

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 031**

21 Número de solicitud: 201431573

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

27.10.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.05.2016

Fecha de concesión:

26.06.2017

45 Fecha de publicación de la concesión:

03.07.2017

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2015/070774

73 Titular/es:

**SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (100.0%)
Avda. de la Constitución, 18
41071 Sevilla (Sevilla) ES**

72 Inventor/es:

TENORIO ABREU, Alberto

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

54 Título: **Método de detección del virus sincitial respiratorio humano tipo A, del virus sincitial respiratorio humano tipo B y del metapneumovirus humano**

57 Resumen:

Método de detección del virus sincitial respiratorio humano tipo A, del virus sincitial respiratorio humano tipo B y del metapneumovirus humano.

Método de detección simultánea del virus sincitial respiratorio humano A, del virus sincitial respiratorio humano B y del metapneumovirus humano en muestras biológicas, cebadores, sondas, composiciones kit y sus usos.

ES 2 572 031 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

DESCRIPCION

Método de detección del virus sincitial respiratorio humano tipo A, del virus sincitial respiratorio humano tipo B y del metapneumovirus humano

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se encuentra dentro del campo de la Biotecnología. Particularmente, se refiere a un método que permite la amplificación genómica en tiempo real del virus sincitial respiratorio humano tipo A (VRS A), del virus sincitial respiratorio humano tipo B (VRS B) y del metapneumovirus humano (hMPV) en una muestra biológica aislada. Por tanto, el método facilita la detección de estos virus en una muestra del paciente.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

Los tres virus más importantes implicados en procesos de bronquiolitis agudas en lactantes son: el VRS A, VRS B y hMPV.

20

El Virus Respiratorio Sincitial (VRS) es un mixovirus de ARN del género *Pneumovirus* que pertenece a la familia de los *Paramyxoviridae*. Este virus es altamente contagioso y se difunde con las secreciones nasofaríngeas de los individuos infectados por contacto directo o a través de las gotas de saliva. El VRS puede causar grandes epidemias de bronquiolitis y neumonías, que afectan especialmente a niños pequeños de todo el mundo. Se estima que el VRS solo en los Estados Unidos es responsable de 100.000 hospitalizaciones al año (Tang y Crowe, 2007. *Manual of clinical microbiology*. 9ª Edición vol. 2). Concretamente en España, se estima que las infecciones por VRS originan anualmente entre 15.000-20.000 visitas pediátricas de urgencia (Datos de la Asociación Española de Pediatría).

25

En base a sus diferencias antigénicas se identifican dos grupos principales de VRS: A y B, que se diferencian sobre todo en la glicoproteína G. Las diferentes secuencias de la proteína G dan lugar a 6 subgrupos del A y 3 subgrupos en el B. No se han demostrado diferencias clínicas ni epidemiológicas entre ambos grupos, aunque es probable que haya unas cepas más virulentas que otras.

30

El diagnóstico rápido y preciso de la infección por VRS es crucial para el manejo del paciente y el control de la infección (Woo *et al.*, 1997. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1579-1581;

35

Adcock *et al.*, 1997. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 16, 842-846; Doherty *et al.*, 1998. *J. Hosp. Infect.* 38, 203-206). La infección por VRS se identifica por métodos de diagnóstico rápido basados en la inmunofluorescencia e inmunoensayo enzimático en muestras de moco nasal. La sensibilidad de estos métodos está entre el 80-90%. También se puede identificar por
5 aislamiento del virus en cultivos celulares de secreciones respiratorias aunque requiere de 3 a 5 días. Actualmente las líneas de investigación están dirigidas a optimizar pruebas de reacción en cadena de la polimerasa que aumentan la sensibilidad y especificidad de la prueba.

10 El metapneumovirus humano es un virus ARN del género *Metapneumovirus* que pertenece a la familia de los *Paramyxoviridae*. Este virus puede provocar enfermedades respiratorias de cierta gravedad, sobre todo en niños (incluido cuadros de bronquiolitis aguda semejante a los producidos por los VRS).

15 El hMPV posee características propias muy similares al VRS, al igual que lo es su epidemiología, su distribución estacional y sus manifestaciones clínicas. Al igual que el VRS, el hMPV se presenta principalmente en los meses de invierno (aunque también suele prolongarse durante los meses de primavera). Además, se ha encontrado hMPV en el 70% de los pacientes que eran ventilados en unidades de cuidados intensivos pediátricos debido
20 a VRS (Greensill *et al.*, 2003. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 372-375). Por otro lado, se ha descrito que la bronquiolitis fue la manifestación primaria de infección por hMPV más habitual (62%) en los pacientes.

El diagnóstico en la actualidad de la infección de hMPV se realiza mediante cultivo celular,
25 serología y microscopía electrónica. Pero las líneas más actuales están dirigidas al diagnóstico por RT-PCR que aumentarían la sensibilidad (Mackay *et al.*, 2003. *J. Clin. Microbiol.* 41, 100-105).

Con el objetivo principal de evitar las dificultades que se presentan en el diagnóstico de la
30 bronquiolitis, la cual es generada mayoritariamente por los virus descritos anteriormente, la presente invención se refiere a un método basado en la técnica de RT-PCR múltiple a tiempo real para asistir al facultativo en la diagnosis de la bronquiolitis cuando se detecta la presencia de VRS y hMPV.

35

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Un **primer aspecto** de la invención se refiere a un método, de ahora en adelante primer método de la invención, de detección del virus VRS A, del virus VRS B, del virus hMPV, o
5 cualquiera de sus combinaciones, que comprende:

- i) extraer el ARN de una muestra biológica aislada de un individuo,
- ii) detección de las secuencias de nucleótidos que comprenden la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, y SEQ ID NO: 9.

10 En una realización preferida de este aspecto e la invención, la detección se realiza de manera simultánea. Más preferiblemente, se realiza mediante la amplificación de las secuencias de nucleótidos recogidas en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, y SEQ ID NO: 9 por RT-PCR. Aún más preferiblemente, la detección se realiza empleando un conjunto de
15 parejas de cebadores que comprenden las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8. Aún más preferiblemente, la extracción del ácido nucleico incluye una etapa de purificación. Aún más preferiblemente, la reacción de PCR es una reacción multiplex. Aún más preferiblemente, el primer método de la invención además comprende una etapa:

- iii) revelado y comparación

20 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la muestra biológica es un aspirado nasal.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la muestra biológica es un
25 lavado broncoalveolar, un broncoaspirado, un cepillado telescopado o un lavado nasofaríngeo.

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a los cebadores, de ahora en adelante cebadores de la invención, de secuencia nucleotídica:

- 30 a) SEQ ID NO: 1,
- b) SEQ ID NO: 2,
- c) SEQ ID NO: 4,
- d) SEQ ID NO: 5,
- e) SEQ ID NO: 7, y
- 35 f) SEQ ID NO: 8.

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a las sondas, de ahora en adelante sondas de la invención, de secuencia nucleotídica:

- a) SEQ ID NO: 3,
- b) SEQ ID NO: 6, y
- 5 c) SEQ ID NO: 9.

Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere al uso de los cebadores de la invención, y/o las sondas de la invención, para la detección del virus VRS A, del virus VRS B y del virus hMPV. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la detección es simultánea.

10

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la pareja de cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, y la sonda SEQ ID NO: 3, se utilizan para la detección del VRS A.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la pareja de cebadores SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, y la sonda SEQ ID NO: 6, se utilizan para la detección del VRS B.

15

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la pareja de cebadores SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, y la sonda SEQ ID NO: 9, se utilizan para la detección del hMPV.

20 Un **quinto aspecto** de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y/o SEQ ID NO: 9, o cualquiera de sus combinaciones.

25 En una realización preferida, la composición de la invención comprende las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8. En otra realización preferida, la composición de la invención comprende las sondas con secuencias que comprenden las mostradas en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 9.

30 En otra realización preferida, la composición de la invención comprende simultáneamente las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9.

Un **sexto aspecto** de la invención se refiere al kit o dispositivo, kit o dispositivo de la invención, que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ

35

ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y/o SEQ ID NO: 9, o cualquiera de sus combinaciones.

5 En una realización preferida, la composición de la invención comprende las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8. En otra realización preferida, la composición de la invención comprende las sondas con secuencias que comprenden las mostradas en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 9.

10 En otra realización preferida, la composición de la invención comprende simultáneamente las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9.

15 Un **séptimo aspecto** de la invención se refiere al uso de la composición de la invención, o el kit o dispositivo de la invención, para la detección del virus VRS A, del virus VRS B y del virus hMPV, o cualquiera de sus combinaciones, en una muestra biológica.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la detección se realiza de manera simultánea.

20 Un **octavo aspecto** de la invención se refiere a un medio de almacenamiento legible por un ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos del método de la invención.

25 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el medio de almacenamiento legible comprende al menos una secuencia comprendida en cualquiera de las sondas de la invención.

30 En otra realización preferida de este aspecto de la invención que comprende oligonucleótidos o microarreglos de canal único diseñados a partir de al menos una secuencia conocida o un ARNm comprendida cualquiera de las sondas de la invención.

35 Un **noveno aspecto** de la invención se refiere a una señal transmisible que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos del método de la invención.

Un **décimo aspecto** de la invención se refiere a un programa de ordenador almacenado en

el medio legible por un ordenador de la invención, que comprende código de software adaptado para llevar a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5

Los autores de la presente invención han analizado el material genético de los virus más relevantes relacionados con la bronquiolitis y han generado un método para la detección de los mismos.

10 La presente invención se refiere a un método, cebadores, sondas, composiciones, kits para su uso en la detección del VRS A, del VRS B y del hMPV en muestras biológicas.

Por tanto, un **primer aspecto** de la invención se refiere a un método, de ahora en adelante primer método de la invención, de detección del virus VRS A, del virus VRS B, del virus
15 hMPV, o cualquiera de sus combinaciones, que comprende:

- i) extraer el ARN de la muestra biológica aislada de un individuo,
- ii) detección de las secuencias de nucleótidos que comprenden la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, y SEQ ID NO: 9.

20 En una realización preferida de este aspecto e la invención, la detección se realiza de manera simultánea. Más preferiblemente, se realiza mediante la amplificación de las secuencias de nucleótidos recogidas en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, y SEQ ID NO: 9 por RT-PCR. Aún más preferiblemente, la detección se realiza empleando un conjunto de parejas de cebadores que comprenden las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2; SEQ
25 ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8. Aún más preferiblemente, la extracción del ARN/ADN incluye una etapa de purificación. Aún más preferiblemente, la reacción de PCR es una reacción multiplex. Aún más preferiblemente, el primer método de la invención además comprende una etapa:

- iii) revelado y comparación

30

En una realización preferida, el paso iii) se realiza con un termociclador a tiempo real que lee la fluorescencia emitida por diferentes canales, con su correspondiente longitud de onda. En una realización aún más preferida se utilizan 5 canales: 3 para los virus, 1 para el control de reacción y 1 para el control comparador con ruido de fondo.

35

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la muestra biológica es un aspirado nasal.

5 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la muestra biológica es un lavado broncoalveolar, un broncoaspirado, un cepillado telescopado o un lavado nasofaríngeo.

10 Los pasos (ii) y/o (iii) de los métodos descritos anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la detección de la cantidad en el paso (ii) o la comparación computerizada en el paso (iii).

15 Una "muestra biológica aislada" incluye, pero sin limitarnos a, células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. Preferiblemente, la muestra biológica aislada de un individuo del paso (i) es el un aspirado nasal.

20 El término "individuo", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos. El término "individuo" no pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier edad, sexo y condición física.

25 El término "comparación", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la comparación del resultado de la amplificación de la muestra biológica a analizar, también llamada muestra biológica problema, con una amplificación de una o varias muestras de referencia deseable. La muestra de referencia puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. La comparación descrita en el apartado (iii) del método de la presente invención puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.

30 El término "PCR" corresponde a las siglas de reacción en cadena de la polimerasa mediante la cual se pueden obtener millones de copias de las regiones de ADN deseadas. Se caracteriza por el empleo de parejas de cebadores que acotan la región de la que se realizarán millones de copias, lo que también se conoce como "amplificar ADN" durante la PCR. La PCR está compuesta por un número determinado de ciclos, compuestos a su vez
35 por tres fases en las que las hebras de ADN se separan, se unen los cebadores y se elongan las nuevas hebras de ADN. En cada ciclo, si la eficiencia de la reacción es del

100% se produce un crecimiento exponencial de los fragmentos de ADN objeto de la amplificación.

5 En el caso de la invención, el término "RT-PCR" corresponde a las siglas de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa. Es una variante de PCR y también se usa para generar una gran cantidad de copias de ADN (amplificación). En la RT-PCR, sin embargo, una hebra de ARN es retrotranscripta en ADN complementario (ADNc) usando una enzima llamada transcriptasa inversa, y el resultado, se amplifica en una PCR tradicional. La amplificación exponencial mediante PCR en Transcripción Reversa supone
10 una técnica altamente sensible, que puede detectar un número de copias de ARN muy bajo. Puede utilizarse como método de detección molecular de genes y para estudiar el genoma de virus de ARN como los retrovirus. Otro de sus usos se relaciona con la cuantificación de la expresión génica, mediante la combinación de esta técnica con el análisis de Northern blot. Una de las características más importantes es que en el proceso de RT-PCR, el ADNc
15 generado ya no lleva los intrones que sí tendría el ADN original. De este modo, al expresar el ADNc producto de la RT-PCR, se generará un ARNm formado exclusivamente por exones.

En la presente invención se entiende por "Reacción de amplificación multiplex" a la reacción
20 PCR en la cual se amplifica más de una secuencia de ADN en una misma reacción, mediante el empleo de dos o más parejas de cebadores en único tubo junto con el resto de los reactivos de la reacción con el fin de amplificar simultáneamente múltiples secuencias de ADN.

25 El término "oligonucleótido" hace referencia a la secuencia de bases de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster, habitualmente no mayores de 50 nucleótidos.

Las "condiciones de amplificación" o "condiciones de extensión" se refieren indistintamente a condiciones bajo las cuales una polimerasa puede añadir nucleótidos al extremo 3' de un
30 polinucleótido. Dichas condiciones de amplificación o extensión son muy conocidas en la técnica (Sambrook y Russell, 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, 1987-2007, John Wiley & Sons.)

35 Por "virus" en esta memoria, se entienden todos los agentes infecciosos microscópicos acelulares que solo pueden multiplicarse dentro de las células de otros organismos.

El VRS pertenece al género *Pneumovirus*, que se engloba dentro del Dominio *Acytota*, Grupo V: Virus ARN monocatenario negativo, Orden *Mononegavirales*, Familia *Paramyxoviridae*, Subfamilia *Pneumovirinae*.

- 5 El hMPV pertenece al género *Metapneumovirus*, que se engloba dentro del Dominio *Acytota*, Grupo V: Virus ARN monocatenario negativo, Orden *Mononegavirales*, Familia *Paramyxoviridae*, Subfamilia *Pneumovirinae*.

10 La familia *Paramyxoviridae* está formada por virus parecidos a los ortomixovirus, pero con diferencias que justifican la separación de familias. Los virus de la parainfluenza, el sarampión, la parotiditis, el virus sincitial respiratorio y el metapneumovirus forman parte de esta familia, y afectan principalmente a la población infantil.

15 Los *Paramyxovirus* miden entre 156-300nm, tienen cubierta lipídica, genoma de ARN de una cadena negativa, doble membrana lipídica derivada de la célula huésped, glucoproteínas de superficie que forman proyecciones HN con acción neuroaminidasa y hemaglutinación, y una F que participa en la penetración viral y estimula la fusión de membranas. Además la proteína de membrana M que forma parte de la cubierta lipídica y la ribonucleoproteína NP que es antígeno fijador del complemento. Estos virus abordan las vías respiratorias y se
20 instalan con más frecuencia en la parte altas de estas vías, donde invaden las células epiteliales, se replican intensamente, generan la formación de células gigantes y producen citolisis, pero no producen estados virémicos (salvo excepcionalmente), por lo que la infección circunscribe al sistema respiratorio. Cuando invade regiones más bajas produce bronquitis, bronquiolitis y neumonía. (Microbiología y Parasitología Humana. Bases
25 etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ª Edición. Editorial Médica Panamericana)

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a los cebadores, de ahora en adelante cebadores de la invención, de secuencia nucleotídica:

- 30 a) SEQ ID NO: 1,
b) SEQ ID NO: 2,
c) SEQ ID NO: 4,
d) SEQ ID NO: 5,
e) SEQ ID NO: 7, y
35 f) SEQ ID NO: 8.

En la presente invención se entiende por "cebador" o "primer" a la secuencia de nucleótidos a partir de la cual la ADN polimerasa inicia la síntesis de una molécula nueva de ADN. Los cebadores son secuencias nucleotídicas cortas, aproximadamente de 15-24 nucleótidos de longitud que se pueden alinear con una hebra de ADN diana gracias a la complementariedad de bases para formar un híbrido entre el cebador y la hebra diana de ADN. Después, el enzima ADN polimerasa puede extender el cebador a lo largo de la hebra diana de ADN. Los métodos para preparar y usar cebadores se describen, por ejemplo en Sambrook *et al.* (2001) y Ausubel *et al.* (1999).

En el contexto de la presente invención se entiende "extracto de ARN/ADN", cuando tras someter la muestra biológica a un procedimiento de extracción, separación, purificación o clonación de ácidos nucleicos, entre otros, se obtiene como resultado ya sea en seco, en solución, unido o no a otras moléculas, adherido o no a diversas sustancias o lechos, materia en la que el ARN/ADN se encuentra en mayor proporción relativa respecto al resto de moléculas presentes, en comparación con la muestra biológica de partida.

Los cebadores de la invención comprenden las siguientes secuencias:

SEQ ID NO: 1: 5'-AGCAAATCAATGTCACCTAACACC-3'

SEQ ID NO: 2: 5'-TGTAGTACCATTGTGTGTTGTG-3'

SEQ ID NO: 4: 5'-GACATGTGTTTATTACCATTTTAG-3'

SEQ ID NO: 5: 5'-GGTGTGTCGTTTGTAGTGCT-3'

SEQ ID NO: 7: 5'-ACAATGGCAACTTTGCTTAAAGAA-3'

SEQ ID NO: 8: 5'-TGCTGAAGGCCTCTGATTTTG-3'

Así, en las realizaciones preferidas de la invención las parejas de cebadores usadas comprenden SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 y/o SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.

En el contexto de la presente invención se entiende por "pareja de cebadores" o "*primer pair*", al conjunto de dos cebadores que, empleados en una misma reacción de amplificación o PCR, permiten obtener múltiples copias de una secuencia diana de ADN. Cada uno de los cebadores hibrida con la secuencia diana, de manera que se amplifica la secuencia de nucleótidos acotada mediante cada pareja de cebadores. La extensión de los cebadores durante los ciclos de PCR determina la multiplicación exponencial 2^N de la secuencia de nucleótidos acotada por los cebadores, siendo N el número de ciclos de la reacción PCR.

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a las sondas, de ahora en adelante sondas de la invención, de secuencia nucleotídica:

- a) SEQ ID NO: 3,
- b) SEQ ID NO: 6, y
- 5 c) SEQ ID NO: 9.

En el contexto de la presente invención, el término "sonda" se define como un oligonucleótido que es complementario o sustancialmente complementario a la secuencia del amplicón, dentro de los límites de los cebadores. En la presente forma de realización preferida, la sonda de captura no se encuentra provista de la adición de una cola, pero
10 podría añadirse una cola, con desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos. La sonda se puede producir preferiblemente sintéticamente o como un subconjunto de ADN obtenido naturalmente, preparados por metodologías estándar (por ejemplo, mediante digestión por endonucleasas de restricción).

15 Por lo tanto, no existe, excepto para la función pretendida, ninguna diferencia fundamental entre un "cebador", un "oligonucleótido" o una "sonda" según la invención.

Preferiblemente, las sondas de la invención comprenden las siguientes secuencias:

- SEQ ID NO: 3: 5'-TCAGCCGACCCAACCA-3'
- 20 SEQ ID NO: 6: 5'-ACTCACCTAATCAATCAA-3'
- SEQ ID NO: 9: 5'-CATCAGGCAATATTC-3'

Así, las sondas pueden ser de entre 10 y 200 nucleótidos, más preferiblemente, de entre 12 y 50 nucleótidos, y aún más preferiblemente del número de nucleótidos de las sondas de la
25 invención.

Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere al uso de los cebadores de la invención, y/o las sondas de la invención, para la detección del virus VRS A, del virus VRS B y del virus hMPV. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la detección es
30 simultánea.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la pareja de cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, y la sonda SEQ ID NO: 3, se utilizan para la detección del VRS A.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la pareja de cebadores SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, y la sonda SEQ ID NO: 6, se utilizan para la detección del VRS B.

5 En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la pareja de cebadores SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, y la sonda SEQ ID NO: 9, se utilizan para la detección del hMPV.

Un **quinto aspecto** de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8
10 y/o SEQ ID NO: 9, o cualquiera de sus combinaciones.

En una realización preferida, la composición de la invención comprende las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8. En otra realización preferida, la composición de la invención comprende las sondas con
15 secuencias que comprenden las mostradas en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 9.

En otra realización preferida, la composición de la invención comprende simultáneamente las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5,
20 SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9.

Un **sexto aspecto** de la invención se refiere al kit o dispositivo, kit o dispositivo de la invención, que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y/o SEQ ID NO: 9, o
25 cualquiera de sus combinaciones.

En una realización preferida, la composición de la invención comprende las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8. En otra realización preferida, la composición de la invención comprende las sondas con
30 secuencias que comprenden las mostradas en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 9.

En otra realización preferida, la composición de la invención comprende simultáneamente las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5,
35 SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9.

El kit de la invención puede incluir controles positivos y/o negativos. El kit además puede contener, sin ningún tipo de limitación, tampones, soluciones de extracción de proteínas, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc.

5 Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo los métodos de la invención.

Un **séptimo aspecto** de la invención se refiere al uso de la composición de la invención, o el kit o dispositivo de la invención, para la detección del virus VRS A, del virus VRS B y del
10 virus hMPV, o cualquiera de sus combinaciones, en una muestra biológica.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la detección se realiza de manera simultánea.

15 Un **octavo aspecto** de la invención se refiere a un medio de almacenamiento legible por un ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos del método de la invención.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el medio de almacenamiento
20 legible comprende al menos una secuencia comprendida en cualquiera de las sondas de la invención.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención que comprende oligonucleótidos o microarreglos de canal único diseñados a partir de al menos una
25 secuencia conocida o un ARNm comprendida cualquiera de las sondas de la invención.

Un **noveno aspecto** de la invención se refiere a una señal transmisible que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos del
30 método de la invención.

Así, por ejemplo, las secuencias de oligonucleótidos pueden ser construidas en la superficie un chip mediante el elongamiento secuencial de una cadena en crecimiento con un sólo nucleótido utilizando fotolitografía. Así, los oligonucleótidos son anclados por el extremo 3' mediante un método de activación selectiva de nucleótidos, protegidos por un reactivo
35 fotolábil, mediante la incidencia selectiva de luz a través de una fotomáscara. La fotomáscara puede ser física o virtual.

La síntesis *in situ* sobre un soporte sólido (por ejemplo, vidrio), podría hacerse mediante tecnología chorro de tinta (ink-jet), lo que requiere sondas más largas. Los soportes podrían ser, pero sin limitarse, filtros o membranas de NC o nylon (cargadas), silicio, o Portas de vidrio para microscopios cubiertos con aminosilanos, polilisina, aldehídos o epoxy. La sonda
 5 es cada una de las muestras del chip. El target es la muestra a analizar: RNA mensajero, RNA total, un fragmento de PCR, etc.

Una secuencia de ácido nucleico o polinucleótido puede comprender las cinco bases que aparecen biológicamente (adenina, guanina, timina, citosina y uracilo) y/o bases distintas de
 10 las cinco que aparecen biológicamente. Estas bases pueden servir para distintos propósitos, por ejemplo, para estabilizar o desestabilizar la hibridación; para estimular o inhibir la degradación de la sonda; o como puntos de unión para restos detectables o restos de apantallamiento. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede contener uno o más restos de base modificados, no estándar, derivatizados, incluyendo, pero sin limitarse a, N⁶-
 15 metil-adenina, N⁶-terc-butil-bencil-adenina, imidazol, imidazoles sustituidos, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N⁶-isopenteniladenina, 1- metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-
 20 metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N⁶-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N⁶-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético, wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo (es decir, timina), éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)_w, 2,6-diaminopurina, y 5-propinil pirimidina. Otros ejemplos de restos de bases modificados, no estándar, o derivatizados pueden encontrarse en las Patentes de EEUU Nos. 6.001.611; 5.955.589; 5.844.106; 5.789.562; 5.750.343; 5.728.525; y 5.679.785. Además, una secuencia de ácido nucleico o polinucleótido puede comprender uno o más restos de azúcares modificados
 30 incluyendo, pero sin limitarse a, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y una hexosa.

Un **décimo aspecto** de la invención se refiere a un programa de ordenador almacenado en el medio legible por un ordenador de la invención, que comprende código de software adaptado para llevar a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10 **Figura 1.** Fundamento básico de la técnica. Sonda TaqMan unida al ADN complementario con un fluoróforo en un extremo (azul) y un inhibidor de la fluorescencia en el otro (blanco). Al generar la hebra complementaria, la Taq polimerasa por su actividad exonucleasa al llegar al punto donde se encuentra unida la sonda, la digiere en nucleótidos y libera el fluoróforo emitiendo luz que es detectado y cuantificado representado por una curva de
15 amplificación.

EJEMPLOS DE LA INVENCION

Diseño Experimental

20 Se realizó un diseño de sondas y *primers* para la detección de los tres virus mediante la aplicación informática *primers express*, depurando y perfeccionando los oligonucleótidos de forma manual. El resultado se recoge en las siguientes tablas:

SEQ ID NO:	VRS A	Secuencias	Tm	Contenido en GC (%)
1	Forward (FVRSA)	5'-AGCAAATCAATGTCACCTAACACC-3'	59,2	39
2	Reverse (RVRSA)	5'-TGTAGTACCATTGTGTGTTGTG-3'	58,4	41
3	Sonda MGB	5'-TCAGCCGACCCAACCA-3'		63

SEQ ID NO:	VRS B	Secuencias	Tm	Contenido en GC (%)
4	Forward (FVR SB)	5'-GACATGTGTTTATTACCATTTTAG-3'	56,6	29
5	Reverse (RVRSB)	5'-GGTGTGTCGTTTGTAGTGCT-3'	59,5	48

6	Sonda MGB	5'-ACTCACCTAATCAATCAA-3'		
---	-----------	--------------------------	--	--

Cada reacción se llevó a cabo en un volumen total de 25 µl (12,5 µl master mix, 6 µl de *primers* incluidos los tres pares de cada virus a detectar, 1,5 µl de dilución de las tres sondas, 1 µl de enzima taq polimerasa y 4 µl de eluido problema con el extracto de ácidos nucleicos de la muestra). La cantidad de sonda en cada reacción fue de 3-4 pmoles y la de los *primers* fue de 10 pmoles. El termociclador a tiempo real se programó con una primera fase de retrotranscripción (RT) que consistió en un ciclo de 40°C durante 45 minutos para que todo el ARN pasase a ADN, y una segunda fase de PCR, con 40 ciclos de 95°C a 55°C.

SEQ ID NO:	Hmpv	Secuencias	Tm	Contenido en GC (%)
7	Forward (FMET)	5'-ACAATGGCAACTTTGCTTAAAGAA-3'	58,3	33
8	Reverse (RMET)	5'-TGCTGAAGGCCTCTGATTTTG-3'	59,5	48
9	Sonda MGB	5'-CATCAGGCAATATTC-3'	69	40

10

Resultados

Las primeras pruebas con resultados preliminares satisfactorios se detallan a continuación: Se han analizado un total de 121 muestras de aspirados nasales procedentes de pacientes con bronquiolitis. Con las técnicas actuales de las que dispone el centro, se detectaron 53 VRS mediante el test rápido y 1 metapneumovirus mediante la técnica de amplificación genómica NASBA. Con la nueva RT-PCR en ensayo además de esos 53 VRS y 1 metapneumovirus, se detectaron 11 VRS y 2 metapneumovirus, en total 64 VRS (34 VRS A y 30 VRS B) y 3 metapneumovirus. Es decir, casi un 20% más de VRS y un 66% más de hMPV.

20

Los cálculos de validez de pruebas diagnósticas para el Test rápido BinaxNow RSV en comparación a la nueva RT-PCR, realizado mediante el programa Epidad 3.1, son los siguientes:

Tabla1. Pruebas diagnósticas. Test rápido VRS BinaxNow (Nivel de confianza: 95%)

Parámetros	Valores	Intervalo confianza (IC 95%)
Sensibilidad (%)	82,81	72,79-92,84
Especificidad (%)	100	99,12-100

Índice de validez (%)	90,91	85,37-96,44
Valor predictivo + (%)	100	99,06-100
Valor predictivo - (%)	83,82	74,34-93,31
Prevalencia (%)	52,89	43,59-62,2
Índice de Youden	0,83	0,74-0,92
Razón de verosimilitud +	-	-
Razón de verosimilitud -	0,17	0,1-0,29

Los datos preliminares muestran una Sensibilidad del 82,8% y una Especificidad del 100% para la prueba rápida. Con la prueba rápida se pierde el diagnóstico etiológico de casi un 20% de enfermos respecto a la nueva RT-PCR objeto de invención.

5

Se ha realizado también una prueba adicional de especificidad y discriminación en caso de coinfección, ensayando en un análisis una mezcla de tres eluidos con cada uno de los tres virus diferentes que es capaz de detectar la RT-PCR. Siendo probado la capacidad de detectar sin interferencias una posible coinfección triple en una misma muestra y en un solo análisis.

10

También se ha realizado una prueba de especificidad para el VRS-A, VRS-B y hMPV mediante secuenciación de los amplices obtenidos por RT-PCR. Dichos amplicones mostraron una homología del 100% con las bases de datos del Genbank.

15

Se han realizado pruebas preliminares de sensibilidad, consistente en determinar el límite de detección del número de copias para cada uno de los 3 virus estudiados. La prueba se realizó mediante cuantificación por nanodrop, siendo el límite de detección menor de 10 copias/ml de muestra para cada uno de los virus. Esta sensibilidad es excelente, aunque como se ha mencionado son datos preliminares, ya que la cuantificación se realizó por nanodrop de amplicones producto de reacción de PCR (pudiendo contener otras impurezas causantes de interferencias). Actualmente estamos a la espera de poder realizar las pruebas de sensibilidad por el método de referencia consistente en la clonación de los amplicones en cepas de *E. coli* para posterior purificación y cuantificación, haciendo diluciones seriadas para obtener el límite exacto de detección para cada uno de los virus.

25

REIVINDICACIONES

- 1.- Método de detección del virus sincitial respiratorio humano A (VRS A), del virus sincitial respiratorio humano B (VRS B) y del metapneumovirus humano (hMPV) o cualquiera de sus combinaciones, que comprende:
- 5
- i. extraer el ARN de una muestra biológica aislada de un individuo,
 - ii. detección de las secuencias de nucleótidos que comprenden la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 9.
- 10
- 2.- El método según la reivindicación anterior, donde la detección se realiza de manera simultánea.
- 3.- El método según la reivindicaciones 1-2, donde la amplificación de las secuencias de nucleótidos recogidas en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, y SEQ ID NO: 9 se realiza mediante
- 15
- RT-PCR.
- 4.- El método según las reivindicaciones 1-3, donde la detección se realiza empleando un conjunto de parejas de cebadores que comprenden las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.
- 20
- 5.- El método según la reivindicaciones 1-4, donde la extracción del ADN incluye una etapa de purificación.
- 6.- El método según las reivindicaciones 1-5, donde la reacción de PCR es una reacción
- 25
- multiplex.
- 7.- El método según las reivindicaciones 1-6, donde el método además comprende una etapa iii:
- iii. revelado y comparación
- 30
- 8.- El método según las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque la muestra (i) es aspirado nasal.
- 9.- El método según las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque la muestra (i) es un
- 35
- lavado broncoalveolar, un broncoaspirado, un cepillado telescopado o un lavado nasofaríngeo.

10.- Cebadores de secuencia nucleotídica:

a) SEQ ID NO: 1

b) SEQ ID NO: 2

c) SEQ ID NO: 4

5 d) SEQ ID NO: 5

e) SEQ ID NO: 7, y

f) SEQ ID NO: 8.

11.- Sondas de secuencia nucleotídica

10 a) SEQ ID NO: 3

b) SEQ ID NO: 6, y

c) SEQ ID NO: 9.

12.- Uso de los cebadores, según la reivindicación 10, y/o las sondas según la reivindicación

15 11, para la detección del virus VRS A, del virus VRS B y del virus hMPV.

13.- El uso de los cebadores y sondas, según la reivindicación anterior, donde la detección de los virus es simultánea.

20 14.- El uso de los cebadores y sondas según la reivindicación 12, donde la pareja de cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, y la sonda SEQ ID NO: 3, se utilizan para la detección del virus VRS A.

25 15.- El uso de los cebadores y sondas según la reivindicación 12, donde la pareja de cebadores SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, y la sonda SEQ ID NO: 6, se utilizan para la detección del virus VRS B.

30 16.- El uso de los cebadores y sondas según la reivindicación 12, donde la pareja de cebadores SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, y la sonda SEQ ID NO: 9, se utilizan para la detección del virus hMPV.

17.- Composición que comprende simultáneamente las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 9.

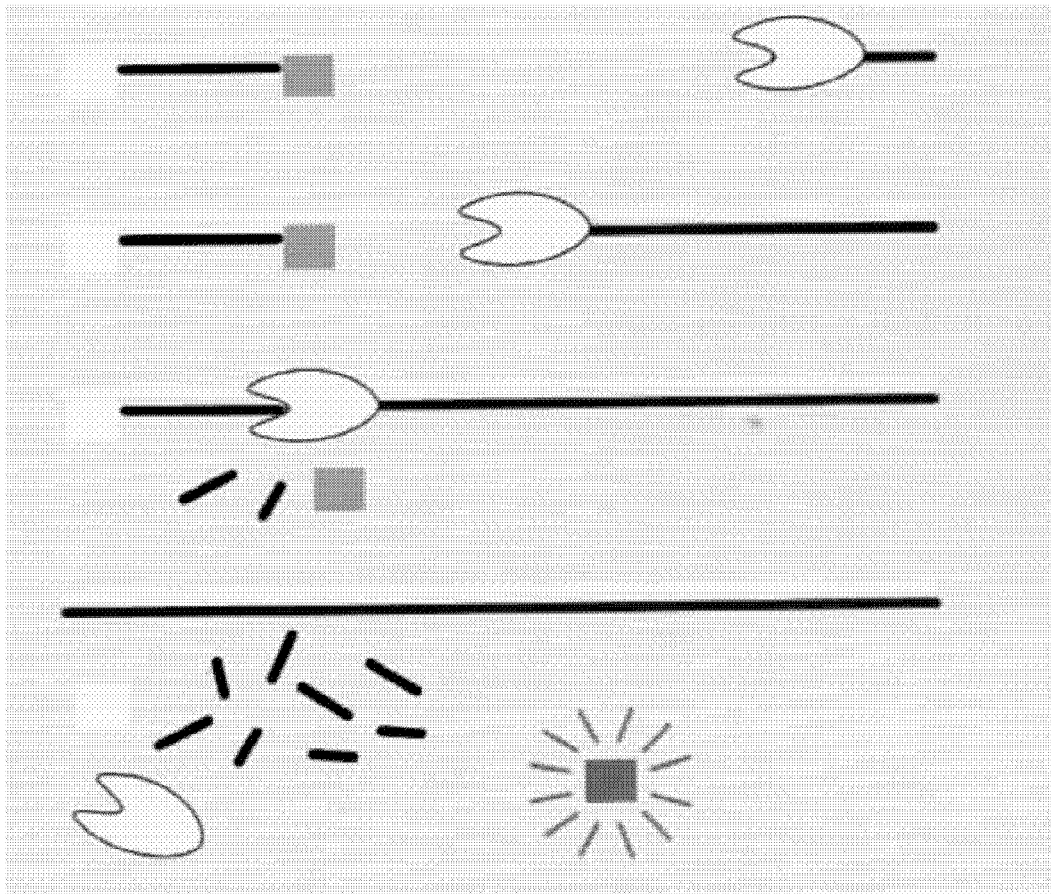
18.- Kit o dispositivo que comprende simultáneamente las secuencias SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 9.

5 19.- Uso de la composición según la reivindicación 17, o del kit o dispositivo según la reivindicación 18, para la detección simultánea del virus VRS A, del virus VRS B y del virus hMPV.

10

15

Fig.1



ES 2 572 031 B1

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SERVICIO ANDALUZ DE SALUD
 <120> Método de detección del virus sincitial respiratorio humano tipo A, del virus sincitial respiratorio humano tipo B y del metapneumovirus humano
 <130> FABIS-13002
 <160> 9
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PRIMER 5'->3'
 <400> 1
 agcaaatcaa tgcactaac acc 23

 <210> 2
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PRIMER 5'->3'
 <400> 2
 tgtagtacca ttgtgtggtg tg 22

 <210> 3
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PROBE 5'->3'
 <400> 3
 tcagccgacc caacca 16

 <210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PRIMER 5'->3'
 <400> 4
 gacatgtgtt tattaccatt ttag 24

 <210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> PRIMER 5'→3'
 <400> 5
 ggtgttgtcg tttgtagtgc t 21

<210> 6
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PROBE 5'→3'
 <400> 6
 actcacctaa tcaatcaa 18

<210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PRIMER 5'→3'
 <400> 7
 acaatggcaa ctttgcttaa agaa 24

<210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PRIMER 5'→3'
 <400> 8
 tgctgaaggc ctctgatttt g 21

<210> 9
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PROBE 5'→3'
 <400> 9
 catcaggcaa tattc 15