

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 836**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2012 PCT/EP2012/060109**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012 WO2012163949**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2012 E 12732552 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016 EP 2714940**

54 Título: **Diagnósticos del virus Torque teno**

30 Prioridad:

31.05.2011 EP 11168280

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

14.06.2017

73 Titular/es:

**INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)
Wim de Körverstraat 35
5831 AN Boxmeer, NL**

72 Inventor/es:

**VAN DEN BORN, ERWIN;
CORNELISSEN-KEIJSERS, VIVIAN;
KEKARAINEN, TUIJA;
SEGALÉS, JOAQUIM;
MARTINEZ-GUINÓ, LAURA y
BALLESTER, MARIA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 616 836 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

Diagnósticos del virus Torque teno

- 5 La presente invención se refiere a un método para la detección de la presencia del virus porcino Torque teno en una muestra, para la detección de la replicación del virus porcino Torque teno en una muestra, a cebadores y sondas de (RT)-PCR del virus Torque teno, y a kits de pruebas de diagnóstico para la detección de la presencia y la replicación del virus porcino Torque teno en una muestra.
- 10 Los virus Torque teno (VTT) son virus no encapsulados pequeños con un genoma de ADN monocatenario (ADNmc) de sentido negativo circular. Pertenecen a la familia *Anelloviridae*. El primer VTT se caracterizó en 1997 por Nishizawa T, et al. El virus se identificó en la sangre de un paciente que sufrió hepatitis post-transfusión y presentaba niveles de las enzimas hepáticas anormales, pero ningún virus de la hepatitis clásico. El VTT se detectó más tarde en muchas especies no humanas tales como primates no humanos,
- 15 gatos, perros, tupayas y cerdos (Leary et al., 1999, Martínez et al., 2006). El virus 1 *Torque teno sus* (VTTSu1) y el virus 2 *Torque teno sus* (VTTSu2), que infectan tanto al cerdo doméstico como al jabalí (y así también conocido como VTT porcino, o brevemente VTTp), se clasifican como pertenecientes al género *Iotatorquevirus*. Se cree que el VTT podría influir en el desarrollo de algunas enfermedades o incluso modular el resultado de la enfermedad por estar presente en la sangre o tejidos (Okamoto, 2009).
- 20 Hasta la fecha no se ha demostrado una función patógena clara de VTT y su función durante la co-infección con otros patógenos es objeto de debate, especialmente con respecto a enfermedades por circovirus porcino (PCVD) (Kekarainen et al., 2006, Ellis et al., 2008, Taira et al., 2009). Los VTT comparten regiones genómicas conservadas y conservan funciones con virus de ADNmc circular económicamente importantes de cerdos y aves de corral, concretamente circovirus-2 porcino (PCV2) y virus de la anemia del pollo (CAV), ambos miembros de la familia *Circoviridae*. Los VTTp tienen una organización genómica que es similar a la de los VTT que infectan a los seres humanos, pero comparten menos del 45 % de identidad de secuencia de nucleótidos (Niel et al., 2005; Okamoto et al., 2002). Estudios recientes también demostraron un alto grado de variabilidad genética entre varios VTTp tales como VTTp1 y VTTp2 (Huang et al., 2010, Cortey et al., 2010). El genoma de VTTp es aproximadamente 2,8 kbp de longitud y pueden deducirse dos posibles genes codificantes de proteína importantes, marco de lectura abierto 1 (ORF) y ORF2, de la secuencia de nucleótidos. Por analogía con los virus de ADNmc relacionados, se cree que ORF1 codifica la proteína de la cápside viral. ORF2 codifica una proteína no estructural, que se supone que participa en la replicación viral (Hijikata et al., 1999; Huang et al., 2010). También se ha asociado VTT de ORF2 a la supresión de la vía NF78 KB (Zheng et al., 2007). El análisis de la secuencia de nucleótidos de VTTp revela la existencia de un ORF adicional, ORF3, generado por el corte y empalme de ARN y comparte su extremo 5' con ORF2. Se cree que ORF3 codifica una proteína no estructural con función desconocida (Okamoto et al., 2000; Biagini et al., 2001).
- 35 La investigación en anellovirus se ha basado casi exclusivamente en técnicas de PCR. Recientemente, se ha informado de sistemas de cultivo de tejido que supuestamente soportan la replicación de VTT humano, aunque con una propagación ineficiente (Kakkola et al., 2007; Leppik et al., 2007). Sin embargo, para VTTp, no se conocen sistemas de cultivo de tejido que soporten el crecimiento y la replicación de VTTp.
- 40 La imposibilidad de cultivar VTTp *in vitro* ha obstaculizado gravemente la investigación de VTTp. Por esa razón, hasta la fecha, los estudios se han centrado principalmente en virología molecular, estrategias de transcripción y expresión de diferentes genotipos de VTT humano. Se produjeron tres ARNm después de la transfección con un plásmido que contiene el genoma de genotipo 1 de VTT impulsado por un promotor putativo en las células COS-1 (Kamahora et al., 2000). Además, después del corte y empalme alternativo y procesos de traducción alternativos, se han descrito seis proteínas de genotipo 6 diferentes y siete proteínas diferentes de la cepa clínica P/1C1 (genotipo 1) (Qiu et al., 2005; Mueller et al., 2008). Se identificaron eventos de corte y empalme adicionales y reordenamientos intragenómicos de VTT en líneas celulares derivados de linfoma y de leucemia de linfocitos T (Leppik et al., 2007).
- 50 Solo hay algunos estudios sobre la localización de la proteína de VTT humano y los resultados son bastante contradictorios. Proteínas de ORF1 y ORF2 de genotipo 6 de VTT se localizaron en el citoplasma de células transfectadas (Qiu et al., 2005). Por el contrario, en un estudio más reciente, la proteína de ORF1 se localizó en el núcleo (específicamente, dentro de los nucléolos), mientras que ORF3 se observó en el núcleo, pero no en un nucléolo. En el mismo estudio, se encontró la proteína de ORF2, como se describe previamente, en el citoplasma (Mueller et al., 2008). Discrepancias observadas entre los estudios sugieren que la diversidad genómica encontrada en cepas clínicas de VTT puede asociarse a diferentes estrategias de expresión y localización de las proteínas virales (Mueller et al., 2008). Se ha sugerido que el perfil transcripcional de VTTp podría ser similar al encontrado en VTT humanos (Okamoto et al., 2002), pero todavía se carece de evidencia experimental.
- 60 Debido a la imposibilidad de propagar VTTp en cultivo celular, la detección y el diagnóstico de VTTp se basan actualmente en métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencionales. Especialmente para la detección de virus de ADNmc tipo VTT que tienen genomas extremadamente variables incluso dentro de los subgrupos que infectan el mismo huésped específico o grupo de huéspedes, es crucial la elección de sitios de unión del cebador de PCR apropiados y, si se desea, sitios de unión de la sonda.
- 65 Un problema general de cebadores de PCR para la detección de VTTp es que, aunque pueden tener una alta

especificidad por cepas de VTTp del mismo origen geográfico y el mismo genotipo, pueden posiblemente no reaccionar con cepas de VTTp de un origen geográfico diferente u otro genotipo. Como consecuencia, la presencia de algunas cepas de VTTp en piaras de cerdos, además de en material biológico, puede pasar inadvertida.

5 Es evidente que herramientas de diagnóstico fiables y universales para la detección de VTTp en piaras de cerdos son esenciales, aunque solo sea para detectar la presencia o ausencia de VTTp en un animal.

Tales herramientas también serían esenciales para monitorizar la propagación geográfica de VTTp. Esto podría revelar, entre otras cosas, la presencia o ausencia de cepas de VTTp de un cierto origen geográfico o un cierto genotipo en cerdos en una ubicación geográfica distinta.

10 También hay la necesidad de herramientas de diagnóstico fiables en el campo de la producción de vacunas. Muchas de las vacunas de virus porcinos (y no solo las vacunas porcinas) se producen en cultivos celulares. Ciertos componentes de los medios de cultivo celular y líneas celulares son de origen porcino. Así, es importante comprobar la ausencia de VTTp en estos cultivos celulares y en las vacunas producidas usando estos cultivos celulares.

15 Existe una necesidad aún mayor de métodos cuantitativos y herramientas de diagnóstico que sean capaces de dar una indicación de no solo de la presencia, sino también de la cantidad, de VTTp en diversos tipos de material de muestra. Esto podría, entre otras cosas, facilitar enormemente los estudios sobre la patología de VTTp.

20 Y, lo que es más importante, los VTTp podrían estar presentes en el tejido con o sin replicación ahí. Se sabe que el VTT se encuentra en prácticamente todos los tejidos y órganos, pero se desconoce si solo se encuentra debido a que se transportó a este tejido por la sangre o si está replicándose activamente ahí.

Por lo tanto, es altamente necesaria una prueba que podría distinguir entre la mera presencia de VTTp en, por ejemplo, un tejido y replicación activa del virus en ese tejido. Una prueba tal permitiría además detectar si las trazas de VTTp en cultivo celular están o no en una forma de no replicación. Esto podría hacer aún más segura la producción de vacunas de VTTp en cultivo celular.

25 Así, existe una clara necesidad de métodos fiables y herramientas de diagnóstico que sean capaces de detectar cepas de VTTp independientemente del origen geográfico y el genotipo de aquellas cepas de VTTp. Y, además, existe la necesidad de métodos fiables y herramientas de diagnóstico que sean capaces de detectar la actividad de replicación viral de tales cepas de VTTp.

30 Es un objetivo de la presente invención proporcionar tales métodos y herramientas de diagnóstico.

35 Sorprendentemente, ahora se han encontrado conjuntos de cebadores específicos que, si se desea en combinación con una sonda específica, son capaces de detectar la presencia o ausencia de cepas de VTTp, independientemente del origen geográfico o el genotipo de aquellas cepas de VTT.

En un método según la invención, la detección de VTT en una muestra puede hacerse ahora realizando las siguientes etapas del método:

40 a) realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de dicha muestra usando un conjunto de cebador que comprende un cebador directo que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FDNA-VTT que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 1 y un cebador inverso que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido RDNA-VTT-r1 que tiene una secuencia como se muestra en SEQ ID NO.: 2 o un cebador inverso que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido RDNA-VTT-r2 que tiene una secuencia como se muestra en SEQ ID NO.: 3, y

45 b) examinar el resultado de la amplificación por PCR de la etapa (a)

50 El término "cebador" se utiliza para describir un oligonucleótido que es capaz de reconocer, y unirse a, un polinucleótido complementario y de actuar de punto de inicio para la síntesis de ácidos nucleicos o replicación a lo largo de una hebra complementaria.

55 El término "capaz de unirse a un polinucleótido complementario" significa capaz de formar, en condiciones de hibridación, una estructura doble con este polinucleótido.

El término "sonda" se refiere a un oligonucleótido que es complementario a un polinucleótido de interés y capaz de formar, en condiciones de hibridación, una estructura doble con este polinucleótido.

60 La palabra "sonda" tiene básicamente las características de un polinucleótido de cebador que además lleva un marcador específico. Un marcador tal puede ser, entre otros, un fluoróforo, tal como los fluoróforos usados en, por ejemplo, las sondas TaqMan (véase más adelante).

El término "oligonucleótido" se usa en el presente documento para describir un polímero corto de ácidos nucleicos. Tal polímero corto generalmente tendría una longitud de entre 10 y 100 ácidos nucleicos.

65

El término "condiciones de hibridación" se refiere a las condiciones que permiten que el cebador o la sonda se hibriden con el polinucleótido de interés. Estas condiciones dependen de la temperatura y la fuerza iónica de la solución en que tiene lugar la hibridación. Las reacciones y condiciones de hibridación son bien conocidas en la técnica y se describen, entre otros, en el manual estándar de laboratorio por Maniatis/Sambrook (34).

5 Para la determinación de las condiciones de hibridación, básicamente se usan las siguientes fórmulas:

para el cálculo básico de la temperatura de fusión (T_m) para secuencias más largas de 13 nucleótidos, puede usarse la siguiente ecuación:

$$10 \quad T_m = 64,9 + 41 * (yG+zC-16,4)/(wA+xT+yG+zC)$$

donde w, x, y y z son el número de las bases A, T, G y C en la secuencia, respectivamente (de Marmur, J. y Doty, P. (1962) J Mol Biol 5:109- 118)

15 Información adicional se da en: Wallace, R. B., Shaffer, J., Murphy, R. F., Bonner, J., Hirose, T. e Itakura, K. (1979) Nucleic Acids Res 6:3543-3557 y Sambrook, J., y Russell, D. W. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, NY.

La ecuación asume que la hibridación se produce en las condiciones estándar de cebador 50 nM de Na^+ , 50 mM y pH 7.0

20 Para el cálculo de la temperatura de fusión (T_m) ajustada a la sal básica, puede usarse la siguiente ecuación: $T_m = 100,5 + (41 * (yG+zC)/(wA+xT+yG+zC)) - (820/(wA+xT+yG+zC)) + 16,6 * \log_{10}([Na^+])$ donde w, x, y y z son el número de las bases A, T, G y C en la secuencia, respectivamente.

El término $16,6 * \log_{10}([Na^+])$ ajusta la T_m para cambios en la concentración de sales (Se da información adicional en: Howley, P. M.; Israel, M. F.; Law, M-F.; y M.A. Martin "A rapid method for detecting and mapping homology between heterologous DNAs. Evaluation of polyomavirus genomes." J. Biol. Chem. 254, 4876-4883, 1979).

Técnicas de PCR son igualmente bien conocidas en la técnica y se describen más ampliamente en los manuales de laboratorio estándar tales como; "Real-Time PCR: Current Technology and Applications", en "PCR primers, a laboratory manual", y en Maniatis/Sambrook (véanse las referencias en la lista de bibliografía más adelante).

30 El experto se da cuenta de que un cebador o una sonda no necesitan ser totalmente complementarios al polinucleótido de interés, siempre y cuando las condiciones de hibridación sean tales que la hibridación pueda tener lugar a pesar de las complementariedades incompletas.

35 En principio, un desapareamiento de uno o más nucleótidos puede ser compensado reduciendo la T_m o alterando la concentración de sales, por ejemplo, usando las ecuaciones dadas anteriormente o la amplia información en la bibliografía citada anteriormente.

Debe saberse que el uso de un cebador que tiene un desapareamiento, normalmente requiere el uso de condiciones de hibridación menos rigurosas. Y esto a su vez puede algunas veces conducir a una menor especificidad. Esto no necesita ser necesariamente un problema, dado el pequeño tamaño del genoma de VTT. Las posibilidades de un cebador que tiene un desapareamiento de unirse a una secuencia de VTT no específica son muy pequeñas.

40 Sin embargo, es evidente que se prefieren cebadores que comprenden una coincidencia del 100 % de complementariedad con un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 1, 2 o 3.

45 Los cebadores y la sonda según la invención pueden usarse, entre otras cosas, para la detección de VTTp en un animal o una muestra de ese animal.

50 El término "muestra" se usa en el presente documento para referirse a cualquier material biológico que se sospecha que contienen VTTp. El material biológico puede ser, entre otros, tejido tal como tejido de hígado, bazo, óseo o muscular de cerdo, pero también puede ser un líquido corporal tal como, por ejemplo, sangre, orina, materia fecal, líquido amniótico. El material también puede ser un hisopo de cavidad cloacal, oral o nasal o, por ejemplo, células disgregadas.

55 Ni que decir tiene que el material que va a probarse también puede ser de origen no porcino. Es muy posible que especies no porcinas sean sospechosas de portar VTTp, o se prueban con el fin de excluir que porten VTTp.

Una reacción en cadena de la polimerasa, denominada además PCR, comprende las etapas de calentar una molécula de ADN, en presencia de un conjunto de cebador, a una temperatura superior a la temperatura de fusión, seguido de enfriar con el fin de permitir que los cebadores del conjunto de cebadores se unan a las hebras de ADN complementarias respectivas. Los complejos ADN-cebador forman los puntos de partida para la síntesis de una hebra de ADN complementaria usando la enzima ADN polimerasa en presencia de los cuatro elementos estructurales de ADN A, T, G y C en forma de trifosfatos de desoxinucleótido (dNTP). Con estos elementos estructurales la ADN polimerasa sintetiza una nueva hebra de ADN.

60 Dependiendo de la cantidad de ADN de VTTp en la muestra (siempre que esté presente), tendrán que hacerse varios ciclos de PCR antes de que haya material suficiente como para ser detectado. Un promedio de entre 30 y 45 ciclos no sería inusual. El experto sería capaz, basándose en las secuencias de los cebadores y la sonda, de

determinar las condiciones de temperatura óptimas para las diversas etapas del ciclo de PCR usando, por ejemplo, las fórmulas dadas anteriormente o en los manuales de laboratorio estándar (véase anteriormente).

El término "un cebador que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.:" significa que el cebador debe tener al menos la longitud de un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos que se unen al oligonucleótido como se representa en esa SEQ ID NO. Meramente como un ejemplo: FDNA-VTT podría tener la secuencia cgaatggctgagtttatgccgc como se representa en SEQ ID NO.: 1. Así, un "cebador que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 1" debe consistir al menos en un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos desde los nucleótidos cgaatggctgagtttatgccgc en ese orden. Sin embargo, podría ser un cebador más largo que comprende, por ejemplo, los nucleótidos cgaatggctgagtttatgccgc y tiene uno o más nucleótidos adicionales en el extremo 5' y/o extremo 3'.

Lo mismo es cierto para la sonda (aunque es evidente que la sonda no debe tener una longitud a la que la molécula de extinción ya no sea extintora del fluoróforo; véase más adelante). El oligonucleótido como se representa en SEQ ID NO.: 2 tiene una longitud de 17 ácidos nucleicos, pero una vez más, el oligonucleótido de un cebador o sonda según la invención debe tener una longitud mínima de al menos 14 nucleótidos consecutivos que se unen a un oligonucleótido que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 2.

Si se elige un cebador (o sonda) que tiene nucleótidos adicionales en el extremo 5' y extremo 3', tales nucleótidos pueden o pueden no ser complementarios a las regiones flanqueantes 3' y/o 5' de la hebra complementaria a la que se une el cebador. En algunos casos, las temperaturas de los diversos ciclos de RT-PCR posiblemente deben adaptarse al aumento de longitud del cebador y al hecho de que uno o más de los nucleótidos adicionales sean complementarios. Y otra vez; el experto sería capaz, basándose en las secuencias de los cebadores y la sonda, de determinar las condiciones de temperatura óptimas para las diversas etapas del ciclo de PCR usando, por ejemplo, las fórmulas dadas anteriormente o en libros de texto de PCR referidos en el presente documento (véase anteriormente).

Se prefieren cebadores que unen a un tramo de 15, 16, 17, 18, 19 o incluso 20 o más nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido que tienen una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 1-8 (con un máximo de 17 para SEQ ID NO.: 2) en este orden de preferencia, ya que se hibridan aún más selectivamente con secuencias de VTTp.

Se prefieren sondas de unión a un tramo de 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 2 y 5 (con un máximo de 17 para SEQ ID NO.: 2) en este orden de preferencia, ya que también se hibridan aún más selectivamente con secuencias de VTTp.

En principio, después de la etapa a) del método de la presente invención, ahora hay diferentes formas de realizar la etapa b). La etapa de PCR produce un producto de PCR cuya longitud y cantidad pueden examinarse, por ejemplo, mediante electroforesis de gel de agarosa o de poliacrilamida convencional. En caso de que esté presente ADN de VTTp en la muestra, se hibridaría el par de cebadores y, por lo tanto, después de la etapa a), se detectaría un producto de PCR de la longitud esperada en el gel. Si no está presente ADN de VTTp en la muestra, el par de cebadores, o al menos uno de los cebadores, dejaría de hibridarse y, por lo tanto, no se detectaría ningún producto de PCR de la longitud esperada.

Como se observará, los oligonucleótidos presentados en SEQ ID NO.: 1, 2, 3, 4 y 5 reflejan las diferencias (algunas) en las secuencias de los virus individuales en estas regiones. Posibles consecuencias para el desarrollo de los cebadores se tratan más adelante (véase más adelante).

La Tabla 1 proporciona un alineamiento de secuencias de 69 secuencias de VTTp conocidas y las flechas numeradas 1-5 en esta tabla indican donde SEQ ID NO.: 1, 2, 3, 4 y 5 se encuentran aproximadamente.

Como puede apreciarse de la Tabla 1, un conjunto de cebadores que comprende un cebador directo según invención que se une a FDNA-VTT y un cebador inverso según la invención que se une a RDNA-VTT-r1 o un conjunto de cebadores que comprende un cebador directo según la invención que se une a FDNA-VTT y un cebador inverso según la invención que se une a RDNA-VTT-r2 son capaces de dar un producto de PCR en todos los casos, es decir, con todas las cepas clínicas de campo probadas, independientemente de su origen geográfico o su genotipo.

Como se deduce de la Tabla 1, un producto de PCR generado por un conjunto de cebadores que se une a FDNA-VTT y RDNA-VTT-r2 tendría una longitud de aproximadamente entre 83 y 88 nucleótidos. Esto depende por supuesto de la longitud exacta de la región entre los dos cebadores. Y, como la variabilidad en las regiones entre los cebadores es alta, incluso dentro del grupo de VTTp, no es posible predecir una longitud exacta. Sin embargo, la longitud exacta de un producto de PCR no es importante: solamente la ausencia o presencia de un producto de PCR es relevante, no su tamaño exacto.

Una alternativa al análisis de consumo de tiempo del posible producto de PCR por medio de electroforesis en gel de agarosa o de poliacrilamida convencional es el uso del sistema SYBR Green (véase anteriormente y más adelante). SYBR Green es un colorante que se intercala con el ADN bicatenario (bc). Esta intercalación hace que SYBR Green fluoreszca. Por lo tanto, si la reacción de PCR se hace en presencia de SYBR Green, cada nueva copia de ADNbc

ES 2 616 836 T3

captaría una cantidad de SYBR Green y haría que fluoresciera. Una máquina de PCR en tiempo real puede detectar esta fluorescencia y el software dedicado puede calcular los valores de Ct de la intensidad de la fluorescencia. Esto permite una cuantificación directa de la cantidad de ADNc hecha (El uso de SYBR Green, sin embargo, no permite la presencia de un control interno que indique si las etapas de reacción procedieron como cabía esperar). Los métodos RT-PCR basados en SYBR-Green se han descrito por Mackay, I.M. et al.

El método anterior proporciona así una forma de detectar selectivamente la presencia o ausencia de VTTp en una muestra, independientemente del origen geográfico o el genotipo de la cepa de VTT.

Así, una primera realización de la invención se refiere a un método para la detección de la presencia de virus Torque teno porcino (VTTp) en una muestra, caracterizado por que dicho método comprende las etapas de

- a) realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de dicha muestra usando un conjunto de cebadores que comprende un cebador directo que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FDNA-VTT que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 1 y un cebador inverso que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido RDNA-VTT-r1 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 2 o un cebador inverso que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido RDNA-VTT-r2 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 3, y
- b) examinar el resultado de la amplificación por PCR de la etapa (a).

En una forma preferida de esta realización, un cebador del conjunto de cebadores se une a la longitud completa del oligonucleótido FDNA-VTT que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 1 y el otro cebador del conjunto de cebadores se une a la longitud completa del oligonucleótido RDNA-VTT-r1 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 2 o a la longitud completa del oligonucleótido RDNA-VTT-r2 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 3.

Meramente como un ejemplo: un cebador del conjunto de cebadores que se une a la longitud completa del oligonucleótido FDNA-VTT que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 1 es, por ejemplo, un cebador con una longitud de 22 nucleótidos y que tiene una secuencia cgaatggctg agtttatgcc gc.

Se prestará atención a que, por ejemplo, en SEQ ID NO.: 1, el nucleótido en la posición 2 es una S (es decir: puede ser G o C). La S en la posición 2 no es de mucha influencia cuando se trata de desarrollar un cebador adecuado. Se encuentra relativamente lejos del punto donde tiene lugar la extensión del cebador. El cebador se hibridará tanto con el ADN que tiene una G como el ADN que tiene una C en esa posición. Por lo tanto, un cebador que tiene una secuencia cgaatggctg agtttatgcc gc y un cebador que tiene una secuencia ccaatggctg agtttatgcc gc son ambos adecuados. El experto sabría cómo corregir la temperatura de las etapas de PCR para compensar un posible desapareamiento. Alternativamente, puede usarse un cebador degenerado, que comprende tanto un cebador que tiene la secuencia cgaatggctg agtttatgcc gc como un cebador que tiene la secuencia ccaatggctg agtttatgcc gc.

Simplemente como otro ejemplo: el nucleótido R en la posición 18 es de más relevancia, ya que se encuentra cerca del punto donde tiene lugar la extensión del cebador. Por lo tanto, sería conveniente tanto usar un cebador más corto, tal como cgaatggctg agtttat, como usar un cebador degenerado que comprende un cebador que tiene una A y un cebador que tiene una G en la posición 18.

Para cada una de las secuencias dadas en SEQ ID NO.: 1, 2, 3, 4 y 5 existe una clara secuencia consenso. Esto puede verse inmediatamente de la Tabla 1.

- La secuencia consenso para SEQ ID NO.: 1 es cgaatggctgagtttatgccgc
- La secuencia consenso para SEQ ID NO.: 2 es ctggcggggtgcccggag
- La secuencia consenso para SEQ ID NO.: 3 es cggagtcaaggggcctatcgggcagg
- La secuencia consenso para SEQ ID NO.: 4 es tgtctagccgctggcggggtgcccggag
- La secuencia consenso para SEQ ID NO.: 5 es cggagtcaaggggcctatcgggcagg

Las secuencias consenso son las secuencias preferidas cuando se diseñan cebadores que se unen a estas secuencias.

Debe tenerse en cuenta lo siguiente: en 38 de las secuencias de VTTp analizadas y presentadas en la Tabla 1, la secuencia de SEQ ID NO.: 4 es ygtctarcmgmctggcggggtgcccgvag. Sin embargo, en 31 de las secuencias de VTTp analizadas y presentadas en la Tabla 1, la secuencia de SEQ ID NO.: 4 es ygtctarcmgmctggcggggtgcccgvag debido a un hueco de un nucleótido. El hueco se encuentra relativamente lejos del punto donde tiene lugar la extensión del cebador, entonces no debe tenerse necesariamente en cuenta cuando se diseña un cebador adecuado.

Un método más eficiente y selectivo para detectar la presencia del producto de PCR es una PCR en tiempo real basada en sonda.

Este método se basa básicamente en los métodos de PCR descritos anteriormente, pero tiene un nivel de selectividad que va más allá de la selectividad de la reacción de PCR descrita anteriormente. Se basa en el uso de

un conjunto de cebadores que comprende un cebador directo que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FDNA-VTT que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 1 y un cebador inverso que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido RDNA-VTT-r2 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 3 y una sonda que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido RDNA-VTT-r1 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 2, según la invención.

Una sonda que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido RDNA-VTT-r1 difiere de un cebador que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido RDNA-VTT-r1 en que una sonda tal es un oligonucleótido con un fluoróforo y una molécula extintora unida a éste. Existen varias versiones de tales sondas cuando se llega al fluoróforo o extintor usado o el mecanismo de trabajo más allá de la combinación de sonda/extintor. Simplemente como un ejemplo, tales sondas están comercialmente disponibles como sondas TaqMan, sondas Scorpions y sondas de baliza molecular (véase más adelante).

En este método usando una sonda, la detección puede hacerse, por ejemplo, usando la sonda según la invención. Esta sonda se une, como se menciona anteriormente, de forma selectiva a una secuencia interna del ADNc hecho en una reacción de PCR usando, por ejemplo, el conjunto de cebadores de unión de FDNA-VTT / RDNA-VTT-r2 según la invención. Por ejemplo, en la cepa VTT2_ (HM633239.1)/1- 2797 (véase la Tabla 1), la sonda, por ejemplo, se hibridaría en una etapa b) con la región RDNA-VTT-r2 de ADNc desde posición 380-396 del alineamiento. Sin embargo, esto sucede solo en caso de que el ADN amplificado sea de hecho de origen VTTp. En el improbable caso de que los dos cebadores selectivos amplificaran ADN no VTT, esto se notaría en la etapa b, debido a que la sonda no se hibridaría con éste. Por lo tanto, la sonda según la invención hace la detección de VTTp aún más específica que una mera reacción de PCR. Además, el uso de una sonda evita el uso de geles para la detección de los productos de PCR. Y, finalmente, el nivel de fluorescencia detectado en el ciclador térmico de PCR en tiempo real es directamente proporcional al fluoróforo liberado y, por lo tanto, la cantidad de molde de ADN presente en la PCR (véase más adelante). Por lo tanto, este método es muy adecuado en reacciones de PCR en tiempo real.

Métodos de RT-PCT en tiempo real basados en TaqMan son un desarrollo de Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404, EE.UU.

Métodos de RT-PCT en tiempo real basados en TaqMan se describen, entre otros, en las referencias bibliográficas 8, 10 y 33. Los métodos de RT-PCR en tiempo real basados en Scorpions y balizas moleculares están disponibles a través de PREMIER Biosoft International, 3786 Corina Way, Palo Alto CA 94303-4504, EE.UU.

El uso de PCR en tiempo real basándose en balizas moleculares se describe en detalle en, entre otros: Molecular Beacons; A New Tool to Identify Point Mutations and to Analyze Gene Expression in Mycobacterium tuberculosis by Manganelli, R., Tyagi, S. y Smith, I., en: Methods in Molecular Medicine, vol. 54: página 295-310, Mycobacterium Tuberculosis Protocols, Editado por: T. Parish and N. G. Stoker © Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Las sondas TaqMan consisten en un fluoróforo unido covalentemente al extremo 5' de la sonda de oligonucleótido y un extintor en el extremo 3'. Están disponibles varios fluoróforos diferentes (por ejemplo, 6-carboxifluoresceína, acrónimo: FAM, o tetraclorofluorescina, acrónimo: TET) y extintores (por ejemplo, tetrametilrodamina, acrónimo: TAMRA, o ligando de unión al surco menor de tripéptido de dihidrociclopirroloindol, acrónimo: MGB). La molécula extintora extingue la fluorescencia emitida por el fluoróforo cuando se excita por la fuente de luz del ciclador mediante FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia). En tanto que el fluoróforo y el extintor estén en proximidad, la extinción inhibe cualquier señal de fluorescencia.

Sondas TaqMan se diseñan tal que se hibriden dentro de una región de ADN amplificada por un conjunto específico de cebadores. Como la Taq polimerasa extiende el cebador y sintetiza la hebra naciente, la actividad de exonucleasa 5' a 3' de la polimerasa degrada la sonda que se ha hibridado con la plantilla. La degradación de la sonda libera el fluoróforo de ésta y rompe la proximidad cercana al extintor, para así aliviar el efecto extintor y permitir la fluorescencia del fluoróforo. Por lo tanto, la fluorescencia detectada en el ciclador térmico de PCR en tiempo real es directamente proporcional al fluoróforo liberado y la cantidad de molde de ADN presente en la PCR.

Las sondas TaqMan son sondas preferidas para su uso en los métodos y herramientas de diagnóstico según la invención.

En realidad, la sonda Taqman Probe VTT-r1 descrita aquí es un oligonucleótido que se une a una secuencia de ADN como se representa en SEQ ID NO.: 2, sin embargo, con un fluoróforo y un extintor unido a ella. Pero como se ha explicado (véase anteriormente), la sonda también puede ser un oligonucleótido más largo o más corto que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido RDNA-VTT-r1 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 2.

Como en este método tanto la hibridación de los cebadores como la sonda tiene lugar en un proceso, el desarrollo de una reacción de color tiene lugar prácticamente en el mismo momento que la amplificación del ADN. Por lo tanto, tal reacción se denomina una reacción de PCR en tiempo real.

Por lo tanto, otra forma preferida de esta realización se refiere a un método para la detección de la presencia del virus Torque teno porcino (VTTp) en una muestra, caracterizado por que dicho método comprende las etapas de

a) realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de dicha muestra usando un conjunto de cebadores que comprende un cebador directo que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FDNA-VTT que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 1 y un cebador inverso que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido RDNA-VTT-r2 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 3 y

b) examinar el resultado de la amplificación por PCR de la etapa (a) usando una sonda que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido RDNA-VTT-r1 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 2.

En una forma más preferida de esta realización, un cebador del conjunto de cebadores se une a la longitud completa del oligonucleótido FDNA-VTT que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 1 y el otro cebador del conjunto de cebadores se une a la longitud completa del oligonucleótido RDNA-VTT-r2 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 3

En otra forma más preferida de esta realización, la sonda se une a la longitud completa del oligonucleótido RDNA-VTT-r1 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 2.

Como se ha mencionado anteriormente, VTTp podría estar presentes en tejido con o sin replicación allí. Se sabe que VTT se encuentra en prácticamente todos los tejidos y órganos, pero se desconoce si solo se encuentra en un tejido debido a que se transportó a ese tejido por la sangre o si está replicando activamente allí. Por lo tanto, es altamente necesaria una prueba que podría distinguir entre la mera presencia de VTTp en, por ejemplo, un tejido y replicación activa del virus en ese tejido. Una prueba tal permitiría además detectar si las trazas de VTTp en el cultivo celular están o no en una forma inactivada: la certeza sobre la falta de replicación viral de VTTp podría hacer que la producción de vacunas virales en cultivo celular fuera más segura.

La replicación del genoma de VTT continúa a través de un modelo de círculo rodante: durante la replicación se prepara un ADNmc de hebra positiva usando la hebra de ADN viral genómico de hebra negativa como molde, y este ADN de hebra positiva sirve a su vez de molde para producir nuevo ADN de hebra negativa. En principio, el ADN de hebra positiva podría usarse para la detección de replicación; entonces podría usarse una prueba de PCR específica hebra (PCR_{eh}) usando cebadores que se unen específicamente a la hebra de ADN positiva para mostrar la replicación del ADN. Sin embargo, surge un problema cuando VTT entra en una célula no permisiva, es decir, una célula que no soporta el ciclo completo, productivo, replicativo del virus que incluye la formación de nuevas partículas del virus. En tales células no permisivas, el mecanismo celular empezaría, sin embargo, la replicación de ADNmc viral y, por consiguiente, se formará ADN de hebra positiva, que sugiere incorrectamente la replicación viral productiva. Por lo tanto, una PCR_{eh} no es una prueba fiable para confirmar la replicación viral productiva.

Un indicador más fiable para la replicación viral es la presencia de ARNm de VTTp ya que la replicación del virus activa se revela por sí misma a través de la aparición de ARNm. Tales ARNm pudieron entonces detectarse mediante una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa, denominada además RT-PCR. Sin embargo, la extrema variabilidad en la secuencia del genoma para los diversos VTTp hace muy difícil identificar cebadores universales para su uso en una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

Se plantea un segundo problema por el hecho que no se sabe mucho sobre los patrones de corte y empalme de ARN en VTTp, excepto por el hecho de que parece haber una variación significativa en el patrón de corte y empalme entre diversos VTTp. Debido a las características de corte y empalme de la replicación viral de VTTp, es muy posible que algunos cebadores no puedan usarse en absoluto, ya que se hibridan con regiones que se pierden tras el corte y empalme del ARN. Después de realizar el corte y empalme del ARNm, tales regiones se perderían y, por consiguiente, no se encontraría ningún producto de RT-PCR. Y esto a su vez conduciría a una indicación falsa de que no tiene lugar replicación viral de VTTp.

Sorprendentemente se encontró ahora que las regiones de RDNA-VTT-r1 y RDNA-VTT-r2 a las que se unen los cebadores de PCR también están presentes en el ARNm de VTTp. Aún más sorprendente, se encontró que estas regiones se localizaron fuera de regiones que se cortan y empalman durante el proceso de corte y empalme de ARNm. Por lo tanto, estas regiones siempre están presentes en el ARNm de VTTp, independientemente del patrón de corte y empalme de ARNm seguido por cualquier VTTp.

Esto significa que las regiones de RDNA-VTT-r1 y RDNA-VTT-r2 pueden también usarse para desarrollar cebadores directos en una reacción de RT-PCR para la detección de ARNm durante la replicación viral de VTTp independientemente de su procedencia geográfica o su genotipo. Esta prueba permite así por primera vez diferenciar entre la mera presencia de ADNmc de VTTp en un tejido y la replicación activa del virus en ese tejido.

Una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) comprende dos etapas de reacción. En una primera etapa, se permite que uno de los cebadores del conjunto de cebadores se una a ARN de VTT y este complejo forma el punto de partida para la síntesis de una hebra de ADNc de la hebra de ARN por la enzima

transcriptasa inversa (una ADN polimerasa dependiente de ARN) en presencia de los cuatro elementos estructurales de ADN A, T, G y C.

En una segunda etapa, el híbrido ARN-ADN así formado se calienta con el fin de desnaturalizar el híbrido, seguido de un enfriamiento con el fin de permitir que el otro cebador del conjunto de cebadores se una a la hebra de ADNc.

5 Este otro cebador funciona entonces como punto de partida para la síntesis de la segunda cadena de ADN por una ADN polimerasa, otra vez en presencia de los elementos estructurales de ADN.

Dependiendo de la cantidad de ARN de VTTP en la muestra (siempre que esté presente), tendrán que hacerse varios ciclos de PCR antes de que haya material suficiente como para ser detectado. Un promedio de entre 30 y 45 ciclos no sería inusual. El experto sería capaz, basándose en las secuencias de los cebadores y la sonda, de
10 determinar las condiciones de temperatura óptimas para las diversas etapas del ciclo de PCR usando, por ejemplo las fórmulas dadas anteriormente y en los libros de texto antes mencionados (véase anteriormente).

Como se mencionó anteriormente, cebadores directos adecuados son los cebadores que son complementarios a RDNA-VTT-r1 y RDNA-VTT-r2.

15 Tales cebadores directos según la invención se unen a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FRNA-a que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 4 o un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FRNA-b que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 5.

20 Como cebador inverso se usa un cebador que se une a la cola de poli-A de los ARNm. Un cebador tal comprendería un tramo de poli-T. Tal cebador consiste preferentemente en al menos 14 T consecutivos.

Con el fin de evitar la unión al azar de tales cebadores a cualquier parte de la cola de poli-A, el cebador inverso lleva preferentemente un nucleótido G, un nucleótido C o un nucleótido A en el extremo 3' del tramo de poli-T. Esto permitiría la unión específica del cebador al extremo 5' de la cola de poli-A. Si la característica del último nucleótido
25 antes de la cola de poli-A es conocida de la secuencia del virus, el nucleótido en el extremo 3' del tramo de poli-T puede hacerse complementario a ese último nucleótido. Si la característica no se conoce, puede usarse satisfactoriamente una mezcla de tres cebadores de poli-T, teniendo cada uno una G, una C o una A en el extremo 3' del tramo de poli-T.

30 Así, un cebador inverso según la invención comprende al menos un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de unión a los nucleótidos más del extremo 5' de un oligonucleótido RRNA-1 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 6, un oligonucleótido RRNA-2 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 7, o un oligonucleótido RRNA-3 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 8.

35 Simplemente como un ejemplo: un cebador inverso según la invención y la unión a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos del extremo 5' de un oligonucleótido RRNA-1 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 6 podría tener, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos TTTTTTTTTTTTTTTA, TTTTTTTTTTTTTTTTA o TTTTTTTTTTTTTTTTTTTA

40 La temperatura de fusión de los dúplex T/A es relativamente baja. Así, si se desea, los cebadores que se unen a la cola de poli-A pueden extenderse en el extremo 5' con una secuencia conocida pero aleatoria de, por ejemplo, 15 nucleótidos. Si se usa un cebador extendido en 5' tal, una hibridación satisfactoria entre la parte de poli-T del cebador y la cola de poli-A del ARNm necesita ser satisfactoria en un único ciclo de PCR. En los ciclos posteriores, la reacción de hibridación sería mucho más eficiente debido al hecho de que ahora puede usarse un segundo cebador que es complementario a la extensión de 5' del cebador de poli-T.

45 Así, otra realización de la presente invención se refiere a un método para la detección de la presencia de VTTP de replicación en una muestra, caracterizado por que dicho método comprende las etapas de

50 a) realizar una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) de dicha muestra usando un conjunto de cebadores que comprende un cebador directo que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FRNA-a con una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 4 o un cebador directo que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FRNA-b que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 5 y al menos un cebador inverso que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos del extremo 5' de un oligonucleótido RRNA-1 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 6, un oligonucleótido RRNA-2 con una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 7, o un oligonucleótido RRNA-3 con una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 8, y

b) examinar el resultado de la amplificación por RT-PCR de la etapa (a).

60 Como cebador directo se usa preferentemente un cebador que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FRNA-a: esto permitiría el uso de una sonda que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FRNA-b para la detección de un producto de RT-PCR en una reacción de RT-PCR en tiempo real.

65 Así, una forma preferida de esta realización se refiere a un método para la detección de la presencia de VTTP de replicación según la invención, caracterizado por que dicho cebador directo se une a un tramo de al menos 14

nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FRNA-a que tiene secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 4

La sonda, que básicamente se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FRNA-b que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 5, comprende una molécula extintora y un fluoróforo.

Así, una forma más preferida de esta realización se refiere a un método para la detección de la presencia de VTTp de replicación según la invención, caracterizado por que dicho método comprende además la etapa de examinar el resultado de la amplificación por PCR de la etapa (a) usando una sonda que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FRNA-b que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 5.

Idealmente, el método indicado antes para la detección de ADN de VTTp y el método indicado antes para la detección de replicación viral de VTTp se aplicarían simultáneamente en un vial. Esto permitiría la detección simultánea de tanto la presencia de ADN de VTTp como la replicación viral de VTTp.

Sin embargo, debe tenerse cuidado que los cebadores para la detección de ADN y ARN sean correctamente seleccionados. Si los cebadores que se unen a FDNA-VTT y RDNA-VTT-r2 se usan para la detección de ADN, debe evitarse el uso de un cebador que se une a FRNA-b para la detección de ARNm, debido a que en ese caso, el cebador que se une a FRNA-b se hibridaría con el cebador que se une a RDNA-VTT-r2. Por la misma razón, si los cebadores que se unen a FDNA-VTT y RDNA-VTT-r1 se usan para la detección de ADN, debe evitarse el uso de un cebador que se une a FRNA-a para la detección de ARNm, debido a que en ese caso, el cebador que se une a FRNA-a se hibridaría con el cebador que se une a RDNA-VTT-r1.

Por la misma razón, si el cebador que se une a RDNA-VTT-r2 se usa para la detección de ADN y el cebador que se une a FRNA-a se usa para la detección de ARN, entonces las sondas complementarias a RDNA- VTT-r1 y FRNA-b no pueden usarse para la detección de ADN y ARN. Por lo tanto, no puede hacerse la detección simultánea de los productos de PCR respectivos y los productos de RT-PCR usando las sondas según la invención. Así, estos productos deben analizarse por otros medios tales como electroforesis en gel.

Así, otra realización de la presente invención se refiere a un método para la detección de la presencia de VTTp de replicación en una muestra, caracterizado por que dicho método comprende las etapas simultáneas de

a) realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de dicha muestra usando un conjunto de cebadores que comprende un cebador directo que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FDNA-VTT con una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 1 y un cebador inverso que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido RDNA-VTT-r2 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 3 y

b) realizar una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) de dicha muestra usando un conjunto de cebadores que comprende un cebador directo que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FRNA-a que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 4 y al menos un cebador inverso que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido RRNA-1, 2 o 3, que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 6, en SEQ ID NO.: 7 o en SEQ ID NO.: 8 y

c) examinar el resultado de la amplificación por PCR de las etapas a) y b)

Y una vez más otra realización de la presente invención se refiere a un método para la detección de la presencia de VTTp de replicación en una muestra, caracterizado por que dicho método comprende las etapas simultáneas de

a) realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de dicha muestra usando un conjunto de cebadores que comprende un cebador directo que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FDNA-VTT con una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 1 y un cebador inverso que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido RDNA-VTT-r1 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 2 y

b) realizar una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) de dicha muestra usando un conjunto de cebadores que comprende un cebador directo que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FRNA-b que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 5 y al menos un cebador inverso que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido RRNA que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 6, en SEQ ID NO.: 7 o en SEQ ID NO.: 8 y

c) examinar el resultado de la amplificación de (RT)-PCR de las etapas a) y b).

Como se trató para producto de PCR de ADN generado por el conjunto de cebadores que se une a FDNA-VTT y RDNA-VTT-r2 respectivamente anterior, no puede darse una longitud exacta de los productos de RT-PCR si se usa, por ejemplo, un conjunto de cebadores que comprende un cebador directo que se une a FRNA-a y un cebador inverso que se une a RRNA-1. En primer lugar, como la variabilidad en las regiones entre los cebadores es alta, incluso dentro del grupo de VTTp, no es posible predecir una longitud exacta de estos productos. Y además, para los productos de RT- PCR, esto es aún más impredecible ya que se conocen tantas variantes de corte y empalme

para VTT. Sin embargo, una vez más, la longitud exacta de un producto de RT-PCR no es importante: solo es relevante la ausencia o presencia de un producto RT-PCR, no su tamaño exacto.

Los métodos según la invención que se basan en la RT-PCR pueden mejorarse además añadiendo un denominado ARN de control interno (ARN CI). En realidad, el control interno es un experimento paralelo en el que una cantidad de un ARN de control se añade a la muestra de prueba, además de cebadores y una sonda que son específicos para ese ARN de control (ARN CI). (O alternativamente, aunque menos preferido, el ARN de control y los cebadores y la sonda se prueban por separado en una prueba de RT-PCR paralela). Tales cebadores y la sonda no deben estar relacionados con VTT; si estuvieran relacionados con VTT podrían interferir con la parte específica de VTT del método.

Es evidente que el color del fluoróforo de la sonda de VTT y el fluoróforo de la sonda no VTT deben ser diferentes, con el fin de discriminar entre la fluorescencia específica de VTT y la fluorescencia específica de ARN CI.

Como están presentes todos los componentes para una reacción satisfactoria que muestra la presencia del ARN CI, habrá una fluorescencia específica, que indica que las diversas etapas del proceso fueron satisfactorias.

Preferentemente, la prueba del ARN CI se realiza en el mismo tubo de ensayo que la prueba de detección de VTTp. Así, si se detecta la fluorescencia del fluoróforo específico de ARN CI, la prueba como tal es fiable, y si además se detecta la fluorescencia del fluoróforo específico de VTT, eso demuestra la presencia de material de VTT.

Si se detecta la fluorescencia del fluoróforo específico de ARN CI, pero no se detecta fluorescencia del fluoróforo específico de VTT, eso demuestra la ausencia de material de VTT.

Si no se detecta fluorescencia del fluoróforo específico de ARN CI, la prueba no es fiable y no debe tenerse en cuenta.

Así, el uso de un control interno es importante para excluir resultados negativos falsos debido a, por ejemplo, aislamiento ineficiente de ARN, reacción de transcriptasa inversa ineficiente o inhibición de PCR.

En principio, puede usarse un ARN sintético como material de partida para el control interno. Como alternativa a los fragmentos sintéticos de ARN, pueden usarse genes de mantenimiento o diferentes genes del huésped o de diferentes patógenos como control interno. Sus problemas de concentración desconocida y variable, inestabilidad y bioseguridad los hacen, sin embargo, más difícil de manipular e integrar en el ensayo PCR que el ARN transcrito *in vitro*.

Por esta razón, un sistema de control interno preferido es el sistema de control interno heterólogo universal diseñado por Hoffmann et al. Se basa en ARN y podría ser fácilmente adaptado e integrado en el ensayo para comprobar una satisfactoria extracción de ARN y RT-PCR.

Así, una forma incluso más preferida de esta realización se refiere a un método según la invención, caracterizado por que la etapa de realizar la reacción de RT-PCR en tiempo real de dicho método usa además al menos un conjunto de cebadores no relacionado con VTT y al menos un molde de ARN no relacionado con VTT.

Si se requiere cuantificación de la reacción de PCR, pueden ejecutarse pruebas paralelas separadas en las que están presentes cantidades conocidas de ADN de VTT o ARNm de VTT y los cebadores y la sonda según la invención. Esto permitiría dibujar curvas patrón que proporcionan una relación entre la cantidad de ADN o ARN en la prueba paralela y el número de ciclos requerido para alcanzar el umbral de detección de fluorescencia. Estas curvas patrón pueden entonces usarse posteriormente para determinar la cantidad desconocida de ADN de VTT o ARNm de VTT en la muestra.

Por lo tanto, un método según la invención en el que se ejecutan pruebas paralelas separadas con el fin de hacer curvas patrón que posteriormente se usan para la cuantificación de la cantidad de ADN de VTT o ARNm de VTT en una muestra se denomina como un método cuantitativo.

Es evidente que el material biológico se somete preferentemente a etapas de purificación adicionales.

Como el método para la detección de VTTp se basa en ADNmc y/o ARNm viral, este ADNmc y ARN se purifica preferentemente de la muestra hasta un cierto grado. La purificación en este sentido significa que material en la muestra distinto de ADN o ARNm de VTT se elimina hasta un cierto grado de la muestra antes de que la muestra se someta a un método según la invención. Tal purificación puede comprender, por ejemplo, desproteización, eliminación de restos celulares, extracción de ADN, extracción de ARN y similares.

Así, una forma aún más preferida de la presente invención se refiere a un método según la invención, caracterizado por que dicho método comprende una etapa de purificación de ARN o ADN anterior a la etapa a).

Otra realización de la presente invención se refiere a un conjunto de cebadores que comprende un cebador directo que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FDNA-VTT que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 1 y un cebador inverso que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido RDNA-VTT-r1 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 2 o un cebador inverso que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido RDNA-VTT-r2 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 3

Una realización adicional de la presente invención se refiere a un conjunto de cebadores que comprende un cebador directo que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FRNA-a que tiene una

5 secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 4 o un cebador directo que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FRNA-b que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 5 y al menos un cebador inverso que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos del extremo 5' de un oligonucleótido RRNA-1 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 6, un oligonucleótido RRNA-2 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 7, o un oligonucleótido RRNA-3 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 8

10 Otra realización aún de la presente invención se refiere a una sonda que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido RDNA-VTT-r1 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 2 o a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FRNA-b que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 5.

15 Otra vez otra realización de la presente invención se refiere a kits de prueba de diagnóstico para la detección de la presencia del virus del Torque teno porcino (VTTp) en una muestra. Tales kits permiten que se pongan en práctica los métodos según la invención.

20 Así, una primera forma de esta realización se refiere a un kit de prueba de diagnóstico para la detección de la presencia del virus Torque teno porcino (VTTp) en una muestra, caracterizado por que dicho kit comprende al menos un conjunto de cebadores que comprende un cebador directo que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FDNA-VTT que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 1 y un cebador inverso que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido RDNA-VTT-r1 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 2 o un cebador inverso que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido RDNA-VTT-r2 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 3.

25 En una forma preferida de esta realización, dicho kit de prueba de diagnóstico para la detección de la presencia de VTTp comprende además una sonda que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido RDNA-VTT-r1 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO. 2.

30 Otra vez otra realización se refiere a un kit de prueba de diagnóstico para la detección de la presencia de VTTp de replicación en una muestra, caracterizado por que dicho kit comprende un conjunto de cebadores que comprende un cebador directo que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FRNA-a que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 4 o un cebador directo que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FRNA-b que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 5 y al menos un cebador inverso que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos del extremo 5' de un oligonucleótido RRNA-1 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 6, un oligonucleótido RRNA-2 con una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 7, o un oligonucleótido RRNA-3 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 8.

40 En una forma preferida de esta realización, dicho kit de prueba de diagnóstico para la detección de la presencia de VTTp de replicación comprende además una sonda que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FRNA-b que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO. 5.

45 Estos diversos cebadores y sondas pueden estar presentes en el kit en viales separados. También pueden estar presentes en el mismo vial. Para facilitar la manipulación y con el fin de evitar riesgos innecesarios de contaminación, incluso podrían estar presentes en el vial de prueba al que se añade la muestra. Preferentemente estarán presentes en una forma seca, con el fin de mantenerlos estables en condiciones de almacenamiento ambiental.

50 Otra realización aún se refiere a un kit de prueba de diagnóstico para la detección simultánea de la presencia de ADNmc de VTTp y replicación del virus VTTp en una muestra, caracterizado por que dicho kit comprende un conjunto de cebadores que comprende un cebador directo que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FDNA-VTT que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 1 y un cebador inverso que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido RDNA-VTT-r2 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 3 y un conjunto de cebadores que comprende un cebador directo que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FRNA-a que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 4 y al menos un cebador inverso que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de oligonucleótido RRNA que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 6, en SEQ ID NO.: 7 o en SEQ ID NO.: 8.

60 Otra vez otra realización se refiere a un kit de prueba de diagnóstico para la detección de la presencia de ADNmc de VTTp y la replicación del virus VTTp en una muestra, caracterizada en que dicho kit comprende un conjunto de cebadores que comprende un cebador directo que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FDNA-VTT con una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 1 y un cebador inverso que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido RDNA-VTT-r1 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 2 y un cebador directo que comprende un cebador directo que se

une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FRNA-b que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 5 y al menos un cebador inverso que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de oligonucleótido RRNA que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 6, en SEQ ID NO.: 7 o en SEQ ID NO.: 8.

5 Un kit de prueba de diagnóstico según la invención puede comprender además una transcriptasa inversa y/o una ADN polimerasa termoestable. Estas enzimas son necesarias para realizar una RT-PCR en tiempo real y para facilitar el uso podrían así ser incorporadas en el kit de prueba de diagnóstico.

10 Si se requiere un control interno de la RT-PCR en tiempo real, puede incluirse un segundo conjunto de cebadores y sonda, en este caso cebadores no VTT y un molde de ARN no VTT y una sonda no VTT como se trató anteriormente, además del ARN CI, en el kit de prueba de diagnóstico. Ni que decir tiene que los cuatro elementos estructurales de ADN y los tampones necesarios también pueden incluirse adicionalmente en el kit de prueba de diagnóstico.

15 Si se requiere cuantificación de la reacción de (RT)-PCR, pueden ejecutarse pruebas paralelas en las que están presentes cantidades conocidas de ARN de VTT y/o ADN de VTT y los cebadores y las sondas según la presente invención. Esto permitiría dibujar curvas patrón que proporcionan una relación entre la cantidad de ARN y/o ADN en la prueba paralela y el número de ciclos requerido para alcanzar el umbral de fluorescencia. Estas curvas patrón pueden entonces usarse para determinar la cantidad de ARN de VTT y/o ADN de VTT en la muestra. Por lo tanto, preferentemente el kit de prueba de diagnóstico comprende además cantidades conocidas de ARN de VTT y/o ADN de VTT que permiten realizar la cuantificación.

20 A continuación se presentan ejemplos de cómo realizar el método según la invención. Ni que decir tiene que los ejemplos no deben considerarse limitantes del alcance de la invención de ninguna manera.

25 Leyendas de las figuras

Figura 1: Gráfico de la curva de amplificación (Figura 1A) y de la curva patrón (Figura 1B) de una qPCR de amplio espectro para VTT porcino. En el gráfico de amplificación las curvas grises representan la serie de diluciones estándar y las curvas negras representan las muestras. En el gráfico de la curva patrón los puntos representan la serie de diluciones estándar y las cruces representan las muestras.

Figura 2: picos de fusión de los amplicones. Las curvas grises representan la serie de diluciones estándar y las curvas negras representan las muestras. Todas las muestras mostraron un pico con una temperatura de fusión entre 85,0 °C y 86,5 °C, indicando que la fluorescencia medida se deriva solamente del producto PCR.

Figura 3: dibujo esquemático del plásmido TTV008 que comprende 323 pares de bases de un genotipo 2 de VTTp (VTTp2).

40 Bibliografía

Biagini, P., Gallian, P., Attoui, H., Touinssi, M., Cantaloube, J.-F., de Micco, P. & de Lamballerie, X. (2001). Genetic analysis of full-length genomes and subgenomic sequences of TT virus-like mini virus human isolates. *J Gen Virol* 82, 379-383.

45 Cortey, M., Macera, L., Segales, J. & Kekarainen, T. (2010). Genetic variability and phylogeny of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) based on complete genomes. *Vet Microbiol* 148, 125-31.

Dieffenbach & Drexler; PCR primers, a laboratory manual. ISBN 0-87969-447-5 (1995)

50 Ellis, J. A., Allan, G. & Krakowka, S. (2008). Effect of coinfection with genogroup 1 porcine torque teno virus on porcine circovirus type 2-associated postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic pigs. *Am J Vet Res* 69, 1608-14.

55 Hijikata, M., Iwata, K., Ohta, Y., Nakao, K., Matsumoto, 443 oto, M., Matsumoto, H., Kanai, K., Baba, K., Samokhvalov, E. I. & Mishiro, S. (1999). Genotypes of TT virus (TTV) compared between liver disease patients and healthy individuals using a new PCR system capable of differentiating 1a and 1b types from others*. *Arch Virol* 144, 2345-54.

60 Hoffmann, B., K. Depner, H. Schirrmeier, and M. Beer. 2006. A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. *J. Virol. Methods*. 136:200-209.

65 Huang, Y. W., Ni, Y. Y., Dryman, B. A. & Meng, X. J. (2010). Multiple infection of porcine Torque teno virus in a single pig and characterization of the full-length genomic sequences of four U.S. prototype PTTV strains: implication for genotyping of PTTV. *Virology* 396, 289-97.

- Kakkola, L., Tommiska, J., Boele, L. C. L., Miettinen, S., Blom, T., Kekarainen, T., Qiu, J., Pintel, D., Hoeben, R. C., Hedman, K. & Söderlund-Venermo, M. (2007). Construction and biological activity of a full-length molecular clone of human Torque teno virus (TTV) genotype 6. *FEBS Journal* 274, 4719-4730.
- 5 Kamahora, T., Hino, S. & Miyata, H. (2000). Three Spliced mRNAs of TT Virus Transcribed from a Plasmid Containing the Entire Genome in COS1 Cells. *J Virol* 74, 9980-9986.
- Kekarainen, T., Sibila, M., Segale & és, J. (2006). Prevalence of swine Torque teno virus in post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs in Spain. *J Gen Virol* 87, 833-837.
- 10 Leary, T. P., Erker, J. C., Chalmers, M. L., Desai, S. M. & Mushahwar, I. K. (1999). Improved detection systems for TT virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals. *J. Gen Virol* 80, 2115-2120.
- 15 Leppik, L., Gunst, K., Lehtinen, M., Dillner, J., Streker, K. & de Villiers, E. M. (2007). In vivo and in vitro intragenomic rearrangement of TT viruses. *J Virol* 81, 9346-56.
- Mankertz, A. & Hillenbrand, B. (2001). Replication of porcine circovirus type 1 requires two proteins encoded by the viral rep gene. *Virology* 279, 429-38.
- 20 Mackay, I.M., K.E. Arden, A. Nitsche. 2002 "Real-time PCR in virology". *Nucleic Acids Res.* 30 (6): 1292-305.
- Mankertz, A., Caliskan, R., Hattermann, K., Hillenbrand, B., Kurzendoerfer, P., Mueller, B., Schmitt, C., Steinfeldt, T. & Finsterbusch, T. (2004). Molecular biology of Porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. *Vet Microbiol* 98, 81-8.
- 25 Martinez, L., Kekarainen, T., Sibila, M., Ruiz-Fons, F., Vidal, D., Gortazar, C. & Segalés, J. (2006). Torque teno virus (TTV) is highly prevalent in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Vet Microbiol* 118, 223-229.
- 30 Mueller, B., Maerz, A., Doberstein, K., Finsterbusch, T. & Mankertz, A. (2008). Gene expression of the human Torque Teno Virus isolate P/1C1. *Virology*.
- Niel, C., Diniz-Mendes, L. & Devalle, S. (2005). Rolling-circle amplification of Torque teno virus (TTV) complete genomes from human and swine sera and identification of a novel swine TTV genogroup. *J Gen Virol* 86, 1343-7.
- 35 Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. (1997). *Biochem Biophys Res Commun* 241: 92-97
- 40 Okamoto, H., Nishizawa, T., Tawara, A., Takahashi, M., Kishimoto, J., Sai, T. & Sugai, Y. (2000). TT Virus mRNAs Detected in the Bone Marrow Cells from an Infected Individual. *Biochem Biophys Res Commun* 279, 700-707.
- 45 Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Tawara, A., Fukai, K., Muramatsu, U., Naito, Y. & Yoshikawa, A. (2002). Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaia. *J Gen Virol* 83, 1291-7.
- Okamoto, H. (2009). History of discoveries and pathogenicity of TT viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 331, 1-20.
- 50 Qiu, J., Kakkola, L., Cheng, F., Ye, C., Soderlund-Venermo, M., Hedman, K. & Pintel, D. J. (2005). Human Circovirus TT Virus Genotype 6 Expresses Six Proteins following Transfection of a Full-Length Clone. *J Virol* 79, 6505-6510.
- 55 Real-Time PCR: Current Technology and Applications, Publisher: Caister Academic Press, Editor: Julie Logan, Kirstin Edwards and Nick Saunders Applied and Functional Genomics, Health Protection Agency, London, ISBN: 978-1-904455-39-4
- Sambrook, J. et al. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor. ISBN 0-87969-309-6,
- 60 Taira, O., Ogawa, H., Nagao, A., Tuchiya, K., Nunoya, T. & Ueda, S. (2009). Prevalence of swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 in Japanese swine with suspected post-weaning multisystemic wasting syndrome and porcine respiratory disease complex. *Vet Microbiol* 139, 347-50.
- 65 Zheng, H., Ye, L., Fang, X., Li, B., Wang, Y., Xiang, X., Kong, L., Wang, 515 ng, W., Zeng, Y., Ye, L., Wu, Z., She, Y. & Zhou, X. (2007). Torque Teno Virus (SANBAN Isolate) ORF2 Protein Suppresses NF- κ B

Pathways via Interaction with I{kappa}B Kinases. J Virol 81, 11917-11924.

Ejemplos

5 Ejemplo 1

PCR cuantitativa en tiempo real para la detección de ADN viral de VTTp

Equipo usado

0,2 ml de Thermo-Strip	: Thermo Scientific (Westburg)
Placas de PCR de 96 pocillos Hard-Shell	: Biorad (cat N.º HSP-9635)
Película 'B' Microseal	: Biorad (cat N.º MSB 1001)
Soporte de congelador de PCR IsoFreeze™	: IsoFreeze
Bloque térmico	: Thermomixer comfort (Eppendorf)
Microcentrífuga	: Eppendorf 5418
Centrífuga para placas de microtitulación	: Eppendorf 5804R
Estación de trabajo de PCR	: Herolab CleneCab
Sistema en tiempo real CFX 96	: Biorad

10 *Aislamiento de ADN*

Se aisló ADN de 200 µl de suero, derivado de 5 cerdos diferentes, usando un kit de centrifugación del virus QIAamp® MinElute® (N.º de cat. de Qiagen 57704). Se aplicó el procedimiento descrito por el fabricante en el manual suministrado con el kit.

15 Se usó tampón AVE como tampón de resuspensión de proteasa y se realizó la etapa de lavado recomendada con tampón AW1. No se realizó el secado de la membrana recomendado a 56 °C.

20 Para eluir el ADN de la columna, se usaron 50 µl de tampón AVE.

Reacción de PCR

Mezcla madre para 15 reacciones:

25 187,5 µl de iQ™-SYBR® Green Supermix (BioRad, cat N.º 170-8882)
 82,5 µl de agua para inyección
 15,0 µl de cebador directo 10 µM: TTVall-F1 : CGAATGGCTGAGTTTATGCCGC
 15,0 µl de cebador inverso 10 µM: TTVall-R4: CCTGCCCGATAGCCCCTTG 300,0 µl
 30 A 13 pocillos de una placa de 96 pocillos se añadieron 20 µl de la mezcla madre y 5 µl de ADN aislado, ADN de plásmido de la serie de diluciones estándar o agua.

Series de diluciones estándar:

35 Las series de diluciones estándar contuvieron 6 muestras con una concentración del plásmido TTV008 (que contiene un fragmento de 320 pb de 5' UTR de VTTSu-tipo 2, véase el anexo 1) de 5x10⁵ copias/µl hasta de 5x10⁰ copias/µl. Debido a que se añadieron 5 µl de patrón a cada reacción de PCR, la curva de dilución estándar en la PCR osciló de 2,5x10⁶ copias a 2,5x10¹ copias de ADN.

Programación de la máquina de PCR

40 Se programó un sistema en tiempo real CFX 96 (Bio Rad) como sigue:

Etapa 1:		95 °C	5 minutos
Etapa 2:	40 x	}	95 °C 30 segundos
			62 °C 15 segundos
Etapa 3:			68 °C 30 segundos <= se mide la fluorescencia
			68 °C 7 minutos
Etapa 4:		Curva de fusión: 70 °C - 95 °C, incremento: 0,5 °C / 5 s	

Resultados

La Figura 1 muestran el gráfico de la curva de amplificación (Figura 1A) y de la curva patrón (Figura 1B) de la qPCR de amplio espectro para VTT porcino. En el gráfico de amplificación las curvas grises representan la serie de diluciones estándar y las curvas negras representan las muestras y no los controles de molde. En el gráfico de la curva patrón los puntos representan la serie de diluciones estándar y las cruces representan las muestras.

Tabla 1: Los datos pertenecen al gráfico de la curva de amplificación y de patrón. La cantidad inicial es la cantidad de partículas de VTTSu en la cepa clínica de ADN de 5 µl, que se pone en la PCR

Contenido	Objetivo	Ciclo umbral (Ct)	Cantidad inicial (SQ)	Log SQ
Est-1	2,50E+06	17,25		6,398
Est-2	2,50E+05	21,04		5,398
Est-3	2,50E+04	24,53		4,398
Est-4	2,50E+03	27,30		3,398
Est-5	2,50E+02	30,67		2,398
Est-6	2,50E+01	34,13		1,398
Descon-01	Cerdo 141	34,20	2,34E+01	1,369
Descon-02	Cerdo 151	33,24	4,58E+01	1,661
Descon-03	Cerdo 161	29,06	8,34E+02	2,921
Descon-04	Cerdo 204	25,56	9,46E+03	3,976
Descon-05	Cerdo 205	25,06	1,34E+04	4,128
NTC	Agua	N/A	N/A	N/A
NTC	Agua	N/A	N/A	N/A

La Figura 2 muestra los picos de fusión de los amplicones. Las curvas grises representan la serie de diluciones estándar y las curvas negras representan las muestras. Todas las muestras mostraron un pico con una temperatura de fusión entre 85,0 °C y 86,5 °C, que indica que la fluorescencia medida se deriva solamente del producto de PCR.

Tabla 2. Los datos pertenecen al gráfico del pico de fusión.

Contenido	Objetivo	Temperatura de fusión	Altura del pico	Temperatura inicial	Temperatura final
Est-1	2,50E+06	86,5	1939,64	80,5	91,0
Est-2	2,50E+05	86,5	2049,13	80,5	93,5
Est-3	2,50E+04	86,5	1891,92	80,0	93,5
Est-4	2,50E+03	86,5	1959,75	79,0	93,0
Est-5	2,50E+02	86,5	1781,68	80,0	94,0
Est-6	2,50E+01	86,5	1570,47	80,0	90,5
Descon-01	Cerdo 141	85,5	1195,51	79,5	93,5
Descon-02	Cerdo 151	86,0	1299,24	79,5	91,0
Descon-03	Cerdo 161	85,5	1587,08	79,5	92,5
Descon-04	Cerdo 204	85,0	1735,64	79,0	91,5
Descon-05	Cerdo 205	85,5	1800,00	79,5	91,0

Conclusión

Se mostró que las 5 muestras eran positivas para VTT. La concentración osciló entre $1,34 \times 10^4$ y $2,34 \times 10^1$ copias/reacción, que es igual a entre $6,71 \times 10^5$ y $1,17 \times 10^3$ copias de ADN de VTT/ml de suero.

Ejemplo 2

RT-PCR para la detección de ARNm viral de VTTp

Se extraerá ARN de $2,5 \times 10^5$ células de riñón porcino (PK). Las células se disgregarán usando 600 µl de reactivo TRIZOL® (Invitrogen) y 120 µl de 1-bromo-3-cloropropano (BCP, Sigma), la suspensión se centrifugará posteriormente a $12.000 \times g$ a 4 °C durante 15 minutos. La fase acuosa se obtendrá, se precipitará con 300 µl de 100 % de alcohol isopropílico y después se centrifugará a $12.000 \times g$ a 4 °C durante 10 min. El sedimento de ARN resultante se lava con 1 ml de 75 % de etanol y se seca al aire. El ARN se disuelve posteriormente en agua libre de RNasa. Se elimina el ADN contaminante de preparaciones de ARN usando el kit TURBO DNA-free™ (Ambion, Applied Biosystems). Brevemente, se añaden 2 unidades de DNasa por cada 10 µg de ARN, se incuban a 37 °C durante 30 min. La DNasa se inactiva y se elimina de la muestra de ARN por centrifugación a $10.000 \times g$ durante 1,5 minutos y el ARN se transfiere a un tubo nuevo. Se cuantificará el ARN y la pureza se comprobará usando un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific).

ES 2 616 836 T3

Se convierten quinientos nanogramos de ARN así obtenidos en ADN complementario (ADNc) usando el cebador poli-dT (5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' (V=A/C/G)) y el sistema de transcriptasa inversa (RT) SuperScript[™] (Invitrogen Corporation) de acuerdo al protocolo del fabricante. El control RT negativo se realizó usando agua estéril en lugar de la RT Superscript [™]II. Para verificar la presencia de ARNm de VTTSu, se realizan PCR usando el cebador de poli-dT y FW1 (5'-CTGGGCGGGTGCCG-3') o FW2 (5'-AGTCAAGGGGCCTATCGRGC-3'). Los productos de amplificación se corren entonces en un gel de agarosa al 1,8 %, y los productos de PCR se extraen del gel y se secuencian para verificar la amplificación correcta.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Intervet Int. B.V.
<120> Diagnósticos del virus Torque Teno

15 <130> 2011.019
<160> 9
<170> Patent In versión 3.5

20 <210> 1
<211> 22
<212> ADN
<213> Virus porcino Torque Teno

25 <400> 1
csaatgdcwg arytatrcg gc 22

30 <210> 2
<211> 17
<212> ADN
<213> Virus porcino Torque Teno

35 <400> 2
ctgggdcggg gccgvag 17

40 <210> 3
<211> 26
<212> ADN
<213> Virus porcino Torque Teno

<400> 3
cragycaag ggrywaycg rgcdgg 26

45 <210> 4
<211> 28
<212> ADN
<213> Virus porcino Torque Teno

50 <400> 4
ygtctarcmg mctgggdcggg tgccgvag 28

55 <210> 5
<211> 26
<212> ADN
<213> Virus porcino Torque Teno

<400> 5
cragycaag ggrywaycg rgcdgg 26

60 <210> 6
<211> 25
<212> ADN
<213> Virus porcino Torque Teno

65 <400> 6

ES 2 616 836 T3

```

taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa                25

<210> 7
<211> 25
5 <212> ADN
   <213> Virus porcino Torque Teno

<400> 7
gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa                25
10

<210> 8
<211> 25
<212> ADN
15 <213> Virus porcino Torque Teno

<400> 8
caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa                25

<210> 9
20 <211> 323
   <212> ADN
   <213> Virus porcino Torque Teno

<400> 9
25
   agttacacat aaccaccaa ccacaggtaa actctgcaa aaagaggaaa taaatctcat      60
   tgggtgggcc agaagtcctc attagaatac taaaaggacc aatcagaaac acttcctctt      120
   ttagagtata taagtaagtg cgcagacgaa tggctgagtt tatgccgctg gtggtagaca      180
   cgaacagagc tgagtgtcta accgcctggg cgggtgocgg agctcctgag agcggagtca      240
   aggggcctat cgggcaggcg gtaatccagc ggaaccgggc cccccctca atggaagaaa      300
   gatggctgac ggtagcgtac tgc                                           323

```

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de la presencia de VTTp de replicación en una muestra, caracterizado por que dicho método comprende las etapas de
- 5 a) realizar una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) de dicha muestra usando un conjunto de cebadores que comprende un cebador directo que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FRNA-a que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 4 o un cebador directo que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FRNA-b que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 5 y al menos un cebador inverso que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos del extremo 5' de un oligonucleótido RRNA-1 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 6, un oligonucleótido RRNA-2 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 7 o un oligonucleótido RRNA-3 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 8, y
- 10 b) examinar el resultado de la amplificación por RT-PCR de la etapa (a).
2. Un método para la detección de la presencia de VTTp de replicación según la reivindicación 1, **caracterizado por que** dicho cebador directo se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FRNA-a que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 4.
- 20 3. Un método para la detección de la presencia de VTTp de replicación según la reivindicación 2, **caracterizado por que** dicho método comprende además la etapa de examinar el resultado de la aplicación por PCR de la etapa (a) usando una sonda que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 5.
- 25 4. Un método para la detección de la presencia de VTTp de replicación en una muestra, **caracterizado por que** dicho método comprende las etapas simultáneas de
- 30 a) realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de dicha muestra usando un conjunto de cebadores que comprende un cebador directo que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FDNA-VTT que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 1 y un cebador inverso que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido RDNA-VTT-r2 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 3 y
- 35 b) realizar una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) de dicha muestra usando un conjunto de cebadores que comprende un cebador directo que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FRNA-a que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 4 y al menos un cebador inverso que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido RRNA-1 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 6, un oligonucleótido RRNA-2 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 7 o un oligonucleótido RRNA-3 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 8, y
- 40 c) examinar el resultado de la amplificación por (RT)-PCR de las etapas a) y b).
5. Un método para la detección de la presencia de VTTp de replicación en una muestra, **caracterizado por que** dicho método comprende las etapas simultáneas de
- 45 a) realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de dicha muestra usando un conjunto de cebadores que comprende un cebador directo que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FDNA-VTT que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 1 y un cebador inverso que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido RDNA-VTT-r1 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 2 y
- 50 b) realizar una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) de dicha muestra usando un conjunto de cebadores que comprende un cebador directo que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FRNA-b que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 5 y al menos un cebador inverso que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido RRNA-1 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 6, un oligonucleótido RRNA-2 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 7 o un oligonucleótido RRNA-3 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 8, y
- 55 c) examinar el resultado de la amplificación por (RT)-PCR de las etapas a) y b).
- 60 6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, **caracterizado por que** la etapa de realizar la reacción de PCR y/o de RT-PCR de dicho método comprende además al menos un conjunto adicional de cebadores no relacionado con VTT y al menos un molde adicional no relacionado con VTT.
7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, **caracterizado por que** dicho método comprende una etapa de purificación de ARN y/o ADN antes de la etapa a).
- 65

8. Un conjunto de cebadores que comprende un cebador directo que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FRNA-a que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 4 o un cebador directo que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FRNA-b que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 5 y al menos un cebador inverso que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos del extremo 5' de un oligonucleótido RRNA-1 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 6, un oligonucleótido RRNA-2 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 7 o un oligonucleótido RRNA-3 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 8.
9. Un kit de prueba de diagnóstico para la detección de la presencia de VTTp de replicación, caracterizado por que dicho kit comprende al menos un conjunto de cebadores según la reivindicación 8.
10. Un kit de prueba de diagnóstico para la detección simultánea de la presencia de ADNmc de VTTp y replicación del virus VTTp en una muestra, **caracterizado por que** dicho kit comprende un conjunto de cebadores que comprende un cebador directo que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FDNA-VTT que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 1 y un cebador inverso que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido RDNA-VTT-r2 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 3 y un conjunto de cebadores que comprende un cebador directo que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FRNA-a que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 4 y al menos un cebador inverso que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido RRNA que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 6, en SEQ ID NO.: 7 o en SEQ ID NO.: 8.
11. Un kit de prueba de diagnóstico para la detección simultánea de la presencia de ADNmc de VTT y replicación del virus VTTp en una muestra, **caracterizado por que** dicho kit comprende un conjunto de cebadores que comprende un cebador directo que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FDNA-VTT que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 1 y un cebador inverso que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido RDNA-VTT-r1 que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 2 y un conjunto de cebadores que comprende un cebador directo que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido FRNA-b que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 5 y al menos un cebador inverso que se une a un tramo de al menos 14 nucleótidos consecutivos de un oligonucleótido RRNA que tiene una secuencia como se representa en SEQ ID NO.: 6, en SEQ ID NO.: 7 o en SEQ ID NO.: 8.
12. Kit de prueba de diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones 9-11, **caracterizado por que** dicho kit de prueba comprende al menos un conjunto adicional de cebadores no relacionado con VTT y al menos un molde adicional no relacionado con VTT.

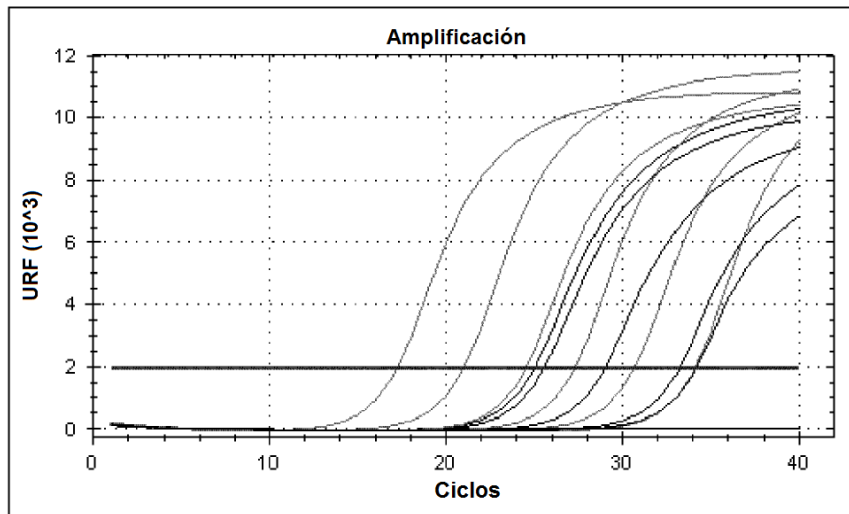


Figura 1a

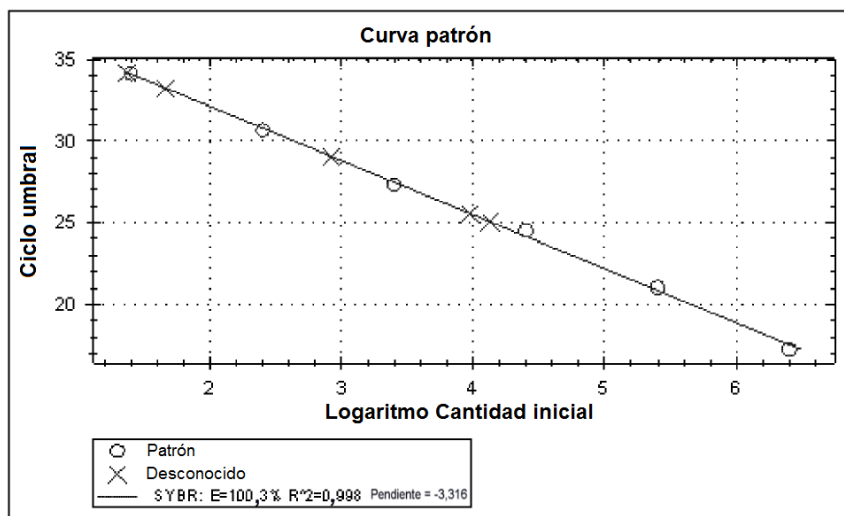


Figura 1b

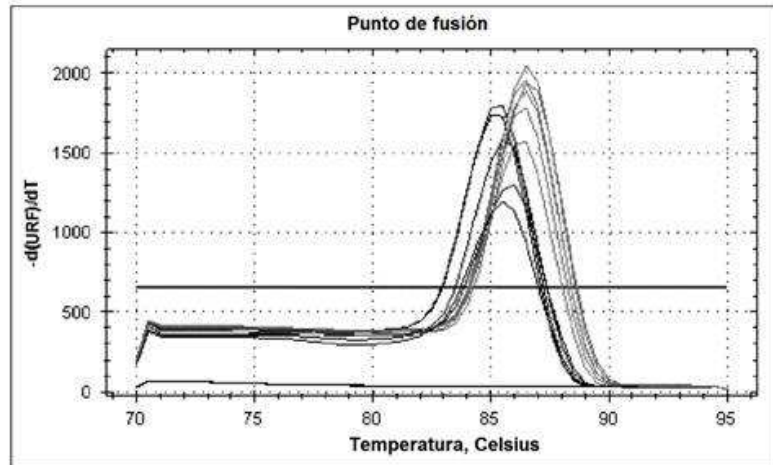


Figura 2

ANEXO 1
Plásmido TTV008:

El plásmido TTV08 comprende un fragmento 323 pb, generado por amplificación de ADN aislado de suero porcino Hyclone (FSD29672) usando los cebadores VTT2-106F

(AGTTACACATAACCACCAAACC) y VTT2-425R

(GCAGTACGCTACCGTCAGCCATC), se clonó en el vector pSC-A-amp/kan siguiendo el manual de instrucciones del kit de clonación de PCR StrataClone (Stratagene).

Secuencia del inserto TTV008:

AGTTACACATAACCACCAAACCACAGGTAAGTCTGCAAAAAAGAGGAAATAAATCTCATTG
 GTTGGGCCAGAAGTCCTCATTAGAATACTAAAAGGACCAATCAGAAACACTTCCTCTTTTAGA
 GTATATAAGTAAGTGCAGACGAATGGCTGAGTTTATGCCGCTGGTGGTAGACACGAACAG
 AGCTGAGTGTCTAACCGCCTGGGCGGGTGCCGGAGCTCCTGAGAGCGGAGTCAAGGGGCCA
 TCGGGCAGGCGGTAATCCAGCGGAACCGGGCCCCCCCCTCAATGGAAGAAAGATGGCTGACG
 GTAGCGTACTGC

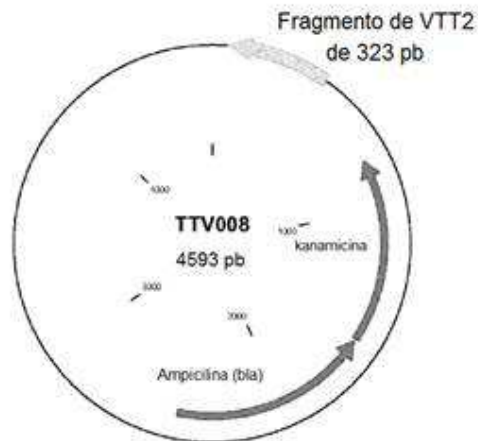


Figura 3.