccccgaaa thgccacctg thgcygtyg 2640
gaaataccgc acagatgcyt aaggagaaaa taccgcatca ggaattgth agcgttaata 2700
atcagaaga actcgtcaag aaggcagatg aaggcagtyc gctgcyaatc gggagcggcy 2760
ataccgthaa gcacgaggaa gcgthcagcc cthcgcgc caagctctc agcaatatca 2820
cgggtagcca acgctatgty ctgatagcgg tccgccacac ccagccgcy acagthcagth 2880
aatccagaaa agcggcatt thccaccatg atatthcgya agcagcacy gccatggyt 2940
acgacgagat cctcgcgtyc ggcagtyc gcctthgacc thgcyaacag thcgytgyc 3000

```

ES 2 559 812 T3

gcgagcccct gatgctcttc gtccagatca tcctgatcga caagaccggc ttccatccga 3060
gtacgtgctc gctcgatgcg atgtttcgcg tgggtggcga atgggcaggt agccggatca 3120
agcgtatgca gccgccgat tgcacagcc atgatggata ctttctcggc aggagcaagg 3180
tgagatgaca ggagatcctg ccccggcact tcgccaata gcagccagtc ccttcccgct 3240
tcagtgacaa cgtcgagcac agctgcgcaa ggaacgcccg tcgtggccag ccacgatagc 3300
cgcgctgcct cgtcttgag ttcattcagg gcaccggaca ggtcgttctt gacaaaaaga 3360
accgggcgcc cctgcgctga cagccggaac acggcggcat cagagcagcc gattgtctgt 3420
tgtgcccagt catagccgaa tagcctctcc acccaagcgg ccggagaacc tgcgtgcaat 3480
ccatcttgtt caatcatgcy aaacgatcct catcctgtct cttgatcaga gcttgatccc 3540
ctgcccatac agatccttgg cggcgagaaa gccatccagt ttactttgca gggcttccca 3600
accttaccag agggcgcccc agctggcaat tccggttcgc ttgctgtcca taaaaccgcc 3660
cagtctagct atcgccatgt aagcccactg caagctacct gctttctctt tgcgcttgcy 3720
ttttcccttg tccagatagc ccagtagctg acattcatcc ggggtcagca ccgtttctgc 3780
ggactggctt tctacgtgaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgcct 3840
gacatttata ttcccagaa catcaggta atggcgtttt tgatgtcatt ttcgcygtg 3900
ctgagatcag ccacttcttc cccgataacg gagaccggca cactggccat atcggtggtc 3960
atcatgcgcc agctttcacc cccgatatgc accaccgggt aaagttcacg ggagacttta 4020
tctgacagca gacg 4034

<210> 24
< 211> 4031
< 212> ADN
< 213> virus sincitial respiratorio

5

<400> 24
tgcactggcc aggggatca ccacccgctc ccccggcgtg tcaataatat cactctgtac 60
atccacaaac agacgataac ggctctctct tttataggty taaaccttaa actgccgtac 120
gtataggctg cgcaactggt ggaagggcg atcggtycgg gcctcttcgc tattacgcca 180
gctggcgaaa ggggatgty ctgcaaggcy attaatgty gtaacgccag ggttttccca 240
gtcacgacgt tgtaaacga cggccagty attgtaatac gactcactat agggcgaatt 300
gaatttagcy gccgcgaatt cgccttggc tccagaatat aggcattgatt ctctaccgta 360
ctctagccta atactgtgta tagcagcact tgtaataacc aaagggcgaa ttcgtttaa 420
cctgcaggac tagtcccttt agtgagggtt aattctgagc ttggcgtaat catggtcata 480
gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca cacaacatac gagccggaag 540

ES 2 559 812 T3

cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaatag agtgagctaa ctcacattaa ttgcggttgcg	600
ctcactgccc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag ctgcattaat gaatcggcca	660
acgcgcgggg agaggcgggt tgcgtattgg gcgctcttcc gcttcctcgc tcaactgactc	720
gctgcgctcg gtcggttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggaataacg	780
gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa	840
gcccaggaac cgtaaaaagg ccgcggttgc ggcgtttttc cataggctcc gccccctga	900
cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aaccgcagag gactataaag	960
ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctggtccga ccctgccgct	1020
taccggatac ctgtccgctt ttctcccttc ggggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg	1080
ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc	1140
ccccgttcag cccgaccgct gcgccttacc cggtaactat cgtcttgagt ccaaccgggt	1200
aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggtg	1260
tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac	1320
agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc agttacctc ggaaaaagag ttggtagctc	1380
ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggttt tttgtttgca agcagcagat	1440
tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgac ttttctacgg ggtctgacgc	1500
tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt	1560
caactagatc cttttaaat aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta tatatgagta	1620
aacttggctc gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct	1680
atctcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg	1740
cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac cggctccaga	1800
tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt	1860
atccgcctcc atccagtcta ttaattggtg ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt	1920
taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcacc gtgggtgtcac gctcgtcgtt	1980
tggtatggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg cgagttacat gatccccat	2040
gttgtgcaaa aaagcgggta gctcctcgg tcctccgac gttgtcagaa gtaagttggc	2100
cgcagtggtg tcaactcatg ttatggcagc actgcataat tctcttactg tcatgccatc	2160
cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat	2220
gcggcgaccg agttgctctt gcccgcgctc aatacgggat aataccgcgc cacatagcag	2280
_aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt	2340

ES 2 559 812 T3

accgctggtg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc 2400
 ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaatg ccgcaaaaaa 2460
 gggaataagg gcgacacgga aatggtgaat actcatactc ttcctttttc aatattattg 2520
 aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa 2580
 taaacaataa ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgtat gcggtgtgaa 2640
 ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac cgcatacagga aattgtaagc gttataaatt 2700
 cagaagaact cgtcaagaag gcgatagaag gcgatgcgct gcgaatcggg agcggcgata 2760
 ccgtaaagca cgaggaagcg gtcagcccat tcgccgcaa gctcttcagc aatatcacgg 2820
 gtagccaacg ctatgtcctg atagcgggtcc gccacacca gccggccaca gtcgatgaat 2880
 ccagaaaagc ggcattttc caccatgata ttcggcaagc aggcatcgcc atgggtcacg 2940
 acgagatcct cgccgtcggg catgctcgcc ttgagcctgg cgaacagttc ggctggcgcg 3000
 agcccctgat gctcttcgtc cagatcatcc tgatcgaaa gaccggcttc catccgagta 3060
 cgtgctcgct cgatgcgatg tttcgcttgg tggtcgaatg ggcaggtagc cggatcaagc 3120
 gtatgcagcc gccgcattgc atcagccatg atggatactt tctcggcagg agcaaggatga 3180
 gatgacagga gatcctgccc cggcacttcg cccaatagca gccagtccct tcccgttca 3240
 gtgacaacgt cgagcacagc tgcgcaagga acgcccgtcg tggccagcca cgatagccgc 3300
 gctgcctcgt cttgcagttc attcagggca ccggacaggt cggctcttgac aaaaagaacc 3360
 gggcgcccct gcgctgacag ccggaacacg gcggcatcag agcagccgat tgtctgttgt 3420
 gccagtcata agccgaatag cctctccacc caagcggccg gagaacctgc gtgcaatcca 3480
 tcttgttcaa tcatgcgaaa cgatcctcat cctgtctctt gatcagagct tgatcccctg 3540
 cgccatcaga tccttggcgg cgagaaagcc atccagtta ctttgcaggg cttcccaacc 3600
 ttaccagagg gcgccccagc tggcaattcc ggttcgcttg ctgtccataa aaccgcccag 3660
 tctagctatc gccatgtaag cccactgcaa gctacctgct ttctctttgc gcttgcgttt 3720
 tcccttgtcc agatagccca gtagctgaca ttcattccggg gtcagcaccg tttctgcgga 3780
 ctggctttct acgtgaaaag gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgcctgac 3840
 atttatattc ccagaacat caggttaatg gcgtttttga tgtcattttc gcggtggctg 3900
 agatcagcca cttcttcccc gataacggag accggcacac tggccatata ggtggtcatc 3960
 atgcgccagc tttcatcccc gatatgcacc accgggtaaa gttcacggga gactttatct 4020
 gacagcagac g 4031

<210> 25
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> virus sincitial respiratorio

5

<400> 25
 cagactacta gagattacca tacaacgaga ggaaacctt

39

ES 2 559 812 T3

	<210> 26 < 211> 37 < 212> ADN < 213> virus sincitial respiratorio	
5	<400> 26 tgcccagga ggctagcggg aatttagtgt taatgca	37
	<210> 27 < 211> 38 < 212> ADN < 213> virus sincitial respiratorio	
10	<400> 27 agactgtggg atgataatac tacaacgagg ttgtgctg	38
	<210> 28 < 211> 37 < 212> ADN < 213> virus sincitial respiratorio	
15	<400> 28 cggttggtga ggctagctgt gtatagctgc acttgta	37
	<210> 29 < 211> 38 < 212> ADN < 213> virus sincitial respiratorio	
20	<400> 29 acctgcagga ctagtccctt tacaacgaga ggcgtgat	38
	<210> 30 < 211> 37 < 212> ADN < 213> virus sincitial respiratorio	
25	<400> 30 ctgggaggaa ggctagctag tgagggttaa ttctgag	37
	<210> 31 < 211> 22 < 212> ADN < 213> virus sincitial respiratorio	
30	<400> 31 aaggtttcct cguccctggg ca	22
	<210> 32 < 211> 21 < 212> ADN < 213> virus sincitial respiratorio	
35	<400> 32 cagcacaacc guaccaacc g	21
	<210> 33 < 211> 21	

ES 2 559 812 T3

	< 212> ADN < 213> virus sincitial respiratorio	
	<400> 33 atcacgcctc gutcctcca g	21
5	<210> 34 < 211> 22 < 212> ADN < 213> virus sincitial respiratorio	
10	<400> 34 gtgatagagt tccaacaaaa ga	22
	<210> 35 < 211> 21 < 212> ADN < 213> virus sincitial respiratorio	
15	<400> 35 aagtgcttac aggtgtagtt a	21
	<210> 36 < 211> 21 < 212> ADN < 213> virus sincitial respiratorio	
20	<400> 36 gctccagaat ataggcatga t	21
	<210> 37 < 211> 21 < 212> ADN < 213> virus sincitial respiratorio	
25	<400> 37 gatctatctc ctgctgctaa t	21
	<210> 38 < 211> 21 < 212> ADN < 213> virus sincitial respiratorio	
30	<400> 38 ctgtaataa ccaaagggcg a	21
	<210> 39 < 211> 22 < 212> ADN < 213> virus sincitial respiratorio	
35	<400> 39 ggaacagct atgacatga tt	22
40		
45		

REIVINDICACIONES

1. Método para identificar, detectar o cuantificar la presencia de por lo menos un virus sincitial respiratorio (RSV) que comprende las siguientes etapas

- 5 (a) proporcionar dos o más componentes oligonucleótidos en los que por lo menos un primer componente oligonucleótido y por lo menos un segundo componente oligonucleótido son capaces de autoensamblarse en la presencia de dicha diana para formar una enzima de ácido nucleico multicomponentes que es activa catalíticamente (MNAzima);
- 10 (b) poner en contacto dichos componentes oligonucleótidos con una muestra que putativamente contiene dicha por lo menos una diana en unas condiciones:
(1) que permiten la fijación de dicha diana a dichos componentes oligonucleótidos y
(2) que permiten la actividad catalítica de la MNAzima; y
- (c) identificar, detectar o cuantificar la presencia de la actividad catalítica de la MNAzima, en donde la presencia de la actividad catalítica es indicativa de la presencia de dicha diana, en donde:

15 cada componente oligonucleótido comprende una porción de brazo de substrato, una porción de núcleo catalítico, y una porción de brazo de sensor y en donde en la presencia de una diana, las porciones de brazo de sensor de los componentes oligonucleótidos se hibridan con y se emparejan en bases con unas porciones complementarias de la diana, en donde después de haber puesto en contacto la diana de esta manera, la MNAzima se autoensambla formando un núcleo catalítico, que puede modificar a un substrato que está unido a los brazos de substrato.

2. Un método de acuerdo con cualquiera de la reivindicación 1, en el que se cuantifica la carga viral de la diana.

20 3. Un método para la extracción de ácidos nucleicos a partir de una muestra biológica, que comprende las siguientes etapas:

- 25 a) obtener una muestra biológica,
b) añadir una mezcla de una solución salina tamponada con fosfato y 10 % de ditiotreitol a dicho material tisular de la etapa a),
c) incubar en condiciones ultrasónicas,
d) añadir un tampón de lisis,
e) obtener un material tisular lisado y
f) extraer dicho ácido nucleico a partir de dicho material tisular lisado,

30 en donde dicho material tisular o bien un esputo, un lavado nasofaríngeo (NPW) o un tejido de pulmón congelado, en donde el ácido nucleico es un ADN o ARN procedente de unos patógenos tales como unos virus, en donde dicho virus es un virus sincitial respiratorio humano (RSV) y en donde dicho ácido nucleico es cuantificado adicionalmente por una tecnología de enzima de ácido nucleico de múltiples componentes (MNAzima) de acuerdo con la reivindicación 1.

35 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la etapa c) se ejecuta con un aparato Covaris S2 ultrasónico y la etapa de extracción f) se ejecuta usando un proceso EasyMAG.

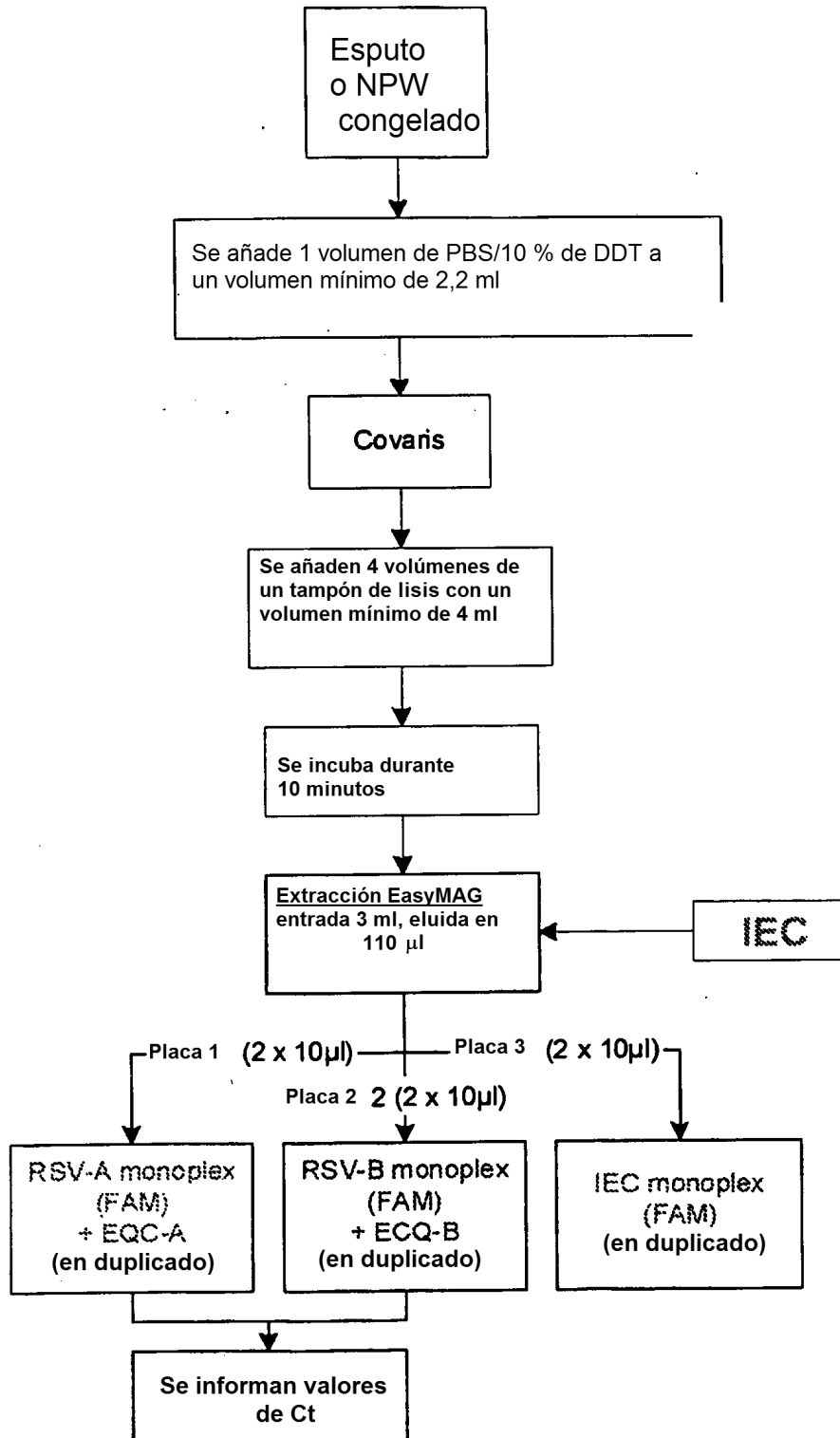


Figura 1. Flujo de trabajos de diagnóstico para la determinación de la carga viral de RSV

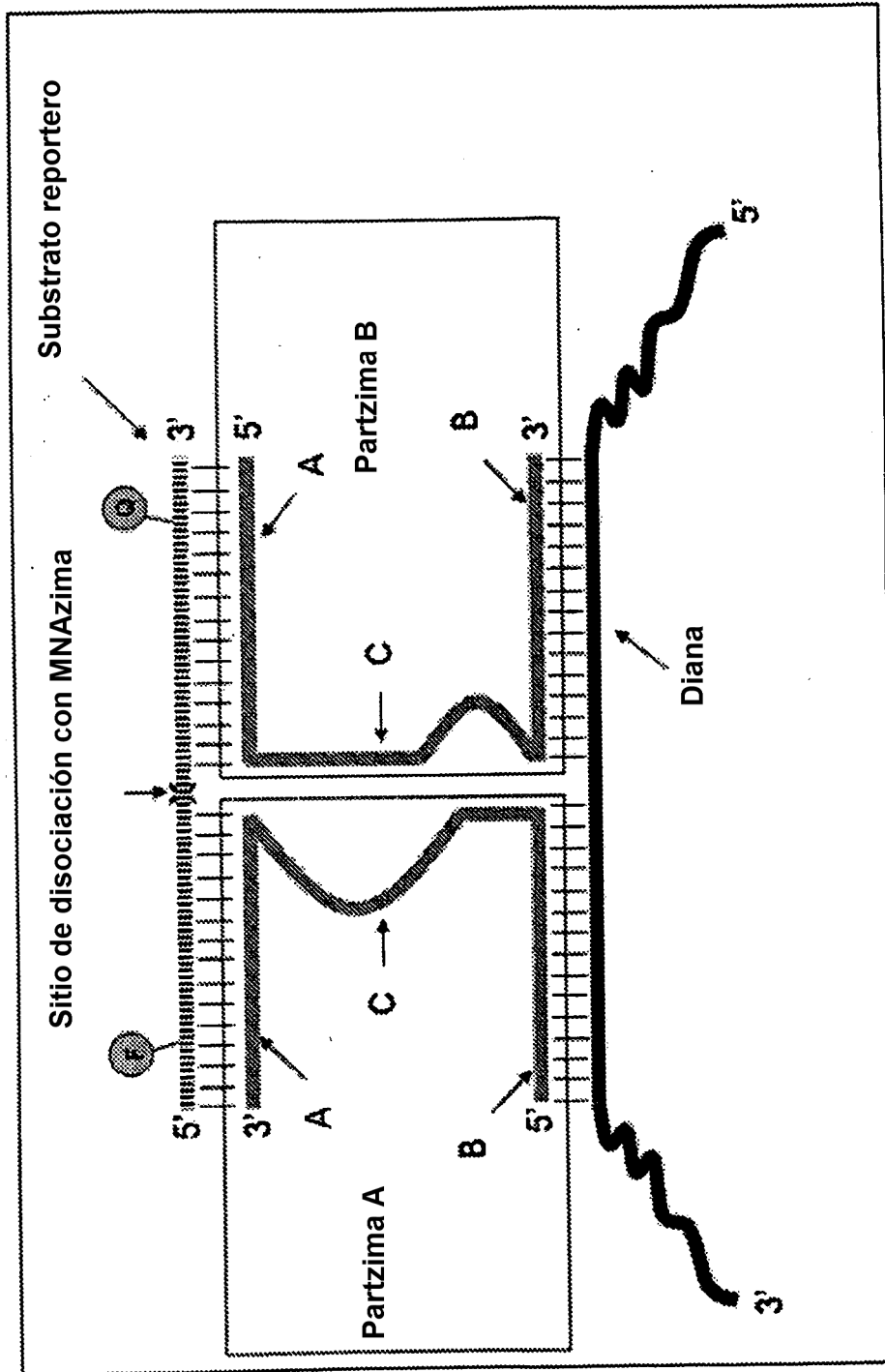


Figura 2.

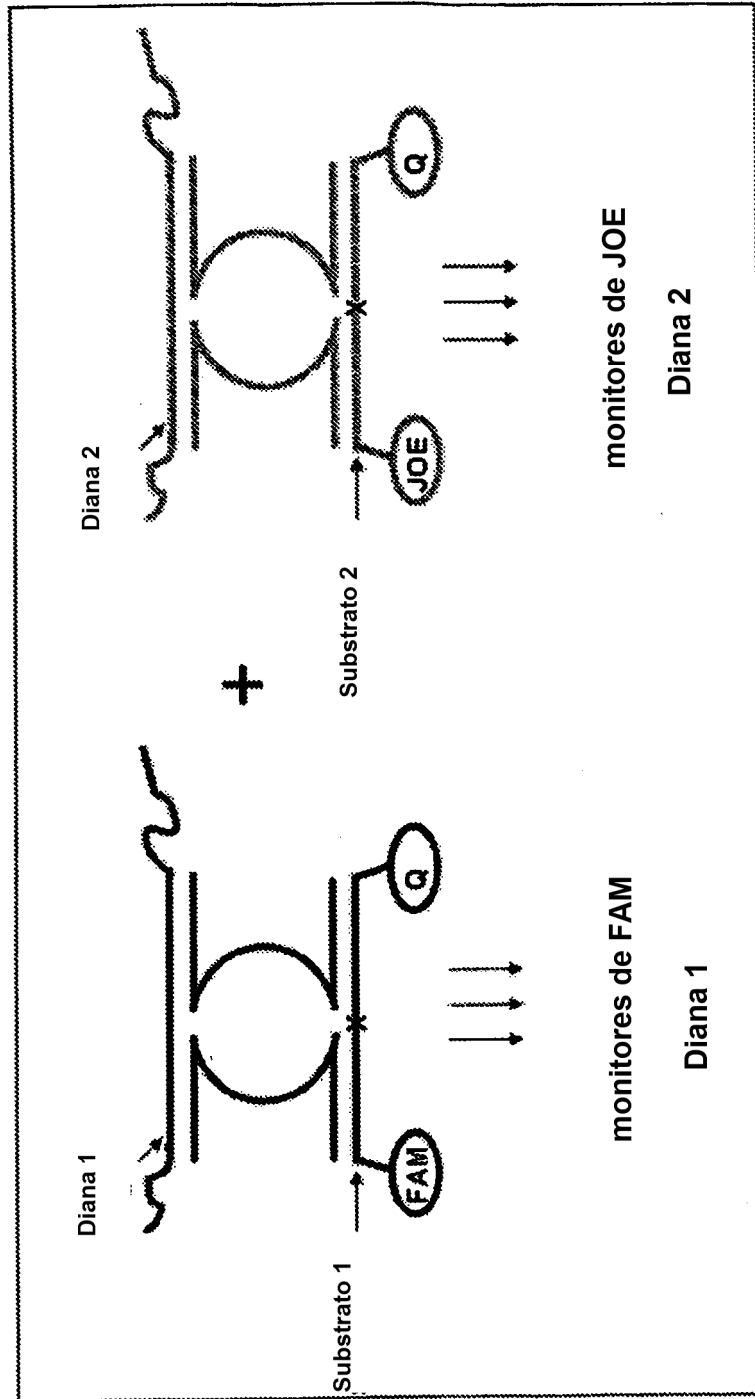


Figura 3

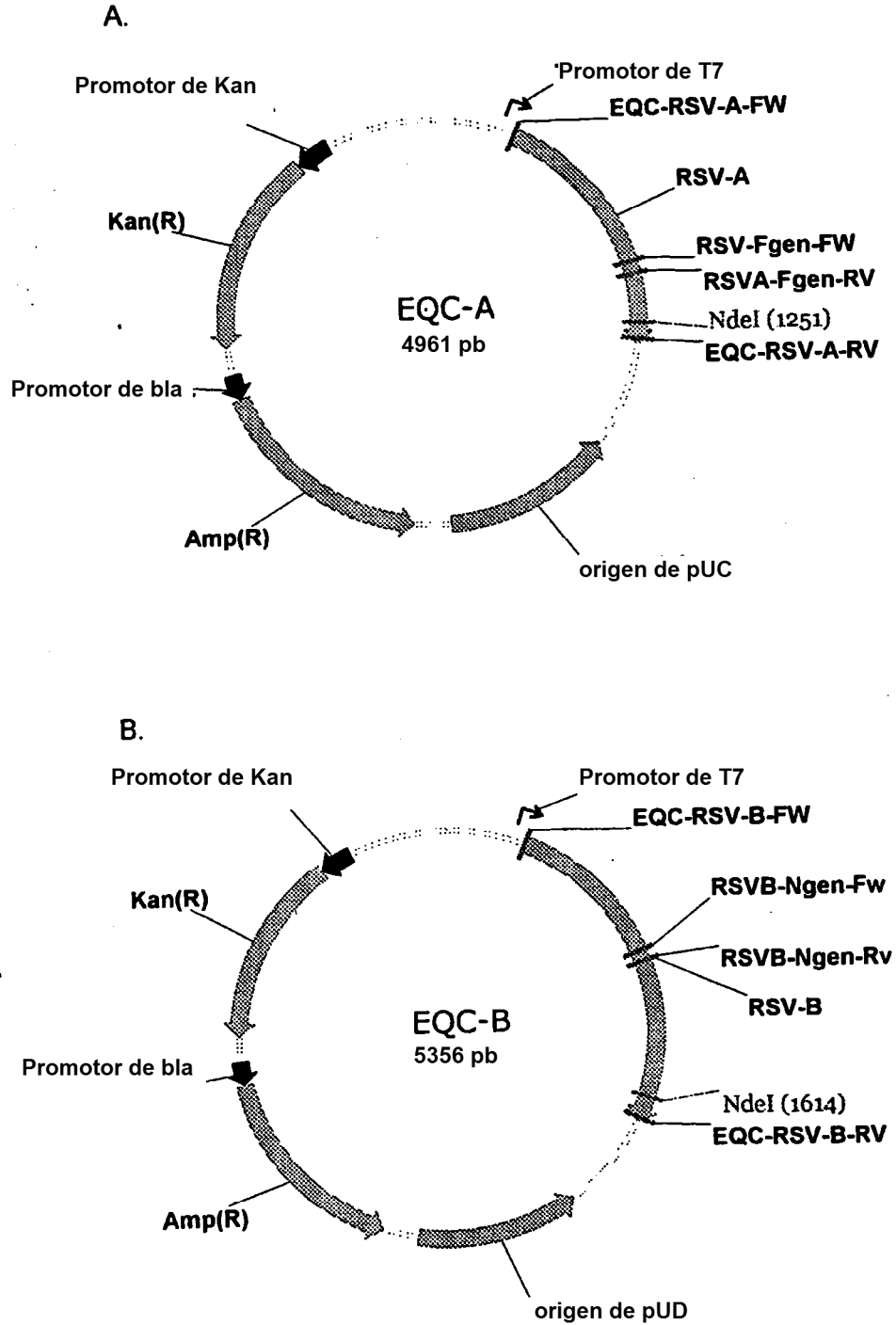


Figura 4

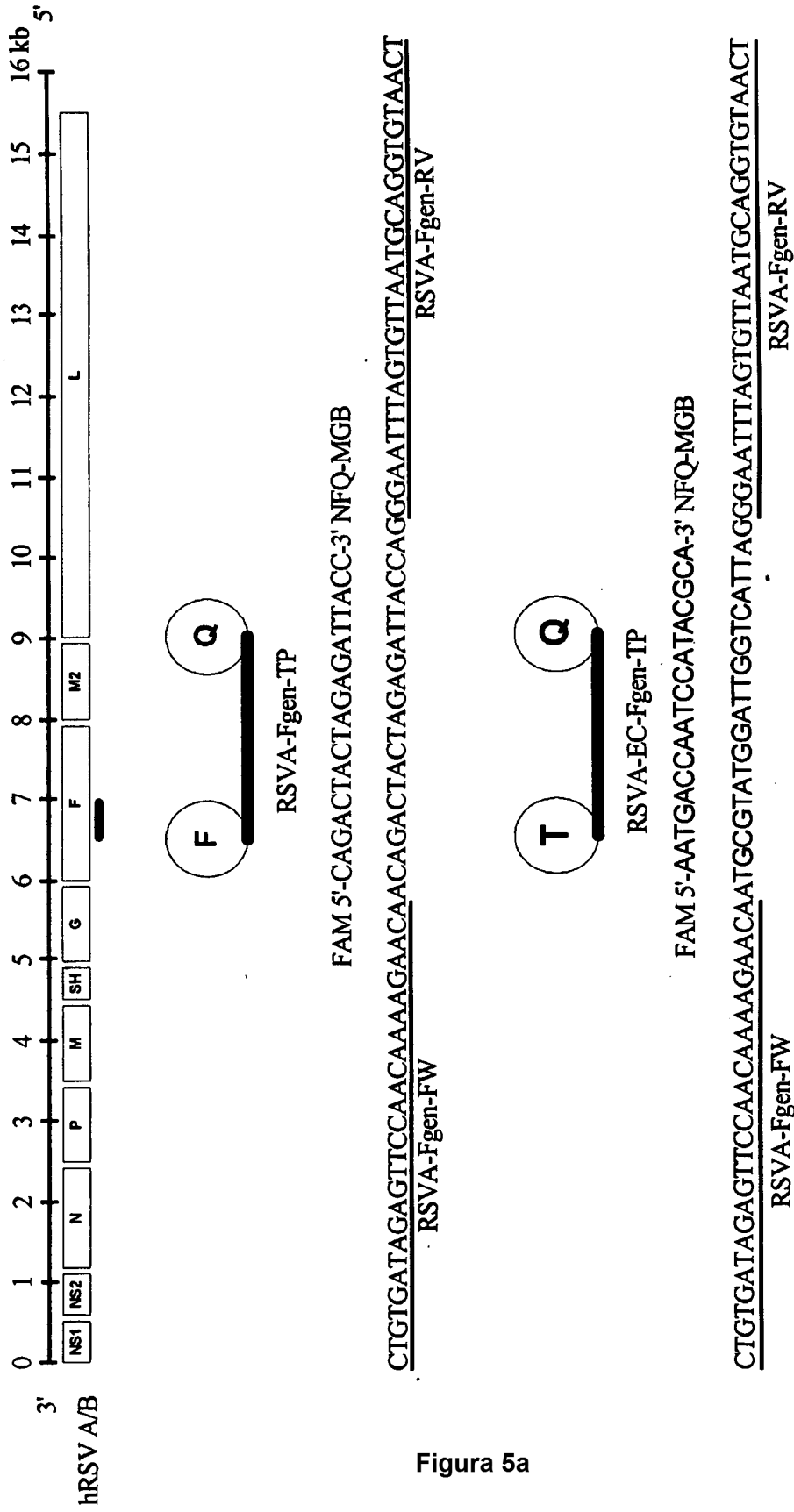


Figura 5a

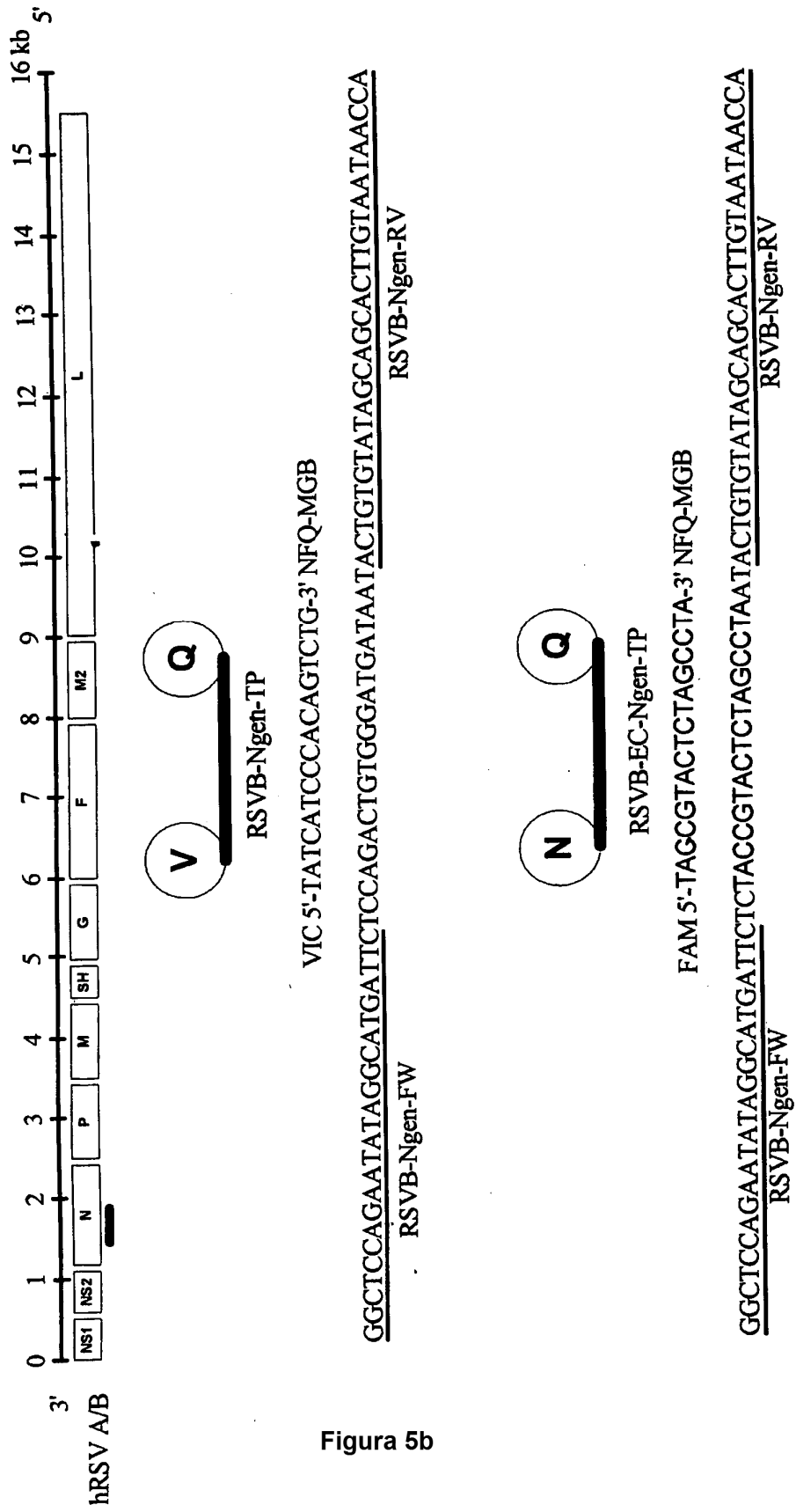
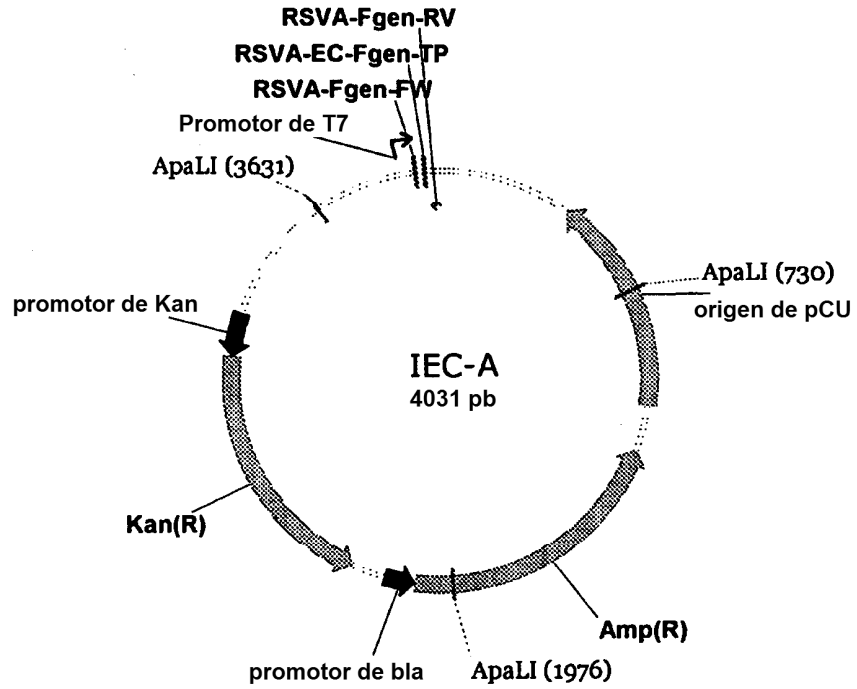


Figura 5b

(A)



(B)

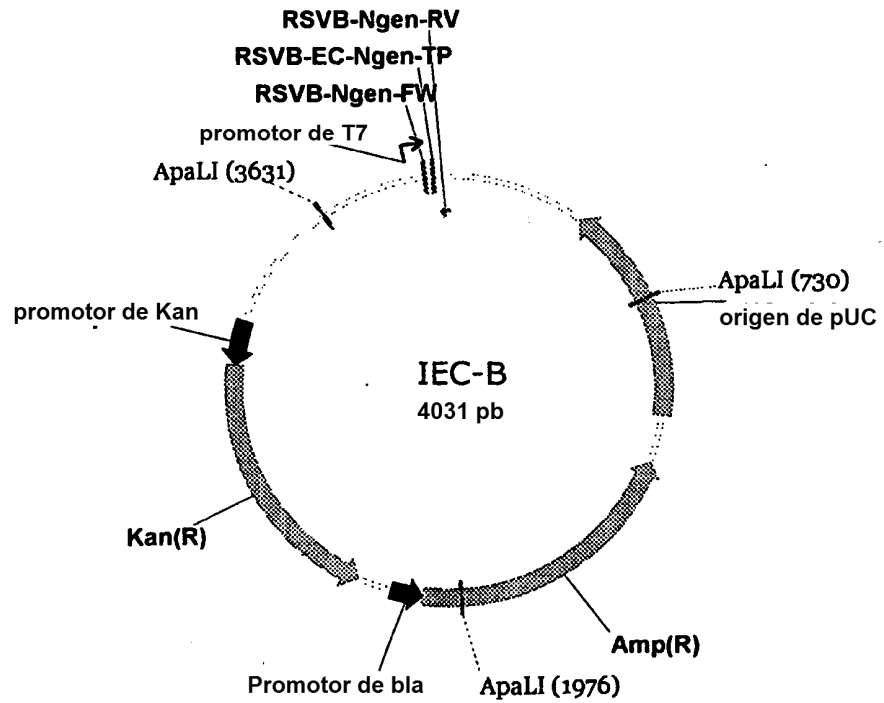


Figura 6