

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 386**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

G01N 15/14 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.10.2012 PCT/AU2012/001208**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2013 WO13049891**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2012 E 12838196 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2764125**

54 Título: **Composiciones y métodos para la detección patógenos respiratorios usando sondas de ácido nucleico y subconjuntos de gránulos**

30 Prioridad:

04.10.2011 AU 2011904105

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

06.04.2018

73 Titular/es:

**GENERA BIOSYSTEMS LIMITED (100.0%)
1 Dalmore Drive
Scoresby, Victoria 3179, AU**

72 Inventor/es:

**POETTER, KARL FREDERICK y
VANDEGRAAFF, NICK**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 662 386 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

Composiciones y métodos para la detección patógenos respiratorios usando sondas de ácido nucleico y subconjuntos de gránulos

Campo de la invención

- 5 La presente descripción es instructiva para un ensayo de amplificación de ácidos nucleicos multiplex para detectar e identificar múltiples patógenos respiratorios.

Antecedentes de la invención

Los detalles bibliográficos de las publicaciones mencionadas por el autor en esta memoria descriptiva se recogen alfabéticamente al final de la descripción.

- 10 La referencia en esta memoria descriptiva a cualquier publicación anterior (o información derivada de ella), o a cualquier materia que se conozca, no es y no debe tomarse como un reconocimiento o admisión o cualquier forma de sugerencia de que esa publicación previa (o la información derivada de ella) o la materia conocida forman parte del conocimiento general común en el campo del esfuerzo al que se refiere esta memoria descriptiva.

- 15 La Australian Lung Foundation ha publicado que las infecciones del tracto respiratorio superior representan aproximadamente 3-4 millones de visitas a médicos de cabecera (GP) cada año en Australia, costando a los contribuyentes más de 150 millones AU\$ en costos directos y considerablemente más en costos indirectos. Las infecciones del tracto respiratorio inferior representan casi 3 millones de visitas a los médicos de cabecera cada año en Australia. El impacto social y económico se ve agravado por la cantidad de hospitalizaciones atribuidas a las infecciones respiratorias. Por ejemplo, la neumonía adquirida en la comunidad se asocia con una tasa de mortalidad general en Australia de aproximadamente 12% por año para pacientes hospitalizados mayores de 65 años. Esta tasa de mortalidad aumenta a aproximadamente 20% si están presentes enfermedades comórbidas (por ejemplo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, insuficiencia cardíaca congestiva, diabetes). Además, hasta 30.000 admisiones hospitalarias por asma y hasta 40.000 ingresos hospitalarios por enfermedad pulmonar obstructiva crónica son precipitadas por las infecciones virales, implicadas en del 50 al 80% de todas las hospitalizaciones por asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Como resultado, la carga de costos directos e indirectos en Australia se estima en más de 500 millones de AU\$ cada año.

- 20 Los agentes etiológicos asociados con la infección respiratoria pueden clasificarse en bacterianos (incluida Bordetella pertussis), fúngicos y virales. Los virus de influenza de tipo A o B causan epidemias de enfermedades casi todos los inviernos. Las vacunas de temporada (vacunas contra la gripe) pueden prevenir la enfermedad de los tipos de influenza A y B, pero no protegen contra la influenza tipo C. El virus sincicial respiratorio (VSR) es la principal causa de las infecciones agudas de las vías respiratorias inferiores en bebés y niños pequeños, y la mayoría de hospitalizaciones que ocurren en bebés menores de 1 año de edad. En todo el mundo, se cree que el VSR está asociado con una tasa de mortalidad anual de 160.000-600.000 muertes. Aquellos en mayor riesgo de enfermedad grave por VSR incluyen los bebés prematuros y bebés con cardiopatía congénita, enfermedad neuromuscular, anomalías estructurales de las vías respiratorias e inmunodeficiencias. Los virus de la parainfluenza humanos (HPIV, por sus siglas en inglés) son los segundos, después del VSR, que son la causa común de enfermedades del tracto respiratorio inferior en niños pequeños. Los HPIV también pueden causar enfermedades graves del tracto respiratorio inferior con infecciones repetidas, que incluyen neumonía, bronquitis y bronquiolitis, especialmente entre los ancianos y entre los pacientes con sistemas inmunes comprometidos.

- 30 A pesar de la magnitud de las enfermedades respiratorias en todo el mundo, los tratamientos son principalmente de ayuda en su naturaleza. El uso de broncodilatadores, corticosteroides y antagonistas del receptor de leucotrienos (por ejemplo, montelukast) generalmente no ha demostrado un beneficio clínico concluyente y los fármacos antivirales, tales como la ribavirina, han demostrado solo un beneficio clínico marginal. Los enfoques actuales para el tratamiento y la prevención de las infecciones respiratorias incluyen anticuerpos monoclonales de segunda generación y compuestos antivirales altamente potentes, tales como Oseltamivir (Tamiflu [marca registrada]) y Zanamivir (marca comercial registrada como Relenza) para el tratamiento de la influenza. También están en desarrollo composiciones de vacunas. Sin embargo, la efectividad de los regímenes de tratamiento existentes depende en gran medida de la identificación del patógeno respiratorio en cuestión. Desafortunadamente, dada la gran cantidad de los posibles patógenos respiratorios y de las cepas correspondientes, el uso de diagnósticos estándar para identificar un patógeno respiratorio particular en una muestra consume mucho tiempo, es costoso y con frecuencia conduce a diagnósticos incorrectos o no concluyentes. Un laboratorio típico de virología diagnóstica usa cultivos virales, tinción de inmunofluorescencia y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar virus respiratorios. Sin embargo, las técnicas existentes tienen limitaciones significativas. Por ejemplo, el cultivo viral requiere mucho tiempo y carece de la sensibilidad requerida para la detección, particularmente de virus que son lábiles durante el transporte y/o tienen requisitos de crecimiento exigentes. La tinción con inmunofluorescencia es insensible, a menudo conduce a resultados negativos falsos y los ensayos actuales de PCR generalmente carecen de una capacidad de detección de alto rendimiento para manejar de manera efectiva una gran cantidad de muestras que contienen múltiples dianas.

El documento WO2008/042450 describe kits y métodos útiles para la detección de patógenos respiratorios (influenza A (incluida la capacidad de subtipaje para los subtipos H1, H3, H5 y H7), influenza B, parainfluenza (tipo 2), virus sincitial respiratorio y adenovirus) en una muestra.

5 El documento WO2011/053241 describe un método para diseñar cebadores de polinucleotídicos/sondas capaces de una hibridación específica tolerante e incompatible, útiles en la detección múltiple y que comprende etapas de captura y amplificación.

Existe la necesidad de desarrollar un ensayo para detectar múltiples patógenos respiratorios con un alto nivel de rapidez y sensibilidad.

Sumario

10 La invención proporciona un método de cribado de una muestra para una multiplicidad de patógenos respiratorios para detectar un patógeno particular en un método de amplificación en fase sólida, comprendiendo el método:

(a) aislar el ácido nucleico de la muestra, cuyo ácido nucleico supuestamente comprende un ácido nucleico de dos o más patógenos respiratorios;

15 (b) someter el ácido nucleico a amplificación en presencia de un conjunto de gránulos que tiene subconjuntos de gránulos a los que se inmovilizan sondas de oligonucleótidos con dos o más combinaciones de pares de cebadores que comprenden cebadores directos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 1 a 16, 33 y 35 y cebadores inversos correspondientes seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 17 a 32, 34 y 36, respectivamente, en donde los pares de cebadores dirigen la amplificación de una región de ácido nucleico de un patógeno respiratorio y en donde se captura el amplicón hibridando con dicho conjunto de gránulos, en donde las sondas de oligonucleótidos son complementarias a una región de un amplicón generado por amplificación utilizando las combinaciones de pares de cebadores y las sondas correspondientes se seleccionan de 2 o más de las siguientes secuencias (SEQ ID N°: 54, 76, 79, 82, 85, 88, 91, 94, 97, 100, 101, 104, 107, 108, 111, 114, 117, 120, 123, 126); y en el que un miembro de cada par de cebadores comprende un primer marcador ópticamente detectable que se incorpora en un amplicón resultante después de la amplificación; y en donde dicho conjunto de gránulos tiene subconjuntos de gránulos, siendo cada subconjunto homogéneo con respecto al tamaño del gránulo y, opcionalmente, la intensidad de un segundo marcador ópticamente detectable, creando de este modo un conjunto de gránulos heterogéneo basado en el tamaño y/o la segunda intensidad del marcador detectable y en donde el número de subconjuntos corresponde a la cantidad de patógenos respiratorios que se van a cribar;

20 (c) determinar a cuál de las gránulos se ha unido un amplicón sobre la base de la intensidad del primer marcador detectable y, cuando los amplicones están unidos a múltiples subconjuntos de gránulos, distinguir entre los subconjuntos múltiples de gránulos en función del tamaño del gránulo; en donde la unión de un amplicón a un subconjunto particular de gránulos es indicativa de la presencia de un patógeno respiratorio particular en la muestra.

Se describe en este documento un método de cribado de una muestra para analizar una multiplicidad de patógenos respiratorios para detectar un patógeno particular, comprendiendo el método:

35 (a) aislar el ácido nucleico de la muestra, cuyo ácido nucleico supuestamente comprende un ácido nucleico de uno o más patógenos respiratorios;

40 (b) someter el ácido nucleico a amplificación, en donde un par de cebadores acuosos dirige la amplificación de una región de ácido nucleico de un patógeno respiratorio, seleccionándose el número de pares de cebadores sobre la base del número de patógenos que se desea cribar y en donde al menos un miembro del par de cebadores comprende un primer marcador detectable ópticamente que se incorpora en un amplicón resultante después de la amplificación; en el que el amplicón se captura hibridando con una sonda oligonucleotídica que es complementaria a una región del amplicón y se inmoviliza en un gránulo en un conjunto de gránulos, teniendo el conjunto de gránulos subconjuntos de gránulos, siendo cada subconjunto homogéneo con respecto al tamaño del gránulo y, opcionalmente, a la intensidad de un segundo marcador detectable ópticamente, creando de este modo un conjunto de gránulos heterogéneo basado en el tamaño y/o la intensidad del segundo marcador detectable y en el que el número de subconjuntos corresponde al número de patógenos respiratorios a cribar;

45 (c) determinar a cuál de los gránulos se ha unido un amplicón sobre la base de la intensidad del primer marcador detectable y, cuando los amplicones están unidos a múltiples subconjuntos de gránulos, distinguir entre los subconjuntos múltiples de gránulos en función del tamaño del gránulo y, opcionalmente, sobre la base de la intensidad del segundo marcador detectable ópticamente, en el que la unión de un amplicón a un subconjunto particular de gránulos es indicativa de la presencia de un patógeno respiratorio particular en la muestra.

En una realización, la amplificación es una amplificación en fase sólida.

55 En una realización, el amplicón iniciado por extensión del cebador que comprende el primer marcador ópticamente detectable sirve como molde para la hibridación y extensión de un oligonucleótido (cebador hemi-anidado) que comprende un segundo marcador ópticamente detectable, en el que el oligonucleótido se inmoviliza en un gránulo

en un conjunto de gránulos.

También se describe un método de cribado de una muestra para analizar una multiplicidad de patógenos respiratorios para detectar un patógeno particular, comprendiendo el método:

5 (a) aislar el ácido nucleico de la muestra, cuyo ácido nucleico supuestamente comprende un ácido nucleico de uno o más patógenos respiratorios;

(b) someter el ácido nucleico a amplificación en fase sólida; en donde un par de cebadores acuosos dirige la amplificación de una región de ácido nucleico de un patógeno respiratorio, seleccionándose el número de pares de cebadores sobre la base del número de patógenos que se desea cribar y en donde al menos un miembro del par de cebadores comprende un primer marcador ópticamente detectable que se incorpora en un amplicón resultante
10 después de la amplificación, en el que el amplicón resultante iniciado por la extensión del cebador que comprende el primer marcador ópticamente detectable sirve como molde para la hibridación y extensión de un oligonucleótido (cebador hemi-anidado) que comprende un segundo marcador ópticamente detectable, en el que el oligonucleótido se inmoviliza en un gránulo en un conjunto de gránulos, teniendo el conjunto de gránulos un subconjunto de gránulos, cada subconjunto siendo homogéneo con respecto al tamaño del gránulo y, opcionalmente, la intensidad
15 de un segundo marcador ópticamente detectable, creando así un conjunto de gránulos heterogéneo en el tamaño y/o la intensidad del segundo marcador detectable y en el que el número de subconjuntos corresponde a la cantidad de patógenos respiratorios a cribar;

(c) determinar a cuál de los gránulos se ha unido un amplicón sobre la base de la intensidad del primer marcador detectable y, cuando los amplicones están unidos a múltiples subconjuntos de gránulos, distinguir entre los subconjuntos múltiples de gránulos en función del tamaño del gránulo y, opcionalmente, sobre la base de la intensidad del segundo marcador detectable ópticamente;

en donde la unión de un amplicón a un subconjunto particular de gránulos es indicativa de la presencia de un patógeno respiratorio particular en la muestra.

25 En una realización, el método comprende distinguir entre subconjuntos múltiples de gránulos en base a la intensidad del segundo marcador detectable ópticamente.

En una realización, el patógeno respiratorio se selecciona del grupo que consiste en Influenza A, Influenza B, Influenza A H1N1, Influenza A H5N1, Virus Sincitial Respiratorio subtipo A, Virus Sincitial Respiratorio subtipo B, Virus de la parainfluenza humano 1, Virus de la parainfluenza humano 2, Virus de la parainfluenza humano 3, Virus de la parainfluenza humano 4, Metapneumovirus Humano, Adenovirus humano subtipo B, Adenovirus humano subtipo C, Adenovirus humano subtipo E, Enterovirus humano, Rhinovirus humano Bordetella pertussis, Chlamydomphila pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae y otros microbios de los géneros Haemophilus, Mycoplasma y Chlamydomphila.

35 En una realización, el ácido nucleico del patógeno respiratorio se selecciona del grupo que consiste en el gen que codifica el segmento 7 de la proteína matriz de Influenza A, el gen que codifica el segmento 4 de la hemaglutinina de Influenza B, el gen que codifica el segmento 4 de la cepa pandémica 2009 H1N1 de Influenza A, el gen que codifica el Segmento 4 de la cepa pandémica H5N1 de Influenza A, el gen de la polimerasa del Virus Sincitial Respiratorio (tipos A y B), el gen que codifica la glucoproteína hemaglutinina-neuraminidasa del Virus de la parainfluenza humano 1, 2 y 3, el gen de la fosfoproteína del Virus de Parainfluenza Humano 4, el gen que codifica la región M2 de la proteína matricial del Metapneumovirus Humano, el gen que codifica la región Hexon de los Adenovirus Tipos B, C y E, región 5'UTR del Rhinovirus/Enterovirus Humano, el Elemento de Inserción (IS) 481 de Bordetella pertussis, el gen que codifica la Proteína de Membrana Externa Mayor de Chlamydomphila pneumoniae y el gen que codifica P1 Citadhesina de Mycoplasma pneumoniae.

45 En una realización, el par de cebadores comprende un cebador directo seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs. 1 a 16 y SEQ ID NO: 33 y 35 y un cebador inverso correspondiente seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 17 a 32 y SEQ ID NO: 34 y 36.

En una realización, la sonda de oligonucleótidos/cebador hemi-anidado se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 37 a 52. En una realización, la sonda de oligonucleótidos es una sonda de oligonucleótidos de control seleccionada de SEQ ID NOs: 53 y 54.

50 En una realización, el método comprende amplificar una secuencia de ácido nucleico control usando un par de cebadores que comprende un cebador directo seleccionado de SEQ ID NO: 33 y 35 y un cebador inverso correspondiente seleccionado de SEQ ID NO: 34 y 36.

55 En una realización, el método comprende someter el ácido nucleico a condiciones de amplificación con 16 pares de cebadores que comprenden cebadores directos de SEQ ID NOs: 1 a 16 y cebadores inversos correspondientes de SEQ ID NOs: 17 a 32, y en los que las sondas de oligonucleótidos/cebadores hemi-anidados se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 37 a 52.

En una realización, el método comprende amplificar una secuencia de ácido nucleico usando un par de cebadores que comprende un cebador directo e inverso y la sonda correspondiente seleccionada de SEQ ID NO: 74 a 126.

5 En una realización, el método comprende someter el ácido nucleico a condiciones de amplificación en fase sólida con pares de cebadores que comprenden cebadores directos e inversos y la sonda correspondiente seleccionada de SEQ ID NOs: 74 a 126 y en donde los cebadores son cebadores hemi-anidados.

10 En una realización, los primeros y segundos marcadores ópticamente detectables son fluoróforos seleccionados del grupo que consiste en hidroxycumarina, aminocoumarina, metoxicoumarina, azul cascada, amarillo Lucifer, NBD, Ficoeritrina (PE), PerCP, aloficocianina, hoechst 33342, DAP1, azul SYTOX, hoechst 33258, cromomicina A3; mitramicina, YOYO-I, SYTOX verde, SYTOX naranja, 7-AAD, naranja de acridina, TOTO-1, To-PRO-I, naranja de tiazol, TOTO-3, TO-PRO-3, LDS 751, colorantes Alexa Fluor incluyendo Alexa Fluor-350, -430, -488, -532, -546, -555, -556, -594, -633, -647, -660, -680, -700 y -750; Colorantes BoDipy, incluidos BoDipy 630/650 y BoDipy 650/665; Colorantes CY, particularmente Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy 5.5 y Cy7; 6-FAM (fluoresceína); PE-Cy5, PE-Cy7, fluoresceína dT; Hexaclorofluoresceína (Hex); 6-carboxi-4', 5'-dicloro-2', T-dimetoxifluoresceína (JOE); Tintes verdes de Oregón, incluidos 488-X y 514; Colorantes de rodamina, que incluyen X-rodamina, Lisamina rodamina B, rodamina verde, rodamina rojo y ROX; TRITC₃ Tetrametilrodamina (TMR); Carboxitetrametilrodamina (TAMRA); Tetraclorofluoresceína (TET); Rojo 6B5 FluorX, BODIPY-FL y Texas Rojo.

En una realización, el primer marcador detectable ópticamente es AlexaFluor-647.

20 En una realización, el segundo marcador detectable ópticamente es boro-dipirrometeno (BoDipy)-TMR. En una realización, el segundo marcador ópticamente detectable está unido a la sonda de oligonucleótido. En una realización, el segundo marcador ópticamente detectable se une a la sonda de oligonucleótido a través de una modificación de amino C6 de un residuo de timidina interno de la sonda de oligonucleótido.

En una realización, la sonda de oligonucleótidos es un oligonucleótido hemi-anidado. En una realización, la sonda de oligonucleótidos se une covalentemente al gránulo mediante un enlace tiol o metacrilo.

25 En una realización, el tamaño de los gránulos dentro de cada subconjunto se selecciona del grupo que consiste en 3,0 µm, 3,5 µm, 3,8 µm, 4,3 µm, 5,0 µm, 5,2 µm y 5,7 µm de diámetro.

Además, se describe en este documento un kit que comprende dos o más pares de cebadores oligonucleotídicos seleccionados de SEQ ID NOs: 1 y 17, 2 y 18, 3 y 19, 4 y 20, 5 y 21, 6 y 22, 7 y 23, 8 y 24, 9 y 25, 10 y 26, 11 y 27, 12 y 28, 13 y 29, 14 y 30, 15 y 31 y 16 y 32 y una sonda correspondiente seleccionada de SEQ ID NOs: 37 a 52, respectivamente.

30 Además, se describe en este documento un kit que comprende dos o más pares de cebadores de oligonucleótidos y una sonda de cebador correspondiente como se enumera en la Tabla 8 (SEQ ID NOs: 74 a 126).

35 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se denominan mediante un número de identificador de secuencia (SEQ ID NO). Una lista de secuencias se adjunta al final de la memoria descriptiva. Las SEQ ID NO se corresponden numéricamente con los identificadores de secuencia <400> 1 (SEQ ID NO: 1), <400> 2 (SEQ ID NO: 2), etc. En la Tabla 1 se proporciona un resumen de los identificadores de secuencia utilizados a lo largo de la memoria descriptiva objeto. Una lista de estas secuencias se proporciona en la Tabla 2.

Tabla 1

Resumen de identificadores de secuencia

SECUENCIA ID NO:	DESCRIPCIÓN
1	Cebador directo para el segmento 7 de la proteína de matriz de influenza A
2	Cebador directo para el segmento 4 de la hemaglutinina de influenza B
3	Cebador directo para el segmento 4 de H1N1
4	Cebador directo para el segmento 4 de H5N1
5	Cebador directo para el gen de la polimerasa del virus sincicial respiratorio (tipos A y B)
6	Cebador directo para la glicoproteína hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la parainfluenza humano 1
7	Cebador directo para el cebador de la glucoproteína hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la parainfluenza humano 2

ES 2 662 386 T3

8	Cebador directo para la glucoproteína hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la parainfluenza humano 3
9	Cebador directo para la glucoproteína hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la parainfluenza humano 4
10	Cebador directo para el gen que codifica la región M2 de la proteína matricial del metapneumovirus humano
11	Cebador directo para el gen que codifica la región Hexón de Adenovirus tipos B y E
12	Cebador directo para el gen que codifica la región Hexón de Adenovirus tipo C
13	Cebador directo de la región 5'UTR del rinovirus humano/enterovirus
14	Cebador directo de Bordetella pertussis
15	Cebador directo de Chlamidophila pneumoniae
16	Cebador directo de Mycoplasma pneumoniae
17	Cebador inverso para el segmento 7 de proteína de matriz de influenza A.
18	Cebador inverso para el segmento 4 de la hemaglutinina de la influenza B
19	Cebador inverso para el segmento 4 de H1N1
20	Cebador inverso para el segmento 4 de H5N1
21	Cebador inverso para el gen de la polimerasa del virus sincicial respiratorio (tipos A y B)
22	Cebador inverso para la glucoproteína hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la parainfluenza humano 1
23	Cebador inverso para la glucoproteína hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la parainfluenza humano 2
24	Cebador inverso para la glucoproteína hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la parainfluenza humano 3
25	Cebador inverso para la glucoproteína hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la parainfluenza humano 4
26	Cebador inverso para el gen que codifica la región M2 de la proteína matricial del metapneumovirus humano
27	Cebador inverso para el gen que codifica la región Hexón de Adenovirus tipos B y E
28	Cebador inverso para el gen que codifica la región Hexón de Adenovirus tipo C
29	Cebador inverso de la región 5'UTR del rinovirus humano/enterovirus
30	Cebador inverso de Bordetella pertussis
31	Cebador inverso de Chlamidophila pneumoniae
32	Cebador inverso de Mycoplasma pneumoniae
33	Cebador directo de MYL3
34	Cebador inverso de MYL3
35	Cebador directo de Matriz MS-2
36	Cebador inverso de Matriz MS-2
37	Sonda de oligonucleótidos complementaria a una región del amplicón generada por pares de cebadores SEQ ID NO: 1 y 17

ES 2 662 386 T3

38	Sonda de oligonucleótidos complementaria a una región del amplicón generada por pares de cebadores SEQ ID NO: 2 y 18
39	Sonda de oligonucleótidos complementaria a una región del amplicón generada por pares de cebadores SEQ ID NO: 3 y 19
40	Sonda de oligonucleótidos complementaria a una región del amplicón generada por pares de cebadores SEQ ID NO: 4 y 20
41	Sonda de oligonucleótidos complementaria a una región del amplicón generada por pares de cebadores SEQ ID NO: 5 y 21
42	Sonda de oligonucleótidos complementaria a una región del amplicón generada por pares de cebadores SEQ ID NO: 6 y 22
43	Sonda de oligonucleótidos complementaria a una región del amplicón generada por pares de cebadores SEQ ID NO: 7 y 23
44	Sonda de oligonucleótidos complementaria a una región del amplicón generada por pares de cebadores SEQ ID NO: 8 y 24
45	Sonda de oligonucleótidos complementaria a una región del amplicón generada por pares de cebadores SEQ ID NO: 9 y 25
46	Sonda de oligonucleótidos complementaria a una región del amplicón generada por pares de cebadores SEQ ID NO: 10 y 26
47	Sonda de oligonucleótidos complementaria a una región del amplicón generada por pares de cebadores SEQ ID NO: 11 y 27
48	Sonda de oligonucleótidos complementaria a una región del amplicón generada por pares de cebadores SEQ ID NO: 12 y 28
49	Sonda de oligonucleótidos complementaria a una región del amplicón generada por pares de cebadores SEQ ID NO: 13 y 29
50	Sonda de oligonucleótidos complementaria a una región del amplicón generada por pares de cebadores SEQ ID NO: 14 y 30
51	Sonda de oligonucleótidos complementaria a una región del amplicón generada por pares de cebadores SEQ ID NO: 15 y 31
52	Sonda de oligonucleótidos complementaria a una región del amplicón generada por pares de cebadores SEQ ID NO: 16 y 32
53	Sonda de oligonucleótidos complementaria a una región del amplicón generada por pares de cebadores SEQ ID NO: 33 y 34
54	Sonda de oligonucleótidos complementaria a una región del amplicón generada por pares de cebadores SEQ ID NO: 35 y 36
55	MS2P (RTI-C1)
56	InA (RTI-C2)
57	InB (RTI-C3)
58	H1 (RTI-C4)
59	H5 (RTI-C5)
60	RSVA (RTI-C5) - Obsoleto (ver RTI-C18)
61	RSVB (RTI-C7) - Obsoleto (ver RTI-C19)
62	Para1 (RTI-C8)
63	Para2 (RTI-C9)

ES 2 662 386 T3

64	Para3 (RTI-C 10)
65	Para4 (RTI-C11)
66	HMPV (RTI-C12)
67	AdV (RTI-C13)
68	Rhino (RTI-C14)
69	B. pertussisIS481 (RTI-C15)
70	C. pneumoniae (RTI-C16)
71	M. pneumoniae (RTI-C17)
72	RSV-A Pol Control (RTI-C18)
73	RSV-B Pol Control (RTI-C 19)
74	Cebador directo Am-InfA2
75	Cebador inverso InfA2
76	Acry InfA2
77	Cebador directo Am-InfB-2
78	Inverso InfB-2
79	Acry AS InfB-2
80	Cebador inverso H1N1
81	Cebador directo H1N 1
82	Acry H1N1
83	Cebador directo Am-H5N1
84	Cebador inverso H5N 1
85	Acry AS-H5N1
86	Cebador directo Am-RSV-3
87	Cebador inverso RSV-3
88	Acry AS-RSV-3
89	Cebador directo Am GB HPIV1
90	Cebador inverso GB HPIV1
91	Acry GB HPIV1
92	Cebador directo Am-Para2
93	Cebador inverso Para2
94	Acry AS-Para2
95	Cebador directo Am-Para3
96	Cebador inverso Para3
97	Acry AS-Para3
98	Cebador directo Am-Para4

ES 2 662 386 T3

99	Cebador inverso Para4
100	Acry GB HPIV-4 Pr1
101	Acry GB HPIV-4 Pr2
102	Cebador directo Am-hMPV
103	Cebador inverso hMPV
104	Acry AS-hMPV
105	Cebador directo AdV
106	Cebador inverso AdV
107	Acry AdV B / E
108	Acry AdV C
109	Cebador inverso truncRhi
110	Cebador directo T7truncRhi
111	Acry Rhi
112	Cebador directo Bper
113	Cebador inverso Bper
114	Acry Bper
115	Cebador directo Cpn
116	Cebador inverso Cpn
117	Acry Cpn
118	Cebador directo Mpneu
119	Cebador inverso Mpneu
120	Acry Mpneu
121	Cebador inverso MS2-2
122	Cebador directo MS2-2
123	Acry MS2-2
124	Cebador directo MYL3
125	Cebador inverso MYL3
126	Oligonucleótido Pap tipo ProbeMLC_Int
127	Cebador directo Am-InfA
128	Cebador inverso P-InfA
129	AS InfA
130	Cebador directo alt Am-InfA
131	Cebador inverso P-InfA
132	AS InfA
133	Cebador directo InfB

ES 2 662 386 T3

134	Cebador inverso InfB
135	InfB
136	Cebador directo RSV
137	Cebador inverso RSV
138	RSV
139	Cebador directo Am-Para1
140	Cebador inverso P-Para1
141	AS-Para1

Tabla 2

Resumen de secuencias

SECUENCIA ID NO:	DESCRIPCIÓN
1	CGAGGTCGAAACGTAYGTTCTYTCTAT
2	TACGGTGGATTAACAAAAGCAAGCC
3	CCAAGACAAGTTCATGGCCCAATCA
4	GCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCC
5	ACAGTCAGTAGTAGACCATGTGAATTC
6	TGGTGATGCAATATATGCGTATTCATC
7	CYCGTCCTGGAGTCATGCCATGCAA
8	CAAGTTGGCAYAGCAAGTTACAATTAGGA
9	GTTGATCAAGACAATAACAATTACACTTGA
10	GACAAATCATMATGTCTCGYAARGCTCC
11	TGCCSCARTGGKCDTACATGCACATC
12	TGCCSCARTGGKCDTACATGCACATC
13	GAAACACGGACACCCAAAGTAGT
14	CCGGCCGGATGAACACCCATAAGCA
15	CATGAATGGCAAGTAGGAGCCTCTC
16	GAACCGAAGCGGCTTTGACCGCATC
17	GCCATTCATGAGAGCCTCRAGATC
18	CAGGAGGTCTATATTTGGTTCCATTGGC
19	GCTTTTTGCTCCAGCATGAGGACAT
20	YCTTCTCCACTATGTAAGACCATTCCGG
21	RTCRAATCTTCATCACCATACTTTTCTGTTA
22	CCGGGTTTAAATCAGGATACATATCTG
23	CRTTAAGCGGCCACACATCTGCGT
24	GTCCCATGGACATTCATTGTTTCCTGGT
25	TAAGTGCATCTATACGAACRCCTGCTC
26	CTATCWGGCCAACTCCAGTAATTGTG

SECUENCIA ID NO:	DESCRIPCIÓN
27	GCRCGGGCRAACTGCACCAG
28	GCRCGGGCRAACTGCACCAG
29	ACTCACTATAGGAGCCTGCGTGGCKGCC
30	GGGCCGCTTCAGGCACACAACTTG
31	AGTTTTGGCTGAGCAATGCGGATGT
32	GCGTGGGCGTTTGCGGGTTTAACTT
33	GCACCCAGACAATACACACAGGTGT
34	GGCGGAAGTCAGCATGTGTCTG
35	GCACGCTCCTGCTACAGCCTCTTCC
36	CTTTTGCAGGACTTCGGTCGACGCC
37	GAATTCGGATCCAGTCTCTGCGCGATCTCGGCTTTGAG
38	GAATTCGGATCCGGTGTTTTACCCATATTGGGCAATT
39	GAATTCGGATCCCATGCTGCCGTTACACCTTTGTTCG
40	GAATTCGGATCCCCCAGGAGCCAT CCAGCTACACTAC
41	GAATTCGGATCCGTTCTATAAGCTGGTATTGATGCAGG
42	GAATTCGGATCCCCTATATCTGCACATCCTTGAGTGATT
43	GAATTCGGATCCACCCCTGTGATGCAATTAGCAGGGCA
44	GAATTCGGATCCAGCACATTATGCCATGTCCATTTTATCC
45	GAATTCGGATCCGGTTCAGAYAAWATGGGTCTTGCTA
46	GAATTCGGATCCTTGCCCCGYACTTCATATTTGCA
47	GAATTCGGATCCGCTTCGGAGTACCTGAGTCCGGGT
48	GAATTCGGATCCTCGGGCCAGGACGCCTCGGAGTAC
49	GAATTCGGATCCTCCTCCGGCCCCTGAATGYGGCTAA
50	GAATTCGGATCCTGCCCGATTGACCTTCTACGTCGA
51	GAATTCGGATCCTGGTCTCGAGCAACTTTTGATGCTG
52	GAATTCGGATCCGGGCGCGCCTTATACGACCTCGATT
53	AAAGGGAGGACAGCTATGGACCAAACACAGACACAGAGAG ACCCACAGACA
54	GAATTCGGATCCGAAGTGCCGCAGAACGTTGCCGAACC

SECUENCIA ID NO:	DESCRIPCIÓN
55	taatac gactc actataggg gaga aattaaccctc actaaaggg agagtttcgggttctccctc gacgc acgtcctgctacagcctcttccctg taagccaaaactg acttacatc gaagtgccgcagaacgttg cgaaccgggctc gaccgaagtcctg caaaaggtcaccagggttaatttaacctgggttgctta gcagaggccaggtcgacagcctcacaactcgcgacgcaaacattgcgctcgtgaaggcgtacac tccgctcgtcggtaattggcgccaggcgtccgctaccttgccctaaac gaagatc gaaagttt cgalcaaacacgtggccggcaggtgggtggagttgcagttcgggtggttaccactaatgagtgccg ccgc
56	taatac gactc actataggg gaga aattaaccctc actaaaggg agactttggccccatg gaatgtatc tccctttaagcttctatacagtttaactgctctgctccatgttattggatccccattcccatttagggcatt ttggacaagcgtctacgctgcaagtcctgctcactgggcacgggtgagcgtgaacacaaaactctaaa atccccctagtcagaggtgacaggattggcttctttagccattccatgagagcctcaagatctgtgt tcttccctgcaaagacatctcaagctctgctgcgcaiccggtttgagggggcctgacgggacgata gagagaacgtactgttcgacctcggtagaagactcatttcaatatctagcggccgc
57	taatac gactc actataggg gaga aattaaccctc actaaaggg agacttcaagaaaccagcaatag ctccgaagaaaccccttcttaataagittgcaggaggctatatttgggtccattggcaagcttcaa ggtgtttcaccatattgggcaatttctatggctttgcatgttctcctgtagtaaggcttgcctttgtt aatccaccgtattttcgtgaaggcaatctgcttaattggcttctcctctgtacaaatgtatggactct actgttagtgattcgttctgtttgtgtgtcgttcttgggacagcccaagccattgttgcgaaaaat ccgttctactggtaacgttagggcaagatcctgaggtccaagctgtagggtcctcctggtgccttt ctgcattgataacgttagcggccgc
58	taatac gactc actataggg gaga aattaaccctc actaaaggg agatattatcattaatg taggatttgc gagctttgggtatgaatttcttttaactagccatattaaattttgtagaagcttttgcctcagcatgag gacatgctgccgttacacctttgttcgagtcagattgggcatgaactgtcttggggaatatctcaaa ctttcaaatgatgacactgagctcaattgctcttagctctcataatc gatgaaatctcctgggtaac acgttccattgtctgaactagatgttccacaatgtaggaccatgagcttgcgtggagagtgattcaca ctctggatttccagatccagccagcaatgttacatttaccctaaatgcaatgggctacccctcttag tttgcatagttcccgtatgcttctctagaaggtaacagagtggttactgttacattctttctagtac tgtgtctcggccgc
59	aatac gactc actataggg gaga aattaaccctc actaaaggg agacacaaatttaaatgcaattctg cattgtaacgatccattggagcacatccataaagatagaccagccaccatgattgccagtgctaggg aactcgccactgttgaataaattgacagatttggtaagttcctattgattccaattttatcagttctcat agtctgtgaaattcccgggtaacagaggtcattggctggattggccttccactatgtaagaccattc cggcacattgatgaattcgtcacacattgggttccgaggagccatccagctacactacaatctttaa aattagaggcttactccatctatgacgcagagcttcccgttgtgtctcggccgc
60	taatac gactc actataggg gaga aattaaccctc actaaaggg agatagaaaatgctttatgattcca cgattttattggatgctgtacatttatttggccatagcatgacacaatggctcctagagatgtgataac ggagctgcttacatctgttttgaagtcataatttgaatcatalgtgtacctctgtatttcccattatgcc taggccagcagcattgcctaatactacactggagaagtgaggaaattgagtcaaagacaataatgat gcttttgggttgtcaatatatgtagaacctgcttctccaccaatttttgggcatattcatatgctcgt tggatggtgtatttgcgtgatgacagaagtgatcttgtgtgagtgatcattcaactgactttgctaaga gccattttgtatttgcctcatttctttagtctccttaatttfaaactataatttccagctccatt tgaactatggagtggtggcggccgc

SECUENCIA ID NO:	DESCRIPCIÓN
61	taatacgactcactataggggagaathaaccctcactaaagggagaathaatcccacgattttgttggatg tcagtgcaattagttttaccatagcatgacactatagctccaagagaagtaactactgagctgcttatgt ctgttttgatgcatatactcctccattatgcttagacctgctgcaatgcttaggaccacacttgagaag ttaggaaatgagtaatgacagcaatgatgcttttgattgtcaatataatgtagaatccagcttctcct cccaacttctgtcatactcataattgggagtgcaatattatctctgtactacgttgaatagtgtattg ctggatgacagcagctgatccfattaatgtatcatttaactgactttgctaagagccatcttgtattg cccaatttatgtattggctttacttttattttaactactaaaacggattagctccttcttaactattgagcat tgtgtttgaggaatagcttgggttgggttgggtttttttgttgaatgcccgc
62	taatacgactcactataggggagaathaaccctcactaaagggagattgaaccagtgcaagcttgggt ttctgtgcgcagcagactttatgagggcccaathaattggtcaggggttggatataatgatcc ttttgcaggttgagtgccaacctgaacccctgttctgcagctattacagaacatgatttctgtgt cgttgatgcataggtatgagaaattaccgggttaaatcaggatacatatctgaattaaaggatataa cctaattgtaaacctgatatgacttccctatactgcacatcctgagtgattaagttgatgaatacga tatattgcatcacaattgataatgaaggtagttaacacatcctgaaattgtgtggatccagaaagta gacttgggtccaggaathaattgagagcggccgc
63	taatacgactcactataggggagaathaaccctcactaaagggagacattaagcggccacacatctg cgtacaccctgtgatgcaattagcagggcaaaaacttgttcattgcatggcatgactccaggacg aggaacttgataggacggtaccattgagcctcaatgatcggagctgcaggattgattgtggccac tcccctgttatttgaagagatatgactttcaataaaggatcattataataatagaagcaagtct cagttcagctagatcagctgtggcataatcttcttttcagacctgtgactacatagcaatacaagaca caacctcctggtatagcagtgactgaacagcttttgcgattgattccatcacttaggtaaatggtttcat agtctgcggccgc
64	taatacgactcactataggggagaathaaccctcactaaagggagatggacatgaatgccccatgg acattcattgttctgttctgatagcacattatgcatgcccattttatccttataactgtagtcagtaa tgcathattcctaattgtaacttctgtgtccaactttagatcttcttatataaagtatgagatcctg ggattaaagtcaggtaccaagctgaglttacagttattatccctatctgtaatacttgatatttctat atcctgacaacctgagtaattagattgaggtgtaagcataaatcagggccgc
65	taatacgactcactataggggagaathaaccctcactaaagggagactgtatttttaagtcatctatac gaacacctgctcgtctctcatcggtttttgttgggtccagataatagggcttctgaatgagtaagtg taattgtattgtctgatcaacaaatttgagacgtctccgtaccagtaacaattataggaactgttctga ttcttgtttaaactcctgagacttactttgatgggactccaggatccatttttcttctgtgattaagc cctcaattgtggcaagtgaaccttgatttggagtgctcattcttggctgaattgattttgagtaagc ataatttgcactttcccftcaactctgtctagctcacttctaataatgcccgc
66	taatacgactcactataggggagaathaaccctcactaaagggagaggacatgctcactgcaactg attagtccttactgcttgcagggcatatgaagagtcattgtcagcgcctgctgataagcctatctg gccaactccagtaattgtggttaaactgcaactcacttctctgttgcatttccccgcacttcatattgc atggagccttgcgagacattatgattgtcatccttagagctgtgctaataatattgattcctatttctgag catatttgaatcagtatgttagcatatagaatttccacacaaaagtgtatttcttggcaatgatga ggggtgcaactgcaattgttgcctacatcttttattgtgactgagactctttaaataatagcatgcttgt atgatagatcactcaggtgaatccctgaaagagacatttgcggccgc

SECUENCIA ID NO:	DESCRIPCIÓN
67	taatac gactc actataggg gagaattaaccctc actaaaggg gagaatggcc accccatc gatgctg cccaatgggc atacatgcacatcgccgg acaggatgcttcgg agtacctgagtcggggtctggtg cagttcggccg gccacagacacctacttcaatctgg gaaataagtttagaaatccc accgtagcgc cgaccacgatgtgaccaccg accgtagccagcggctcatgttgcgcttcgtgacttgggacagaa tatgctctatgccaactcagctcatgctctggacatgaccttgagggtggatcccatggatgagccac cctgctttatcttctctcgaagtttctgacgtggtcagagtgcatcagccacaccg cggcatcatcga ggcagctacctg cgtacaccgttctcggccg gtaacgctaccacgtaagcggccgc
68	taatac gactc actataggg gagaattaaccctc actaaaggg gagaataagtagacctggcagatg aggctagaaatcccc actggcgacagtggtctagcctgcgtggctgectgcacacctttttgggc tgtgaagccatataattgacaaggtgtgaagagccccgtgtgctcacttttgagctctccggcccctga atgtggctaaccctaacctgcagccattgcacacaatccagtggtatctggctgtaatgagcaattg cgggatgggaccaactactttgggtgtccgtgtttcaittttttccitttatatttggctatggtgacaatgt atatatagtatataatattgtcatcatgggcgctcaggtatctagacagaatgttcggccgc
69	taatac gactc actataggg gagaattaaccctc actaaaggg gagaactaggtgtgaagattcaatagg ttgatgcatggttcatccgaaccggatttgagaaactggaaatcgcaacccccagttcactcaag gagccccggccgatgaacaccataagcatgcccgatgaccttctacgtc gactc gaaatggtc cagcaattgatgccatcaagttgtgtgctgaagcggcccgttgcaccgacaatggctcgg cttctgcagccgccttcgccgctgtgccatgagctgggcatcaagcaccgcttaaccgacc ttaccgccacagaccaatggcaaggcgaacgcttcatccagtcggccttgcgtgagtgggcttac gctgcccgc
70	taatac gactc actataggg gagaattaaccctc actaaaggg gagaacttgcgctacttggctgcgacgc tattagcttacgtgctggatttacggagactatgtttcgcaccgtatctaaaagtagatgcacctaaaa cattttctatgggagccaacgctggcgtagcaacagctactggaacaaagtctgcaccatcaattat catgaatggcaagtaggagcctctctatctacagactaaactcttagtgccatacattggagtacaat ggtctcgagcaactttgatgctgataacatccgattgctcagccaaaactacctacagctgtttaaa cttactgcatggaacccttcttactaggaatgccacagcattgtctactactgattcgttctcagcgc gccgc
71	taatac gactc actataggg gagaattaaccctc actaaaggg gagaagccagcaatttagctacacc gccctgacgaggtcgcgctgcgccacaccaatgccatcaaccgcgcttaacccgtaacgctac gtaacacgagcttttctccctccccctcacgggtgaaaatcccggggcgtgggccttagtgcgga caacagcgttaagggcatcactgccggcagtggcagtaacaaaccacgtatgatcccaccgaa ccgaagcggcttgaccgcatcaaccactttgcgttacgccggtatgacctgcggggcgcgctt atacgacctgattttcgaagttaaaccgcaaacgccacgcgcgaccaaacgggcagatcac cttaaccccttggcggcttgggtttagtggggctgcacccaacagtgaaacgcggccgc
72	taatac gactc actataggg gagaattaaccctc actaaaggg gagaataattctgtaggacatacat tagtaaatgttctactactgacattaagctaaggccaaagctatacagtttggaaactatataat ctcatcaccatactttctgtaatatgcatgtaaatagggctagtatcaaaagtataattttagtctata agciggattgatgcaaggaaatcaca'ggtctactactgactgtaaggc gatgcaaatagtaacact taaatattgtggaataatttttggcttctcatatgtaacccaagaatcctatgctaaggcggccgc

SECUENCIA ID NO:	DESCRIPCIÓN
73	taatac gactc actat aggg gaga aatta accct cactaa aggg gaga aata attct attagg acat atgtttg tgaattgtccacaaccgacatcaggctaa gacc aaaa actatgcaat tttgaaacacaatgtcgat atct tcatctccatactttctgtaatacatgattgataggactag t atcgaaatgataattgtgttctataagct ggattgatgcagggaattcacatggctactactgactgttaa acgggtgaaataattgacacttagat at tgtggaacaacttttggcttttcatatgacag tcca agtgtccag t actc agtgcggccgc
74	CGAGGTCGAAACGTAYGTTCTYTCTAT
75	GCCATTCCATGAGAGCCTCRAGATC
76	AATTGAATTCGGATCCAGTCTCTGCGCGATCTCGGCTTTGAG
77	TACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGCC
78	CAGGAGGTCTATATTTGGTTCCATTGGC
79	GAATTCGGATCCGGTGT TTTT CACCCATATTGGGCAATT
80	GCTTTTGTCTCCAGCATGAGGACAT
81	CCCAAGACAAGTTCATGGCCCAATCA
82	AATTGAATTCGGATCCCGAACAAAGGTGTAACGGCAGCATG
83	GCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCC
84	YCTTCTCCACTATGTAAGACCATTCCGG
85	AATTGAATTCGGATCCCCGAGGAGCCATCCAGCTACACTAC
86	ACAGTCAGTAGTAGACCATGTGAATTC
87	RTC RATATCTTCATCACCATACTTTTCTGTTA
88	AATTGAATTCGGATCCGTTCTATAAGCTGGTATTGATGCAGG
89	TGGTGATGCAATATATGCGTATTCATC
90	CCGGGTTTAAATCAGGATACATATCTG
91	GAATTCGGATCCCCTATATCTGCACATCCTTGAGTGATT
92	CYCGTCCTGGAGTCATGCCATGCAA
93	CRTTAAGCGGCCACACATCTGCGT
94	GAATTCGGATCCACCCCTGTGATGCAATTAGCAGGGCA
95	CAAGTTGGCAYAGCAAGTTACAATTAGGA
96	GTCCCATGGACATTCATTGTTTCCTGGT
97	GAATTCGGATCCAGCACATTATGCCATGTCCATTTTATCC
98	GTTGATCAAGACAATACAATTACACTTGA

SECUENCIA ID NO:	DESCRIPCIÓN
99	TAAGTGCATCTATACGAACRCCTGCTC
100	GAATTCGGATCC GGTTCAGACAAAATGGGTCTTGCTA
101	GAATTCGGATCC GGTTCAGATAATATGGGTCTTGCTA
102	GACAAATCATMATGTCTCGYAARGCTCC
103	CTATCWGGC [^] CAACTCCAGTAATTGTG
104	GAATTCGGATCCTTGCCCCGYACTTCATATTTGCA
105	TGCCSCARTGGKCDTACATGCACATC
106	GCRCGGGCRAACTGCACCAG
107	AATTGAATTCGGATCCGCTTCGGAGTACCTGAGTCCGGGT
108	AATTGAATTCGGATCCTCGGGCCAGGACGCCTCGGAGTAC
109	GAAACACGGACACCCAAAGTAGT
110	ACTCACTATAGGAGCCTGCGTGGCKGCC
111	GAATTCGGATCCTCCTCCGGCCCCTGAATGYGGCTAA
112	CCGGCCGGATGAACACCCATAAGCA
113	GGGCCGCTTCAGGCACACAAACTTG
114	GAATTCGGATCCTGCCCGATTGACCTTCCTACGTCGA
115	CATGAATGGCAAGTAGGAGCCTCTC
116	AGTTTTGGCTGAGCAATGCGGATGT
117	GAATTCGGATCCTGGTCTCGAGCAACTTTTGATGCTG
118	GAACCGAAGCGGCTTTGACCGCATC
119	GCGTGGGCGTTTGCGGGTTTAACTT
120	GAATTCGGATCCGGGCGCGCCTTATACGACCTCGATT
121	CTTTTGCAGGACTTCGGTGCACGCC
122	GCACGCTCCTGCTACAGCCTCTTCC
123	AATTGAATTCGGATCCGAAGTGCCGCAGAACGTTGCGAACC
124	GCACCCAGACAATACACACAGGTGT
125	GGCGGAAGTCAGCATGTGTCTG
126	AAAGGGAGGACAGCTATGGACCAAACACAGACACAGAGAGA CCCACAGACA
127	TRGGRTTTGTGTTACGCTCACCGTG

SECUENCIA ID NO:	DESCRIPCIÓN
128	GGGCATTTTGGACAAAGCGTCTACGC
129	GAATTCGGATCCTGCAGTCCTCGCTCACTGGGCA
130	GACAAGACCAATCCTGTCACCTCTGAC
131	GGGCATTTTGGACAAAGCGTCTACGC
132	GAATTCGGATCCTGCAGTCCTCGCTCACTGGGCA
133	GCACCAGGAGGACCCTACARAMTTGGA
134	TTGGGACRGGCCAAGCCATTGTTGCG
135	ACCTCAGGRTCTTGCCCTAACGYTACCA
136	TTGGGWGGAGAAGCWGGWTTCTACCA
137	ATTATGCCTAGRCCWGCWGCATTGCC
138	ARYARTGATGCTTTTGGRTTGTTCAATAT
139	TGGCACTCCAACCTGCAAATAGGATCA
140	CCAGTTGCAGTCTTGGTTTCTGGTCG
141	GAATTCGGATCCACAGGACTTYATGAGGCGCCCA

Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1A a D muestran las secuencias de inserción de construcción de control y sus identificadores.

5 La Figura 2 es una representación fotográfica que muestra la confirmación de la identidad de plantillas de ARN mediante RT-PCR específica.

La Figura 3 es una representación fotográfica que muestra concentraciones de cebadores que dan como resultado una amplificación eficiente de todas las plantillas de ADN diana.

La Figura 4 es una representación fotográfica que muestra las condiciones de cebadores que dan como resultado una amplificación eficiente de las plantillas de ARN y ADN.

10 Las Figuras 5A y B son representaciones fotográficas que muestran perfiles de amplificación por RT-PCR en ausencia o presencia de ADN cromosómico humano de fondo.

La Figura 6 es una representación gráfica que muestra una visión general del proceso general de diseño de cebadores.

Descripción detallada

15 A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderán que implican la inclusión de un elemento o número entero determinado o paso de método o grupo de elementos o números enteros o pasos de método, pero no la exclusión de ningún elemento o número entero o paso de método o grupo de elementos o números enteros o pasos de método.

20 Tal como se usa en la memoria descriptiva del sujeto, las formas singulares "un", "uno/a" y "el/la" incluyen a los aspectos singulares y plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un patógeno respiratorio" incluye un único patógeno respiratorio, así como dos o más patógenos respiratorios diferentes; la referencia a "un agente" incluye un único agente, así como dos o más agentes; la referencia a "la descripción" incluye uno o varios aspectos enseñados por la descripción. La invención es como se define en las reivindicaciones añadidas.

25

La presente descripción enseña la detección y diferenciación de múltiples patógenos respiratorios en una muestra.

Se describe en este documento un método de selección de una muestra para una multiplicidad de patógenos respiratorios para detectar un patógeno particular, comprendiendo el método:

(a) aislar el ácido nucleico de la muestra, cuyo ácido nucleico supuestamente comprende un ácido nucleico de uno o más patógenos respiratorios;

5 (b) someter el ácido nucleico a amplificación, en donde un par de cebadores acuosos dirige la amplificación de una región de ácido nucleico de un patógeno respiratorio, seleccionándose el número de pares de cebadores sobre la base del número de patógenos que se desea cribar y en donde al menos un miembro del par de cebadores comprende un primer marcador detectable ópticamente que se incorpora en un amplicón resultante después de la amplificación; en el que el amplicón se captura hibridando con una sonda oligonucleotídica que es complementaria a una región del amplicón y que está inmovilizada en un gránulo en un conjunto de gránulos, teniendo el conjunto de gránulos subconjuntos de gránulos, siendo cada subconjunto homogéneo con respecto al tamaño del gránulo y, opcionalmente, a la intensidad de un segundo marcador detectable ópticamente, creando de este modo un conjunto de gránulos heterogéneo basado en el tamaño y/o la intensidad del segundo marcador detectable y en el que el número de subconjuntos corresponde al número de patógenos respiratorios a cribar;

15 (c) determinar a cuál de los gránulos un amplicón se ha unido sobre la base de la intensidad del primer marcador detectable y, cuando los amplicones están unidos a múltiples subconjuntos de gránulos, distinguiendo entre los subconjuntos múltiples de gránulos en función del tamaño del gránulo y, opcionalmente, sobre la base de la intensidad del segundo marcador detectable ópticamente;

20 en donde la unión de un amplicón a un subconjunto particular de gránulos es indicativa de la presencia de un patógeno respiratorio particular en la muestra.

En una realización, la amplificación es una amplificación en fase sólida.

25 En una realización, el amplicón iniciado por la extensión del cebador que comprende el primer marcador ópticamente detectable sirve como molde para la hibridación y extensión de un oligonucleótido (cebador hemi-anidado) que comprende un segundo marcador ópticamente detectable, en el que el oligonucleótido se inmoviliza en un gránulo en un conjunto de gránulos.

Además, se describe un método de cribado de una muestra para una multiplicidad de patógenos respiratorios para detectar un patógeno particular, comprendiendo el método:

(a) aislar el ácido nucleico de la muestra, cuyo ácido nucleico supuestamente comprende un ácido nucleico de uno o más patógenos respiratorios;

30 (b) someter el ácido nucleico a amplificación en fase sólida; en donde un par de cebadores acuosos dirige la amplificación de una región de ácido nucleico de un patógeno respiratorio, seleccionándose el número de pares de cebadores sobre la base del número de patógenos que se desea cribar y en donde al menos un miembro del par de cebadores comprende un primer marcador ópticamente detectable que se incorpora en un amplicón resultante después de la amplificación, en el que el amplicón resultante iniciado por la extensión del cebador que comprende el primer marcador ópticamente detectable sirve como molde para la hibridación y extensión de un oligonucleótido (cebador hemi-anidado) que comprende un segundo marcador ópticamente detectable, en donde el oligonucleótido se inmoviliza en un gránulo en un conjunto de gránulos, teniendo el conjunto de gránulos subconjuntos de gránulos, siendo cada subconjunto homogéneo con respecto al tamaño del gránulo y, opcionalmente, la intensidad de un segundo marcador ópticamente detectable, creando así un conjunto de gránulos heterogéneo en tamaño y/o intensidad del segundo marcador detectable y en el que el número de subconjuntos corresponde a la cantidad de patógenos respiratorios a cribar;

35 (c) determinar a cuál de los gránulos un amplicón se ha unido sobre la base de la intensidad del primer marcador detectable y, cuando los amplicones están unidos a múltiples subconjuntos de gránulos, distinguir entre los subconjuntos múltiples de gránulos sobre la base del tamaño del gránulo y, opcionalmente, sobre la base de la intensidad del segundo marcador detectable ópticamente;

40 en donde la unión de un amplicón a un subconjunto particular de gránulos es indicativa de la presencia de un patógeno respiratorio particular en la muestra.

45 El término "patógeno" se refiere a un microorganismo o virus que es capaz de infectar o colonizar un huésped. Un huésped puede ser una única célula o un sujeto que comprenda una multiplicidad de células. Por lo tanto, un "huésped" incluye a un sujeto. Ejemplos de patógenos incluyen los virus, las bacterias, los hongos y los microorganismos eucariotas. Un "patógeno respiratorio" se refiere a un patógeno que es capaz de infectar o colonizar el tracto respiratorio de un huésped, al que también se hace referencia en este documento como un patógeno colonizador, un patógeno autóctono, un patógeno comensal o un organismo comensal. Será entendido por los expertos en la técnica que un patógeno puede estar presente en un sujeto sano libre de infección. En el estado normal y saludable, estos patógenos no causan infección mientras el sujeto no desarrolle síntomas respiratorios. Sin embargo, después de un factor desencadenante (por ejemplo, mala salud, estrés), el patógeno puede convertirse en

un patógeno causante de una infección respiratoria crónica/aguda.

Los patógenos respiratorios son conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, Influenza A, Influenza B, Influenza A H1N1, Influenza A H5N1, Virus Sincitial Respiratorio subtipo A, Virus Sincitial Respiratorio subtipo B, Virus de la parainfluenza humano 1, Virus de la parainfluenza humano 2, Virus de la parainfluenza humano 3, Virus de la parainfluenza humano 4, metapneumovirus humano, subtipo B de adenovirus humano, subtipo C de adenovirus humano, subtipo E de adenovirus humano, enterovirus humano, rinovirus humano, Bordetella pertussis, Chlamydomphila pneumoniae y Mycoplasma pneumoniae, y cepas de los mismos. También se prevén microbios de los géneros Streptococcus, Haemophilus, Moraxella, Pseudomonas, Klebsiella, Stenotrophomonas, Acinetobacter, Staphylococcus, Mycoplasma, Legionella, Chlamydomphila, Mycobacterium, Coxiella, Nocardia, Pneumocystis, Nocardia y Aspergillus, incluidos los mencionados anteriormente.

En este documento se muestra también un método para detectar y/o diferenciar entre una o más cepas particulares de un patógeno respiratorio en una muestra. La referencia en este documento a "cepas" incluye cualquier variante de la especie o taxón del analito. Los ejemplos de "cepas" de un patógeno respiratorio incluyen subespecies del patógeno, variantes del patógeno con diferentes niveles de virulencia, variantes del patógeno que indican diferentes pronósticos al infectar o colonizar un hospedador, variantes bioquímicas del patógeno y similares.

El término "muestra", como se usa en este documento, se usa de forma intercambiable con el término "analito" para referirse a cualquier materia de composición que supuestamente comprende uno o más patógenos respiratorios. Los ejemplos incluyen muestras biológicas de un sujeto, que incluyen, pero no se limitan a, sangre, suero, plasma, saliva, heces, orina, linfa, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, líquido tisular, semen, exudado, pus, fluido respiratorio y mocos e hisopos de úlceras tóxicas, cánceres y lesiones y muestras de tejidos o células, tales como raspados celulares, biopsias y similares.

Las muestras contempladas por el método descrito en este documento también incluyen muestras industriales tales como aire, agua y tierra y similares. Las muestras también pueden incluir hielo, rocas, respiraderos hidrotérmicos y aire; entornos de asistencia sanitaria que incluyen hospitales, equipos hospitalarios, equipos quirúrgicos, prendas para el personal sanitario y similares; entornos "industriales" que incluyen instalaciones de fabricación, instalaciones farmacéuticas, cervecerías, bodegas y similares; y entornos de "laboratorio" que incluyen fermentadores, cultivos, bancos, equipos y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a cualquier organismo que pueda ser susceptible a una infección o colonización por un patógeno respiratorio. Los ejemplos de sujetos incluyen, pero no se limitan a, animales, plantas, hongos y bacterias (que pueden estar infectados por bacteriófagos). Un sujeto incluye una célula huésped o una multiplicidad de células huésped. Como se usa en este documento, el término "animal" incluye un mamífero que incluye un primate tal como un primate inferior y un cebador superior que incluye un ser humano. Sin embargo, el término "animal" también incluye específicamente especies de ganado tales como ganado, caballos, ovejas, cerdos, cabras y burros, así como animales de laboratorio. Ejemplos de animales de prueba de laboratorio incluyen ratones, ratas, conejos, conejillos de indias y hámsteres. Los conejos y los animales roedores, tales como las ratas y los ratones, proporcionan un sistema de prueba conveniente o un modelo animal, al igual que los primates y los primates inferiores. También se contemplan animales no mamíferos tales como especies aviares, pez cebra, anfibios (incluyendo sapos de caña) y especies de Drosophila, tales como la Drosophila melanogaster. El sujeto también puede ser un animal, tal como una planta.

En una realización, el sujeto es un ser humano.

La infección respiratoria en animales, particularmente en especies de ganado, puede causar pérdidas económicas significativas. Por ejemplo, la enfermedad respiratoria bovina (BRD), que incluye las infecciones del tracto respiratorio superior, la difteria y la neumonía, se ha atribuido a más del 60-70% de las enfermedades y muertes en el ganado de engorde. Tanto los agentes virales como los bacterianos pueden causar BRD y pueden ser extremadamente difíciles de controlar. Mientras que los animales se recuperan de la enfermedad en la mayoría de los casos, típicamente se presentan con algún grado de lesiones a largo plazo. Por ejemplo, los estudios han demostrado que el 30-50% de todos los bovinos que muestran signos de lesiones pulmonares en el sacrificio son el resultado de una enfermedad respiratoria pasada. Para controlar las enfermedades respiratorias en este entorno, muchos administradores de ganado activamente diagnostican y tratan los brotes por cuarentena y tratan a los animales infectados con antibióticos y/o medicamentos antivirales. Sin embargo, estos esfuerzos correctivos suelen ser costosos y a menudo no logran curar la enfermedad. Además, el éxito del tratamiento depende invariablemente de la salud respiratoria del animal antes del inicio de la enfermedad y la identificación de los patógenos respiratorios en juego. Por lo tanto, el método descrito en este documento tiene aplicación en la industria ganadera para identificar patógenos respiratorios en un animal infectado o en una población de animales, permitiendo así un mejor diagnóstico y la implementación de regímenes de tratamiento más eficaces.

Además de afectar la forma en que los animales responden al tratamiento, el daño patológico derivado de una enfermedad previamente respiratoria puede afectar negativamente al rendimiento de un animal en la instalación de engorde. Por ejemplo, se ha demostrado que el ganado de engorde con daños respiratorios mayores gana menos peso que aquellos animales con menos daños respiratorios. Además, la carne derivada de ganado con mayores

daños a menudo es de menor calidad que la carne derivada de ganado con menores daños.

En una realización, el sujeto es un animal de ganado. En una realización relacionada, el patógeno respiratorio se selecciona de un virus de una granja de engorde que incluye, pero no se limita a, virus del herpes bovino 1 (BHV-1 o IBR), virus parainfluenza 3 (P13), virus de la diarrea viral bovina (BVDV) y virus sincitiales respiratorios bovinos (BRSV) y una bacteria de granja de engorde o un organismo de tipo bacteriano que incluye, pero no se limita a, Mannheimia haemolytica, Pasteurella multocida, Haemophilus somnus, Mycoplasma spp. y Chlamydia.

La expresión "ácido nucleico" y los términos "nucleótido" y "polinucleótido" se usan indistintamente en este documento e incluyen ARN, ADNc, ADN genómico, formas sintéticas y polímeros mixtos, tanto cadenas sentido como antisentido, y pueden modificarse química o bioquímicamente o pueden contener bases de nucleótidos no naturales o derivatizadas, como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, marcadores, metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos que se producen de forma natural con un análogo (tal como un anillo de morfina), modificaciones internucleotídicas tales como enlaces no cargados (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.), enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), restos colgantes (por ejemplo, polipéptidos), intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), quelantes, alquilantes y enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos α -anoméricos, etc.). También se incluyen moléculas sintéticas que imitan a los polinucleótidos en su capacidad para unirse a una secuencia designada a través de enlaces de hidrógeno y otras interacciones químicas. Dichas moléculas son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, aquellas en las que los enlaces peptídicos sustituyen a los enlaces de fosfato en la cadena principal de la molécula.

Los ácidos nucleicos se pueden aislar de la muestra sujeto usando cualquier método conocido por los expertos en la técnica. El aislamiento de un ácido nucleico se debe entender que significa un ácido nucleico que generalmente se ha separado de otros componentes con los que está asociado o vinculado de forma natural en su estado nativo. En una realización, el ácido nucleico aislado está al menos 50% libre, o al menos 75% libre, o al menos 90% libre de otros componentes con los que está asociado de forma natural. El grado de aislamiento expresado puede estar relacionado con la pureza de sustancias interferentes.

El ADN se puede aislar de la muestra usando cualquier medio conveniente conocido por el destinatario experto. Por ejemplo, en el caso de un virus supuestamente expresado en una célula humana, se puede usar guanidina o un agente funcionalmente equivalente para lisar las células. En algunas realizaciones, el ADN se purifica a partir de la muestra usando una cantidad límite de un agente de unión a ADN tal como, pero sin limitación, sílice. Al usar una cantidad limitante del agente de unión al ADN, se puede aislar una cantidad uniforme de ADN de diferentes muestras ya que la cantidad de ADN recuperado en cada caso es igual a la cantidad máxima de ADN que puede unirse por la cantidad límite del agente de unión del ADN. El ADN unido al agente de unión del ADN puede luego recuperarse o eluirse del agente de unión del ADN usando cualquier medio conveniente.

Dependiendo de las circunstancias, lo que sería evidente para cualquier experto en la materia, el ARN se aísla, por ejemplo, cuando el patógeno respiratorio de interés es un virus ARN. Si se aísla el ARN, el ARN puede amplificarse, o el ARN puede transcribirse de forma inversa en ADNc usando métodos conocidos por los expertos en la técnica, para su posterior amplificación y análisis. En una realización, el ARN viral o el ADN correspondiente se aísla de una célula hospedadora infectada.

El método enseñado en este documento comprende el uso de cebadores específicos para amplificar una secuencia de ácido nucleico en una muestra que está altamente conservada en los miembros del taxón de interés. Esquemáticamente, la región amplificada tiene la estructura general de:

C_F -X- C_R , en donde:

C_F es una secuencia de nucleótidos que se conserva a través de los miembros del taxón diana y es el sitio de unión del cebador "directo" (F);

X es una secuencia de nucleótidos, parte de la cual comprende una región conservada a través de miembros del taxón diana; y

C_R es una secuencia de nucleótidos que se conserva a través de los miembros del taxón diana y es el sitio de unión del cebador "inverso" (R) correspondiente.

La amplificación de sitios de cebadores tales como las descritas en este documento produce de manera efectiva cadenas de ácido nucleico marcadas (amplicones) que luego se cargan en soportes sólidos después de la hibridación con sondas de captura de oligonucleótidos inmovilizadas en gránulos. En una realización, los amplicones marcados se cargan en soportes sólidos después de la hibridación y la extensión de los oligonucleótidos sonda hemi-anidados inmovilizados en gránulos.

En una realización, el par de cebadores está diseñado para amplificar una región de ácido nucleico de Influenza A. Por ejemplo, el par de cebadores puede diseñarse para amplificar una región del gen que codifica el Segmento 7 de la proteína de matriz de Influenza A. En una realización, el par de cebadores comprende

5'AmMC6/CGAGGTGCGAAACGTAYGTTCTYTCTAT (SEQ ID N°: 1; cebador directo; F) y GCCATTCCATGAGAGCCTCRAGATC (SEQ ID N°: 17; cebador inverso; R).

5 En una realización, el par de cebadores está diseñado para amplificar una región de ácido nucleico de Influenza B. Por ejemplo, el par de cebadores puede diseñarse para amplificar una región del gen que codifica el Segmento 4 de hemaglutinina de Influenza B. En una realización, el par de cebadores comprende 5'AmMC6/TACGGTGGATTAACAAAAGCAAGCC (SEQ ID NO: 2; cebador directo; F) y CAGGAGGTCTATATTTGGTTCCATTGGC (SEQ ID NO: 18; cebador inverso; R).

10 En una realización, el par de cebadores está diseñado para amplificar una región de ácido nucleico de la cepa pandémica H1N1 2009 de Influenza A. Por ejemplo, el par de cebadores puede diseñarse para amplificar una región del gen que codifica el Segmento 4 de la cepa pandémica H1N1 2009 de Influenza A. En una realización, el par de cebadores comprende 5'AmMC6/CCCAAGACAAGTTCATGGCCCAATCA (SEQ ID NO: 3; cebador directo; F) y GCTTTTTGCTCCAGCATGAGGACAT (SEQ ID NO: 19; cebador inverso; R).

15 En una realización, el par de cebadores está diseñado para amplificar una región de ácido nucleico de la cepa pandémica H5N1 de Influenza A. Por ejemplo, el par de cebadores puede diseñarse para amplificar una región del gen que codifica el Segmento 4 de la cepa pandémica H5N1 de Influenza A. En una realización, el par de cebadores comprende 5'AmMC6/GCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCC (SEQ ID NO: 4; cebador directo; F) e YCTTCTCCACTATGTAAGACCATTCCGG (SEQ ID NO: 20; cebador inverso; R).

20 En una realización, el par de cebadores está diseñado para amplificar una región de ácido nucleico del Virus Sincitial Respiratorio (tipos A y B). Por ejemplo, el par de cebadores puede diseñarse para amplificar una región del gen de la polimerasa del Virus Sincitial Respiratorio (tipos A y B). En una realización, el par de cebadores comprende 5'AmMC6/ACAGTCAGTAGACCATGTGAATTC (SEQ ID NO: 5; cebador directo; F) y RTCRATATCTTCATCACCATCATTTTCTGTGA (SEQ ID NO: 21; cebador inverso; R).

25 En una realización, el par de cebadores está diseñado para amplificar una región de ácido nucleico del Virus de la Parainfluenza Humana 1. Por ejemplo, el par de cebadores puede diseñarse para amplificar una región del gen que codifica la glucoproteína hemaglutinina-neuraminidasa del Virus de la Parainfluenza Humana 1. En una realización, el par de cebadores comprende 5'AmMC6/TGGTGATGCAATATATGCGTATTCATC (SEQ ID NO: 6; cebador directo; F) y CCGGGTTAAATCAGGATACATATCTG (SEQ ID NO: 22; cebador inverso; R).

30 En una realización, el par de cebadores está diseñado para amplificar una región de ácido nucleico del Virus de la parainfluenza humano 2. Por ejemplo, el par de cebadores puede diseñarse para amplificar una región del gen que codifica la glucoproteína hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la Parainfluenza 2 humano. En una realización, el par de cebadores comprende 5'AmMC6/CYCGTCCTGGAGTCATGCCATGCAA (SEQ ID NO: 7; cebador directo; F) y CRTTAAGCGGCCACACATCTGCGT (SEQ ID NO: 23; cebador inverso; R).

35 En una realización, el par de cebadores está diseñado para amplificar una región de ácido nucleico del Virus de la Parainfluenza Humana 3. Por ejemplo, el par de cebadores puede diseñarse para amplificar una región del gen que codifica la glucoproteína hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la parainfluenza humano 3. En una realización, el par de cebadores comprende 5'AmMC6/CAAGTTGGCAYAGCAAGTTACAATTAGGA (SEQ ID NO: 8; cebador directo; F) y GTCCCATGGACATTCATTGTTTCTGGT (SEQ ID NO: 24; cebador inverso; R).

40 En una realización, el par de cebadores está diseñado para amplificar una región de ácido nucleico del Virus de la parainfluenza humano 4. Por ejemplo, el par de cebadores puede diseñarse para amplificar una región del gen de la fosfoproteína del Virus de la parainfluenza humano 4. En una realización, el par de cebadores comprende 5'AmMC6/GTTGATCAAGACAATAATTACTTGA (SEQ ID NO: 9; cebador directo; F) y TAAGTGCATCTATACGAACRCCTGCTC (SEQ ID NO: 25; cebador inverso; R).

45 En una realización, el par de cebadores está diseñado para amplificar una región de ácido nucleico del Metapneumovirus Humano. Por ejemplo, el par de cebadores puede diseñarse para amplificar una región del gen que codifica la región M2 de la proteína matricial del Metapneumovirus Humano. En una realización, el par de cebadores comprende 5'AmMC6/GACAAATCATMATGTCTCGYAARGCTCC (SEQ ID NO: 10; cebador directo; F) y CTATCWGGCCAACTCCAGTAATTGTG (SEQ ID NO: 26; cebador inverso; R).

50 En una realización, el par de cebadores está diseñado para amplificar una región de ácido nucleico de Adenovirus Tipos B y/o E. Por ejemplo, el par de cebadores puede diseñarse para amplificar una región del gen que codifica la región Hexón de Adenovirus Tipos B y E. En una realización, el par de cebadores comprende TGCCSCARTGGKCDTACATGCACATC (SEQ ID NO: 11; cebador directo; F) y 5'AmMC6/GCRCGGGCRAACTGCACCAG (SEQ ID NO: 27; cebador inverso; R).

55 En una realización, el par de cebadores está diseñado para amplificar una región de ácido nucleico del Adenovirus Tipo C. Por ejemplo, el par de cebadores puede diseñarse para amplificar una región del gen que codifica la región Hexón de Adenovirus Tipos C. En una realización, el par de cebadores comprende 5'Phos/TGCCSCARTGGKCDTACATGCACATC (SEQ ID NO: 12; cebador directo; F) y 5'AmMC6/GCRCGGGCRAACTGCACCAG (SEQ ID NO: 28; cebador inverso; R).

En una realización, el par de cebadores está diseñado para amplificar una región del ácido nucleico de Rhinovirus/Enterovirus humanos. Por ejemplo, el par de cebadores puede diseñarse para amplificar la región 5'UTR del Rhinovirus/enterovirus humanos. En una realización, el par de cebadores comprende 5'AmMC6/GAAACACGGACACCCAAAGTAGT (SEQ ID NO: 13; cebador directo; F) y ACTCACTATAGGAGCCTGCGTGGCKGCC (SEQ ID NO: 29; cebador inverso; R).

En una realización, el par de cebadores está diseñado para amplificar una región de ácido nucleico de Bordetella pertussis. Por ejemplo, el par de cebadores puede diseñarse para amplificar una región del elemento de inserción (IS) 481 de Bordetella pertussis. En una realización, el par de cebadores comprende CCGGCCGGATGAACACCCATAAGCA (SEQ ID NO: 14; cebador directo; F) y 5'AmMC6/GGGCCGCTTCAGGCACACAACTTG (SEQ ID NO: 30; cebador inverso; R).

En una realización, el par de cebadores está diseñado para amplificar una región de ácido nucleico de Chlamidophila pneumoniae. Por ejemplo, el par de cebadores puede diseñarse para amplificar una región del gen que codifica la proteína de membrana externa principal de Chlamidophila pneumoniae. En una realización, el par de cebadores comprende CATGAATGGCAAGTAGGAGCCTCTC (SEQ ID NO: 15; cebador directo; F) y 5'AmMC6/AGTTTTGGCTGAGCAATGCGGATGT (SEQ ID NO: 31; cebador inverso; R).

En una realización, el par de cebadores está diseñado para amplificar una región de ácido nucleico de Mycoplasma pneumoniae. Por ejemplo, el par de cebadores puede diseñarse para amplificar una región del gen que codifica P1 Citadhesina de Mycoplasma pneumoniae". En una realización, el par de cebadores comprende GAACCGAAGCGGCTTTGACCGCATC (SEQ ID NO: 16; cebador directo; F) y 5'AmMC6/GCGTGGGCGTTTGCGGGTTAACTT (SEQ ID NO: 32; cebador inverso; R).

La presente descripción es instructiva para la amplificación de secuencias control. En una realización, la secuencia control puede incluir una región del genoma del sujeto del que se deriva una muestra biológica. Sin embargo, el método descrito en este documento no está de ninguna manera limitado a estas secuencias control particulares y también se contemplan otras secuencias control que serían evidentes para los expertos en la técnica, incluyendo construcciones de ácido nucleico creadas artificialmente que comprenden secuencias derivadas del genoma de un patógeno respiratorio. Además, los métodos descritos en este documento también pueden realizarse sin la amplificación de una secuencia control. Cuando se realiza la amplificación de una secuencia control, el amplicón que se genera también se denomina en este documento "amplicón de control".

En una realización, el par de cebadores está diseñado para amplificar una región del gen MYL3. Por ejemplo, el par de cebadores puede comprender GCACCCAGACAATACACACAGGTGT (SEQ ID NO: 33; cebador directo; F) y 5'AmMC6/GGCGGAAGTCAGCATGTGTCTG (SEQ ID NO: 34; cebador inverso; R).

En una realización, la secuencia control incluye una secuencia de gen para determinar que el ARN intacto se ha aislado con éxito a partir de una muestra. Por ejemplo, el par de cebadores puede diseñarse para amplificar una región del gen Matriz MS-2. En una realización, el par de cebadores comprende GCACGCTCCTGCTACAGCCTCTTCC (SEQ ID NO: 35; cebador directo; F) y 5'AmMC6/CTTTTGCAGGACTTCGGTCGACGCC (SEQ ID NO: 36; cebador inverso; R).

Otros pares de cebadores y sondas son los enumerados en la Tabla 8 (SEQ ID NOs: 74 a 126).

El ADN aislado puede amplificarse usando cualquier protocolo de amplificación de ADN conocido por los expertos en la técnica. Una gama de métodos ejemplares para la amplificación de ADN que de ninguna manera limitan el método descrito en este documento se presentan en "ADN Amplificación: Current Technologies and Applications" (Demidov y Broude Eds. (2004) Horizon Bioscience). El ARN aislado puede amplificarse usando cualquier método de ARN conocido en la técnica y se han desarrollado numerosas tecnologías de amplificación de ARN. Dos categorías principales de estos son: (i) las que utilizan ciclos térmicos tales como RT-PCR y (ii) los ensayos isotérmicos tales como la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA) (Compton (1991) Nature 350: 91-92; Kievits et al. (1991) J Virol. Methods 55: 273-286) y amplificación mediada por la transcripción (TMA) [Hill (1996) J. Clin. Ligand Assay 7P:43-51]. Los ensayos isotérmicos se pueden subdividir, según si: (i) copian y amplifican la secuencia diana, tales como TMA, NASBA y replicación de secuencia autosostenida (3SR) [Guatelli et al. (1990) Proc. Natl Acad. Sci USA 57: 1874-1878; Chadwick et al. (1998) J. Virol. Methods 70: 59-70; para una revisión, véase Chan y Fox (1999) Rev. Med. Microbiol. 70: 185-196]; o (ii) generan una señal dependiente de la diana que puede amplificarse adicionalmente, p. ej. ensayos invasivos (Lyamichev et al. (1999) Nat. Biotechnol. 77:292-296; Ryan et al. (1999) Mol. Diagn. 4: 135- 144). Sin embargo, debe entenderse que el método descrito en este documento también contempla cualquier método de amplificación de ARN que sería evidente para los expertos en la técnica. Además, debe entenderse que el método descrito en este documento también contempla el uso de transcriptasa inversa o un equivalente funcional del mismo para convertir el ARN en ADN, que luego puede amplificarse posteriormente.

En el método enseñado en este documento, al menos un miembro del par de cebadores comprende un marcador detectable, denominado en la presente memoria "primer marcador detectable" o "primer marcador detectable ópticamente", que incluye, pero no se limita a, una molécula, átomo o ion que emite fluorescencia, fosforescencia y/o

incandescencia.

En una realización, el primer marcador detectable ópticamente es un "marcador fluorescente" o "fluoróforo". Muchos marcadores fluorescentes diferentes serán familiares para los expertos en la materia, y la elección del marcador fluorescente de ninguna manera limita el método descrito en este documento. Marcadores fluorescentes ejemplares comprenden cualquier marcador fluorescente que se pueda excitar usando una fuente de luz seleccionada del grupo siguiente:

- 5 (i) Láseres de ion argón: comprenden una línea azul, 488, que es adecuada para la excitación de muchos colorantes y fluorocromos que emiten fluorescencia en la región verde a roja. También están disponibles los láseres de argón sintonizables que emiten en un rango de longitudes de onda (458 nm, 488 nm, 496 nm, 515 nm y otros);
- 10 (ii) Láseres de diodo: tienen una longitud de onda de emisión de 635 nm. Otros láseres de diodos que ahora están disponibles funcionan a 532 nm. Curiosamente, esta longitud de onda excita el yoduro de propidio (PI) de manera óptima. La tinción de PI es ampliamente utilizada para los análisis de ADN, recuento en vivo/muerto y determinación de ploidía. Los láseres de diodo azul que emiten luz alrededor de 476 nm también están disponibles;
- (iii) Láseres de gas HeNe: funcionan con la línea roja de 633 nm;
- 15 (iv) láseres HeCd: operan a 325 nm;
- (v) Lámpara de arco de mercurio de 100 W: la fuente de luz más eficiente para la excitación de colorantes UV como Hoechst y DAPI.

Ejemplos de fluoróforos (también denominados en este documento fluorocromos) incluyen, pero no se limitan a, hidroxycoumarina, aminocoumarina, metoxicoumarina, azul cascada, amarillo Lucifer, NBD, ficoeritrina (PE), PerCP, alofococianina, hoechst 33342, DAPI, azul SYTOX, hoechst 33258, cromomicina A3, mitramicina, YOYO-I, SYTOX verde, SYTOX naranja, 7-AAD, naranja de acridina, TOTO-I, To-PRO-I, naranja de tiazol, TOTO-3, TO-PRO-3, LDS 751, Colorantes Alexa Fluor que incluyen Alexa Fluor-350, -430, -488, -532, -546, -555, -556, -594, -633, -647, -660, -680, -700 y -750; Colorantes BoDipy, incluidos BoDipy 630/650 y BoDipy 650/665; Colorantes CY, particularmente Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy 5.5 y Cy7; 6-FAM (fluoresceína); PE-Cy5, PE-Cy7, fluoresceína dT; Hexaclorofluoresceína (Hex); 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',T-dimetoxifluoresceína (JOE); Tintes verdes de Oregón, incluidos 488-X y 514; Colorantes de rodamina, que incluyen X-Rodamina, Lisamina Rodamina B, Rodamina verde, Rodamina Rojo y ROX; TRITC, tetrametilrodamina (TMR); Carboxitetrametilrodamina (TAMRA); Tetraclorofluoresceína (TET); Rojo 6B, FluorX, BODIPY-FL y Texas Rojo. En algunas realizaciones, el primer marcador detectable es AlexaFluor-647.

En una realización, al menos un miembro de un primer par de cebadores está marcado con un marcador detectable y al menos un miembro de un segundo par de cebadores está marcado con un marcador detectable diferente para permitir la diferenciación entre amplicones dentro de un conjunto de múltiples amplicones.

Al menos un miembro de un par de cebadores puede marcarse usando cualquier medio conveniente conocido por los expertos en la técnica. Los métodos ejemplares incluyen tanto métodos previos como posteriores a la síntesis. Los métodos de marcaje previos a la síntesis incluyen el marcaje de un cebador de PCR que se usa posteriormente para la amplificación de, y por lo tanto incorporado en, un amplicón por PCR. En este método, el marcador está típicamente unido al extremo 5' de un cebador adecuado para la amplificación del amplicón, aunque también se contempla el marcaje en otras posiciones dentro del cebador, tal como el marcaje 3' o el marcaje no terminal.

También se puede usar un enlazador químico entre el marcador y el cebador que está marcado. Los expertos en la técnica podrán determinar fácilmente secuencias de enlazador ejemplares, y es probable que incluyan enlazadores tales como modificadores de amino C6, C7 y C12 y enlazadores que comprenden grupos tiol. Como se verificará fácilmente, un cebador puede comprender el enlazador, y el marcador, o el enlazador solo, al cual el marcador puede unirse en una etapa posterior.

El método enseñado en este documento es útil para el cribado de una muestra para una multiplicidad de patógenos respiratorios debido a su capacidad de tener dos o más subconjuntos de gránulos, siendo los gránulos de cada subconjunto fisicoquímicamente distinguibles de los de otro subconjunto de la base del tamaño del gránulo y, opcionalmente, la intensidad de un marcador detectable inmovilizado en los gránulos. Por lo tanto, los gránulos dentro de cualquier subconjunto pueden tener un marcador común detectable ópticamente y/o un tamaño común. Los gránulos dentro de cualquier subconjunto también pueden tener una sonda de oligonucleótido común. Por lo tanto, se pueden detectar múltiples patógenos respiratorios usando una multiplicidad de subconjuntos de gránulos, a los que se hace referencia en este documento como conjuntos de gránulos.

En una realización, los gránulos comprenden una "micropartícula". Como será evidente para los expertos en la técnica, casi cualquier material, homogéneo o de otro modo, se puede usar para la micropartícula. Las micropartículas contempladas en este documento también pueden comprender más de una sustancia, y como tales pueden comprender cubiertas, aleaciones o mezclas de sustancias orgánicas y/o inorgánicas. Los materiales útiles que se pueden usar incluyen materiales seleccionados del grupo que consiste en sílice (por ejemplo: cuarzo o vidrio), látex, titanio, dióxido de estaño, itria, alúmina y otros óxidos metálicos binarios (tales como ZnO), perovskitas

y otros óxidos metálicos piezoeléctricos (tales como BaTiO₃), ZnS, sacarosa, agarosa y otros gránulos poliméricos. En algunas realizaciones, la micropartícula comprende sílice.

5 La expresión "fisiológicamente distinguible", como se usa en el presente documento, se refiere a una diferencia medible en cualquiera de los tamaños de gránulos, la presencia o ausencia de un marcador detectable particular y/o la intensidad de un marcador detectable.

10 Los gránulos contemplados para su uso en el método descrito en este documento pueden producirse en cualquier forma tridimensional regular o irregular conveniente. Sin embargo, en general es práctico sintetizar pequeñas esferas o partículas esféricas. Tales esferas o partículas esféricas también se denominan en este documento "gránulos". Por consiguiente, en una realización relacionada, las "micropartículas" son sustancialmente esféricas o esféricas o comprenden una "microesfera".

Aunque los gránulos pueden denominarse "microesferas", el tamaño real de los gránulos depende de una variedad de factores y los gránulos pueden comprender o no realmente medidas en el intervalo de micrómetros. Por ejemplo, el gránulo comprende un diámetro (o medida equivalente en una partícula no esférica) de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 30 µm, incluyendo 300 nm, 350 nm, 400 nm, 450 nm, 500 nm, 550 nm, 600 nm, 650 nm, 700 nm, 750 nm, 800 nm, 850 nm, 900 nm, 950 nm, 1,0 µm, 1,1 µm, 1,2 µm, 1,3 µm, 1,4 µm, 1,5 µm, 1,6 µm, 1,7 µm, 1,8 µm, 1,9 µm, 2,0 µm, 2,1 µm, 2,2 µm, 2,3 µm, 2,4 µm, 2,5 µm, 2,6 µm, 2,7 µm, 2,8 µm, 2,9 µm, 3,0 µm, 3,1 µm, 3,2 µm, 3,3 µm, 3,4 µm, 3,5 µm, 3,6 µm, 3,7 µm, 3,8 µm, 3,9 µm, 4,0 µm, 4,1 µm, 4,2 µm, 4,3 µm, 4,4 µm, 4,5 µm, 4,6 µm, 4,7 µm, 4,8 µm, 4,9 µm, 5,0 µm, 5,1 µm, 5,2 µm, 5,3 µm, 5,4 µm, 5,5 µm, 5,6 µm, 5,7 µm, 5,8 µm, 5,9 µm, 6,0 µm, 6,1 µm, 6,2 µm, 6,3 µm, 6,4 µm, 6,5 µm, 6,6 µm, 6,7 µm, 6,8 µm, 6,9 µm, 7,0 µm, 7,1 µm, 7,2 µm, 7,3 µm, 7,4 µm, 7,5 µm, 7,6 µm, 7,7 µm, 7,8 µm, 7,9 µm, 8,0 µm, 8,1 µm, 8,2 µm, 8,3 µm, 8,4 µm, 8,5 µm, 8,6 µm, 8,7 µm, 8,8 µm, 8,9 µm, 9,0 µm, 9,1 µm, 9,2 µm, 9,3 µm, 9,4 µm, 9,5 µm, 9,6 µm, 9,7 µm, 9,8 µm, 9,9 µm, 10 µm, 11 µm, 12 µm, 13 µm, 14 µm, 15 µm, 16 µm, 17 µm, 18 µm, 19 µm, 20 µm, 21 µm, 22 µm, 23 µm, 24 µm, 25 µm, 26 µm, 27 µm, 28 µm, 29 µm y 30 µm. En algunas realizaciones, el gránulo comprende un diámetro (o una medida equivalente en una partícula no esférica) de entre 3 µm y 6 µm.

25 En una realización, los gránulos son gránulos AmpaSand producidas por Genera Biosystems, Victoria, Australia. Sin embargo, el método descrito en este documento no se debe considerar de ninguna manera limitado al uso de estos gránulos específicamente.

30 Los gránulos pueden distinguirse sobre la base de la presencia o ausencia de un marcador detectable, denominado en la presente memoria "segundo marcador detectable" o "segundo marcador detectable ópticamente" e incluye, pero no se limita a, cualquier molécula, átomo o ion que emita fluorescencia, fosforescencia y/o incandescencia. Los marcadores convenientes ópticamente detectables incluyen aquellos que emiten en los intervalos ultravioleta (intervalo de longitud de onda de aproximadamente 350 nm a aproximadamente 3 nm), visible (intervalo de longitud de onda de aproximadamente 350 nm a aproximadamente 800 nm, infrarrojo cercano (NI) (intervalo de longitud de onda de aproximadamente 800 nm a aproximadamente 1500 nm) y/o infrarrojo (IR) (intervalo de longitud de onda de aproximadamente 1500 nm a aproximadamente 10 µm). Sin embargo, debido a la facilidad de detección, en algunas realizaciones, el marcador ópticamente detectable es detectable en el rango de longitud de onda visible.

35 El marcador ópticamente detectable puede comprender uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en un fluoróforo, una partícula semiconductor, partículas de fósforo, una partícula dopada y un nanocrystal o punto cuántico. En una realización relacionada, el segundo marcador ópticamente detectable es un fluoróforo.

40 Hay muchos colorantes fluorescentes disponibles en la técnica que se pueden usar como fluoróforos de acuerdo con el método descrito en este documento. Una propiedad importante de un colorante fluorescente u otro fluoróforo que determina su potencial de uso es la longitud de onda de excitación del fluoróforo, que típicamente coincide con la(s) longitud(es) de onda disponible(s) de la fuente de luz. Sin embargo, muchos colorantes fluorescentes diferentes y otros fluoróforos serán familiares para los expertos en la técnica, y la elección del marcador fluorescente de ninguna manera limita el método descrito en este documento. Los colorantes fluorescentes particularmente convenientes que se pueden usar para el marcaje de un sustrato incluyen los discutidos supra con respecto al marcaje del amplicón de PCR. Sin embargo, cuando se elige un marcador fluorescente, los espectros de emisión del marcador fluorescente inmovilizado en la perla (segundo marcador detectable) deben ser distintos del espectro de emisión del marcador detectable utilizado para al menos un miembro del par de cebadores (primer marcador detectable).

50 Los métodos de marcado fluorescente de microesferas y gránulos son familiares para los expertos en la técnica, que incluyen tinte interno y tinte externo (marcaje de superficie). Las dos técnicas producen gránulos con propiedades únicas, cada una beneficiosa para diferentes aplicaciones. El tinte interno produce partículas extremadamente estables con emisiones de fluorescencia típicamente estrechas. Estos gránulos a menudo muestran una mayor resistencia al fotoblanqueo. Como el fluoróforo está dentro de los gránulos, los grupos de superficie están disponibles para conjugarse ligandos (proteínas, anticuerpos, ácidos nucleicos, etc.) a la superficie de la perla. Por esta razón, los gránulos marcados internamente se usan típicamente en aplicaciones de detección de analitos e inmunoensayo. El marcaje de superficie implica la conjugación del fluoróforo con la superficie del gránulo. Debido a que los fluoróforos están en la superficie del gránulo, son capaces de interactuar con su entorno al igual que los fluoróforos en una célula teñida. El resultado es un estándar de gránulos que exhibe las mismas propiedades

de excitación y emisión que las muestras de las células teñidas, en una variedad de condiciones diferentes, tales como la presencia de contaminantes o cambios en el pH. La naturaleza "sensible al medio ambiente" de los gránulos marcados en la superficie las hace idealmente adecuadas para imitar muestras biológicas. Los gránulos marcados externamente se usan con frecuencia como controles y estándares en una serie de aplicaciones que utilizan la detección por fluorescencia. Sin embargo, el método descrito en este documento contempla la asociación de un gránulo con un marcador fluorescente por cualquier medio.

El segundo marcador ópticamente detectable también puede incorporarse en la sonda del oligonucleótido inmovilizado, en lugar de ser un marcador directamente asociado con el gránulo per se. Por ejemplo, los gránulos comprenden un "marcador" inmovilizado o una sonda de oligonucleótido. El marcador puede llevar una amina interna (NH_2) que luego se modifica por conjugación con un succinimidil-éster de un colorante. En algunas realizaciones, el segundo marcador detectable es BoDipy-TMR.

Al mezclar sondas o marcadores de oligonucleótidos marcados y no marcados y luego conjugar esta mezcla con los gránulos, se pueden producir clases de gránulos con diferentes niveles del marcador fluorescente y, por lo tanto, una segunda intensidad detectable de marcador.

El segundo marcador detectable se puede aplicar a un gránulo en un intervalo de concentraciones o intensidades, proporcionando de ese modo otra base sobre la cual los gránulos particulares pueden ser "fisiológicamente distinguibles". Por ejemplo, si se considera que la intensidad máxima detectable de la señal de un elemento ópticamente detectable particular es del 100%, el marcador se puede aplicar a un intervalo de gránulos para obtener intensidades del 0%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%.

En algunas realizaciones, el conjunto de gránulos comprende 6 subconjuntos de gránulos de 3,0 μm , 3,5 μm , 3,8 μm , 5,0 μm , 5,2 μm y 5,7 μm de diámetro (o una medida equivalente en una partícula no esférica) y en el que cada uno de los 6 subconjuntos de los gránulos comprenden otros 3 subconjuntos (subconjuntos secundarios) que comprenden 1) gránulos conjugados con la sonda oligonucleotídica no marcada (TO:FLO = 0; sin TMR), 2) gránulos conjugados en una relación mixta 1:50-200 de sonda de oligonucleótido marcada:no marcada (TO:FLO = 50-200; Medium TMR), respectivamente, y 3) gránulos conjugados en una proporción mixta 1:1,5-2 de la sonda de oligonucleótido marcada:no marcada (TO:FLO = 1,5-2; TMR alta), respectivamente.

La referencia a una sonda de oligonucleótidos que está "inmovilizada" en el gránulo es la referencia a un oligonucleótido unido o asociado de otro modo con el gránulo. Una sonda de oligonucleótidos puede unirse o asociarse de otro modo con el gránulo por cualquier medio conveniente conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la sonda de oligonucleótidos se puede encapsular en gránulos durante su producción o se puede unir a su superficie después de la producción. El método utilizado para asociar la sonda de oligonucleótidos con el gránulo dependerá del material utilizado, tal como lo verificaría fácilmente el destinatario experto. Además, se pueden realizar tratamientos adicionales, que incluyen silanización (recubrimiento del sustrato con silanos), sobre los gránulos antes de la unión de la sonda de oligonucleótidos con el fin de aumentar la unión de la sonda al gránulo.

Los gránulos pueden recubrirse con cualquier compuesto que se una covalentemente, o se adsorba de otro modo, a la superficie del gránulo, y además la sonda de oligonucleótido también podría tener un resto químico para la unión de una sonda de oligonucleótido, tal como un grupo tiol, amina o carboxilo. Los ejemplos de compuestos con estas características incluyen silanos terminados en amino tales como amino-propiltrimetoxisilano o amino-propiltriethoxisilano. Además de los silanos, los compuestos tales como poli-L-lisina que se unen de forma no covalente a la superficie del vidrio y adsorben electrostáticamente los grupos fosfato del polinucleótido también están dentro del alcance del método descrito en este documento. Por lo tanto, otros compuestos, incluyendo otros silanos adecuados para la unión de una sonda de oligonucleótidos a una superficie del gránulo, serían identificados fácilmente por la persona experta y el método descrito en este documento no está limitado por la elección del compuesto.

Por ejemplo, la sonda de oligonucleótidos se puede unir al gránulo mediante adsorción física o enlace químico. Además, los gránulos pueden recubrirse adicionalmente con un agente que promueva o aumente la adsorción o la unión de la sonda de oligonucleótido a la superficie de la perla, tal como amino-silanos. Sin embargo, los expertos en la técnica identificarán fácilmente otros agentes que realicen esta función.

Por ejemplo, la sonda de oligonucleótidos se puede unir a la perla a través del Sistema de Anclaje Universal (UAS) de Genera Biosystems, Victoria, Australia. Brevemente, este sistema implica el uso de una molécula de ácido nucleico "puente" para ligar una secuencia "marcadora" de ácido nucleico sobre el sustrato con una secuencia diana. La secuencia "puente" es parcialmente complementaria a la secuencia marcadora y parcialmente complementaria a la secuencia diana, de modo que la secuencia puente se pueda unir tanto a la secuencia marcadora como a la diana y mantenerlas alineadas de modo que las secuencias marcadora y diana se puedan ligar usando una ligasa. El UAS también está disponible comercialmente. Sin embargo, el método descrito en este documento no se debe considerar de ninguna manera limitado a este método particular de unir una molécula de ácido nucleico a un sustrato.

La determinación de si se ha producido la unión entre un amplicón y una sonda de oligonucleótidos puede realizarse

usando cualquier metodología conocida por los expertos en la técnica que permita la localización de un amplicón marcado unido a una sonda de oligonucleótido inmovilizada en un gránulo fisicoquímicamente distinguible. En una realización, se usa citometría de flujo. El método descrito en la presente memoria, sin embargo, no está limitado de ningún modo al método o aparato de citometría de flujo particular.

- 5 Usando la citometría de flujo, el tamaño de un gránulo dado puede ser determinado por la dispersión de la luz del objeto. Por ejemplo, la citometría de flujo se puede usar para distinguir entre gránulos de aproximadamente 3,0 μm , 3,5 μm , 3,8 μm , 5,0 μm , 5,2 μm y 5,7 μm de diámetro (o una medición equivalente en una partícula no esférica).

Además de la detección del tamaño, los citómetros de flujo típicamente tienen uno o más láseres y detectores para la detección de fluorescencia. Hay muchos fluoróforos que son útiles para la citometría de flujo, como se describe en este documento. Una propiedad clave de un fluoróforo que determina su potencial para el uso en un ensayo de citometría de flujo es la longitud de onda de excitación; es decir, debe coincidir con las longitudes de onda disponibles de la fuente de luz. Los citómetros de flujo también se pueden usar para distinguir entre subconjuntos de gránulos en función de la intensidad de la fluorescencia; a saber, la intensidad del segundo marcador detectable. Por ejemplo, los presentes inventores han determinado que la citometría de flujo es capaz de distinguir entre gránulos marcados con niveles de un segundo marcador ópticamente detectable equivalente a Sin TMR, Medio TMR y Alto TMR.

En otro aspecto, se proporciona un conjunto de perlas para el cribado de una muestra para una multiplicidad de patógenos respiratorios para detectar un patógeno particular, en el que el conjunto de perlas comprende una pluralidad de subconjuntos de gránulos en donde:

- 20 (a) los gránulos de cada subconjunto son homogéneos con respecto al tamaño;
- (b) los gránulos dentro de cada subconjunto están acoplados a una sonda de oligonucleótido de ácido nucleico que es capaz de unirse a una región específica del analito del genoma de un patógeno respiratorio; y
- (c) opcionalmente, el conjunto de gránulos comprende un subconjunto de gránulos marcados con un marcador detectable con cada subconjunto de gránulos que tienen una intensidad de marcador detectable diferente para crear una mezcla heterogénea de gránulos basada en la intensidad del marcador detectable;

25 en el que la identidad del gránulo del subconjunto y, por lo tanto, el tipo y/o la cepa del patógeno respiratorio es identificable sobre la base del tamaño del gránulo y/o la intensidad del marcador detectable.

El conjunto de gránulos puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más subconjuntos de gránulos, comprendiendo cada subconjunto una sonda de oligonucleótidos que es complementaria a una región del amplicón generado después de la amplificación con el par o los pares de cebadores. En una realización, la sonda de oligonucleótidos comprende un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 37 a 54. La referencia a estas sondas oligonucleotídicas específicas de secuencia incluye moléculas de ácido nucleico que tienen al menos un 90% de identidad con estas secuencias o que pueden hibridarse con ellas o sus formas complementarias en condiciones de baja rigurosidad. La referencia a al menos 90% incluye 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y 100%.

El número de subconjuntos de gránulos en un conjunto de gránulos corresponderá típicamente con el número de analitos (es decir, tipos y/o cepas de patógenos respiratorios) a cribar. El conjunto de gránulos también puede incluir uno o más subconjuntos adicionales para la detección de una secuencia control, como se describe en este documento.

40 La expresión "sonda de oligonucleótidos" se usa en el presente documento para denotar un polinucleótido inmovilizado en un gránulo (es decir, unido o asociado de otro modo con el gránulo). Cada sonda de oligonucleótido comprende un polinucleótido que comprende una secuencia que es complementaria a una región de un amplicón generado de acuerdo con los métodos descritos en este documento. Una sonda de oligonucleótidos también puede comprender una secuencia que sea complementaria a una secuencia control, como se describe en este documento.

45 Por consiguiente, un conjunto de gránulos de sondas de oligonucleótidos puede comprender:

$[B_1\text{-}CX_1, B_2\text{-}CX_2, B_3\text{-}CX_3, B_n\text{-}CX_n, B_y\text{-}CY, B_z\text{-}CZ]$

En donde:

B_1, B_n, B_y, B_z son cada uno de los gránulos fisicoquímicamente distinguibles;

50 CX_n es un polinucleótido inmovilizado en un gránulo en el que dicho polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia particular de ácido nucleico que es específica para un tipo y/o cepa particular de un patógeno respiratorio (es decir, una secuencia específica de tipo y/o cepa);

n es el número de patógenos respiratorios o cepas particulares de un sujeto patógeno que se detectarán utilizando el conjunto de gránulos;

cY es un miembro opcional del conjunto de gránulos y es un polinucleótido inmovilizado en un gránulo en el que dicho polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia que se conserva entre los patógenos o cepas de un patógeno;

- 5 cZ es un miembro opcional del conjunto de gránulos y es un polinucleótido inmovilizado en un gránulo en el que dicho polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia control que se amplifica a partir de un sujeto multicelular. En algunas realizaciones, la secuencia control es una secuencia de ADN genómico humano. En algunas realizaciones, la secuencia control se deriva del gen MYL3 humano.

10 La sonda de oligonucleótidos puede unirse o asociarse de otro modo con los gránulos durante su producción o puede unirse a su superficie después de la producción. El método de elección utilizado para asociar el polinucleótido con el gránulo dependerá del material utilizado, tal como determinaría fácilmente el experto en la técnica. Además, se pueden realizar tratamientos adicionales, que incluyen la silanización (revestimiento del sustrato con silanos), sobre los gránulos antes de la unión del polinucleótido con el fin de aumentar la unión de dicho polinucleótido al gránulo.

15 Como se usa en el presente documento, la frase "unido a, o asociado de otra manera con" se refiere a cualquier proceso mediante el cual una molécula puede asociarse con un gránulo. Los modos ejemplares por los que tales asociaciones pueden ser mediadas incluyen, pero no están limitados a: unión covalente, enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, enlaces iónicos, enlaces metálicos, enlaces polares y enlaces dativos (covalentes) y similares.

20 Una molécula que incluye una sonda oligonucleotídica también se puede unir a una partícula microesferoidal a través de un agente que promueva o aumente la adsorción o unión de la sonda oligonucleotídica a la superficie del gránulo, tal agente se denomina en este documento "enlazador". Por ejemplo, los polinucleótidos pueden estar asociados con una partícula microesferoidal a través de un enlazador que comprende un grupo tiol, amina o carboxilo. Los ejemplos de enlazadores adecuados incluyen silanos terminados en amino tales como amino-propiltrimetoxisilano o amino-propiltriethoxisilano. Además de los silanos, también se contemplan compuestos tales como poli-L-lisina que se adhieren no covalentemente a superficies tales como el vidrio y adsorben electrostáticamente los grupos fosfato de un polinucleótido. Por lo tanto, el experto en la materia identificará fácilmente otras moléculas, que incluyen otros silanos, que son adecuadas para promover la unión o asociación de una sonda de oligonucleótidos a la superficie de un gránulo, y el método descrito en este documento no está limitado por la elección del enlazador.

30 Por "complementario" debe entenderse que la sonda de oligonucleótidos debe hibridarse con un amplicón generado de acuerdo con los métodos descritos en este documento en condiciones de baja rigurosidad. Preferiblemente, la sonda oligonucleotídica inmovilizada debería hibridarse con el amplicón en condiciones de rigurosidad media, y lo más preferiblemente la sonda oligonucleotídica inmovilizada debería hibridarse con el amplicón en condiciones de alta rigurosidad.

35 En una realización, donde el par de cebadores es SEQ ID NOs: 1 y 17, la sonda de oligonucleótidos complementaria es 5'ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCAGTCTCTGCGCGATCTCGGCTTTGAG (SEQ ID NO: 37).

En una realización, donde el par de cebadores es SEQ ID NOs: 2 y 18, la sonda de oligonucleótidos complementaria es 5'ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCGGTGTTCACCCATATTGGGCAATT (SEQ ID NO: 38).

40 En una realización, donde el par de cebadores es SEQ ID NOs: 3 y 19, la sonda de oligonucleótidos complementaria es 5'ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCCATGCTGCCGTTACACCTTTGTTTCG (SEQ ID NO: 39).

En una realización, donde el par de cebadores es SEQ ID NOs: 4 y 20, la sonda de oligonucleótidos complementaria es 5'ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCCGAGGAGCCAT CCAGCTACACTAC (SEQ ID NO: 40).

En una realización, donde el par de cebadores es SEQ ID NOs: 5 y 21, la sonda de oligonucleótidos complementaria es 5'ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCGTTCTATAAGCTGGTATTGATGCAGG (SEQ ID NO: 41).

45 En una realización, donde el par de cebadores es SEQ ID NOs: 6 y 22, la sonda oligonucleotídica complementaria es 5'ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCCTATATCTGCACATCCTTGAGTGATT (SEQ ID NO: 42).

En una realización, donde el par de cebadores es SEQ ID NOs: 7 y 23, la sonda oligonucleotídica complementaria es 5'ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCACCCCTGTGATGCAATTAGCAGGGCA (SEQ ID NO: 43).

50 En una realización, donde el par de cebadores es SEQ ID NOs: 8 y 24, la sonda de oligonucleótidos complementaria es 5'ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCAGCACATTATGCCATGTCCATTTTATCC (SEQ ID NO: 44).

En una realización, donde el par de cebadores es SEQ ID NOs: 9 y 25, la sonda oligonucleotídica complementaria es 5'ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCGTTCCAGAYAATGGTCTTGCTA (SEQ ID NO: 45).

En una realización, donde el par de cebadores es SEQ ID NOs: 10 y 26, la sonda de oligonucleótidos complementarios es 5'ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCTTGCCCCGYACTTCATATTTGCA (SEQ ID

NO: 46).

En una realización, donde el par de cebadores es SEQ ID NOs: 11 y 27, la sonda de oligonucleótidos complementaria es 5'ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCGCTTCGGAGTACCTGAGTCCGGGT (SEQ ID NO: 47).

- 5 En una realización, donde el par de cebadores es SEQ ID NOs: 12 y 28, la sonda de oligonucleótidos complementaria es 5'ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCTCGGGCCAGGACGCCTCGGAGTAC (SEQ ID NO: 48).

10 En una realización, donde el par de cebadores es SEQ ID NOs: 13 y 29, la sonda de oligonucleótidos complementaria es 5'ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCTCCTCCGGCCCCTGAATGYGGCTAA (SEQ ID NO: 49).

En una realización, donde el par de cebadores es SEQ ID NOs: 14 y 30, la sonda de oligonucleótidos complementaria es 5'ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCTGCCGATTGACCTJCCTACGTCTGA (SEQ ID NO: 50).

- 15 En una realización, donde el par de cebadores es SEQ ID NOs: 15 y 31, la sonda de oligonucleótidos complementaria es 5'ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCTGGTCTCGAGCAACTTTTGATGCTG (SEQ ID NO: 51).

En una realización, donde el par de cebadores es SEQ ID NOs: 16 y 32, la sonda de oligonucleótidos complementaria es 5'ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCGGGCGCGCCTTATACGACCTCGATT (SEQ ID NO: 52).

- 20 En una realización, donde el par de cebadores es SEQ ID NOs: 33 y 34, la sonda oligonucleotídica complementaria es 5'Acryd/AAT/iAmMC6T/AAAGGGAGGACAGCTATGGACCAAACACAGACACAGAGAGACCCACAGACA (SEQ ID NO: 53).

En una realización, donde el par de cebadores es SEQ ID NOs: 35 y 36, la sonda oligonucleotídica complementaria es 5'ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCGAAGTGCCGCAGAACGTTGCGAACC (SEQ ID NO: 54).

- 25 En una realización, los pares de cebadores y las sondas correspondientes se seleccionan de los enumerados en la Tabla 8 (SEQ ID NOs: 74 a 126). En una realización, se seleccionan 2 o más pares de cebadores y las sondas correspondientes. Por "2 o más" se incluye de aproximadamente 2 a aproximadamente 18, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ó 18.

30 Los expertos en la técnica conocerán las condiciones de baja, media y alta rigurosidad. Por ejemplo, baja rigurosidad incluye desde al menos aproximadamente 0 hasta al menos aproximadamente 15% v/v de formamida (incluyendo formamida al 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13% y 14% v/v) y de al menos aproximadamente 1 M a al menos aproximadamente 2 M de sal para la hibridación, y de al menos aproximadamente 1 M a al menos aproximadamente 2 M de sal para las condiciones de lavado. La rigurosidad media puede incluir, por ejemplo, desde al menos aproximadamente 16% v/v hasta al menos aproximadamente 30% v/v de formamida, incluyendo 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 26%, 27%, 28%, 29% y 30% v/v de formamida, y de al menos aproximadamente 0,5 M a al menos aproximadamente 0,9 M de sal para la hibridación, y de al menos aproximadamente 0,5 M a al menos aproximadamente 0,9 M de la sal para las condiciones de lavado. La alta rigurosidad puede incluir, por ejemplo, desde al menos aproximadamente 31% v/v hasta al menos aproximadamente 50% v/v de formamida y desde al menos aproximadamente 0,01 M hasta al menos aproximadamente 0,15 M de la sal para la hibridación, y de al menos aproximadamente 0,01 M a al menos aproximadamente 0,15 M de la sal para las condiciones de lavado. La temperatura de las etapas de hibridación y lavado puede alterarse y se pueden usar temperaturas más altas para reemplazar a la formamida y/o para dar las condiciones de astringencia alternativas.

45 En una realización, la sonda de oligonucleótidos de un subconjunto de gránulos se marca con un segundo marcador detectable, lo que permite que el método descrito en este documento diferencie entre múltiples patógenos respiratorios o entre múltiples miembros de una clase de patógenos respiratorios. En general, es conveniente usar un segundo marcador detectable que se pueda diferenciar fácilmente del primer marcador detectable, por ejemplo, sobre la base de sus respectivas longitudes de onda de fluorescencia.

50 Una sonda oligonucleotídica puede marcarse con un marcador detectable, como se describe en la presente, usando cualquier medio conveniente, incluidos los ejemplificados anteriores de esta memoria con respecto al marcaje del amplicón específico de la cepa. Por ejemplo, se puede usar un enlazador químico entre el marcador y la sonda de oligonucleótido que está marcada. Los expertos en la técnica podrán determinar fácilmente secuencias de enlazador ejemplares, y es probable que incluyan enlazadores tales como modificadores de amino C6, C7 y C12 y enlazadores que comprenden grupos tiol. Como se comprobará fácilmente, un cebador puede comprender el enlazador y el marcador, o el enlazador solo, al que se puede unir el marcador en una etapa posterior. En algunas realizaciones, el enlazador es una modificación de aminoácido C6.

55

En una realización, el marcador usado es un fluoróforo (también referido en este documento como un fluorocromo) seleccionado entre: hidroxycumarina, aminocoumarina, metoxicoumarina, azul cascada, amarillo Lucifer, NBD, Ficoeritrina (PE), PerCP, alofocianina, hoechst 33342, DAP1, SYTOX Blue, hoechst 33258, cromomicina A3, mitramicina, YOYO-I, SYTOX verde, SYTOX naranja, 7-AAD, naranja de acridina, TOTO-I, To-PRO-I, naranja de tiazol, TOTO-3, TO-PRO-3, LDS 751, colorantes Alexa Fluor que incluyen Alexa Fluro-350, -430, -488, -532, -546, -555, -556, -594, -633, -647, -660, -680, -700 y -750; Colorantes BoDipy, incluidos BoDipy 630/650, BoDipy 650/665 y BoDipy-TMR; Colorantes CY, particularmente Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy 5.5 y Cy7; 6-FAM (fluoresceína); PE-Cy5, PE-Cy7, fluoresceína dT; Hexaclorofluoresceína (Hex); 6-carboxi-4',5'-dicloro-2', T-dimetoxifluoresceína (JOE); Tintes verdes de Oregón, incluidos 488-X y 514; Colorantes de rodamina, que incluyen X-Rodamina, Lisamina Rodamina B, Rodamina verde, Rodamina Rojo y ROX; TRITC, tetrametilrodamina (TMR); Carboxitetrametilrodamina (TAMRA); Tetraclorofluoresceína (JET); Rojo 6B, FluorX, BODIPY-FL y Texas Rojo.

En algunas realizaciones, el segundo marcador detectable es BoDipy-TMR.

En una realización, la sonda de oligonucleótidos está marcada con más de un marcador detectable que además permite la diferenciación entre gránulos dentro de un conjunto de gránulos.

En una realización, la cantidad de sonda oligonucleotídica marcada unida o asociada de otro modo con un gránulo dentro de un conjunto de gránulos puede controlarse para producir un gránulo con una intensidad del segundo marcador detectable predeterminada o requerida, como se describió anteriormente. Tales métodos son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, una mezcla de sondas oligonucleotídicas marcadas y no marcadas puede ponerse en contacto con los gránulos, en donde la proporción de sondas oligonucleotídicas marcadas y no marcadas dicta la cantidad de sonda oligonucleotídica marcada asociada o asociada de otro modo con un gránulo dentro de un conjunto de gránulos, y de ahí la intensidad del segundo marcador detectable en cada gránulo. La mezcla de sondas oligonucleotídicas marcadas y no marcadas se puede preparar, por ejemplo, usando las dos fórmulas secuenciales indicadas a continuación:

$$1) H = G * C * ((E/D) - 1) / F$$

Donde H = Vol (μL) de oligonucleótido de reserva no marcado (sonda de oligonucleótidos) requiere G = Vol (μL) de oligonucleótido marcado requerido

C = Concentración de oligonucleótido marcado

E = Relación deseada de TO:FLO

D = Relación TO:FLO del oligonucleótido marcado de reserva

F = Concentración de oligonucleótido de reserva sin marcar

$$2) \text{ Agua } (\mu\text{L}) = (0,01 * ((G * C) + (H * F))) - (G + H)$$

Donde G = Vol (μL) del oligonucleótido marcado requerido

C = Concentración de oligonucleótido marcado

H = Vol (μL) de oligonucleótido de reserva sin marcar requerido [derivado de 1)],

F = Concentración de oligonucleótido de reserva sin marcar

Por lo tanto, los gránulos B₁...B_n, B_y, B_z de los conjuntos de gránulos pueden ser granos fisicoquímicamente distinguibles. La expresión "fisiológicamente distinguible" se refiere a cualquier característica física o química que permite un gránulo, p. ej. B₁ para diferenciarse de otro gránulo, p. ej. B₂. En consecuencia, los gránulos fisiológicamente distinguibles permiten la diferenciación de múltiples patógenos respiratorios o cepas de los mismos. De acuerdo con el método descrito en el presente documento, los gránulos del conjunto de gránulos son distinguibles en función del tamaño y/o de la intensidad del segundo marcador detectable. En algunas realizaciones, la expresión "fisiológicamente distinguible" se refiere a una diferencia medible en cualquiera de los tamaños de los gránulos, la presencia o ausencia de un marcador detectable ópticamente en particular y/o la intensidad del marcador ópticamente detectable.

En una realización, los gránulos dentro de los conjuntos de gránulos se distinguen en función del tamaño, el nivel de intensidad del segundo marcador detectable, el tipo de fluoróforo y la secuencia de la sonda de oligonucleótido inmovilizada sobre el mismo.

La presente descripción enseña además un kit diagnóstico para su uso de acuerdo con el método descrito en este documento, que incluye diagnosticar una infección respiratoria en un sujeto humano, determinar la presencia de un patógeno respiratorio en una muestra y/o evaluar el riesgo de que un sujeto humano desarrolle una infección respiratoria.

5 En una realización, el kit comprende un conjunto de gránulos que comprende un subconjunto de gránulos, en donde los gránulos dentro de cada uno comprenden una sonda oligonucleotídica inmovilizada en los gránulos de un subgrupo de gránulos fisicoquímicamente distinguibles, en el que la sonda oligonucleotídica es complementaria a una secuencia de nucleótidos de un patógeno respiratorio. Opcionalmente, el kit puede comprender un par de cebadores capaz de unirse a secuencias conservadas entre diferentes cepas de patógenos respiratorios para generar un amplicón que comprenda una secuencia de nucleótidos distinta para una cepa particular del patógeno respiratorio, en donde el amplicón generado es supuestamente complementario a una sonda de oligonucleótidos inmovilizada a los gránulos del kit.

10 En una realización, el kit comprende al menos dos pares de cebadores que comprenden un cebador directo seleccionado de SEQ ID NOs: 1 a 16 y SEQ ID NOs: 33 y 35 y un cebador inverso correspondiente seleccionado de SEQ ID NOs: 17 a 32 y SEQ ID NOs: 34 y 36 y al menos dos sondas oligonucleotídicas complementarias seleccionadas de SEQ ID NO: 37 a 54.

La memoria descriptiva proporciona adicionalmente analitos detectados por el método descrito en este documento.

15 También se habilita en este documento un kit que comprende gránulos marcados o pre-marcados que pueden usarse en los métodos descritos en este documento. En una realización, se enseña en este documento un kit que comprende dos o más pares de cebadores oligonucleotídicos seleccionados de SEQ ID NOs: 1 y 17, 2 y 18, 3 y 19, 4 y 20, 5 y 21, 6 y 22, 7 y 23, 8 y 24, 9 y 25, 10 y 26, 11 y 27, 12 y 28, 13 y 29, 14 y 30, 15 y 31 y 16 y 32 y una sonda correspondiente seleccionada de SEQ ID NOs: 37 a 52, respectivamente. En una realización, se describe en este documento un kit que comprende dos o más pares de cebadores de oligonucleótidos y una sonda de cebador correspondiente como se enumera en la Tabla 8 (SEQ ID NOs: 74 a 126). Por "dos o más" o "al menos 2" se incluye de 2 a aproximadamente 18, incluidos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ó 18.

20 Los aspectos enseñados en este documento se describen adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

25 Diseño del cebador

Las consideraciones generales con respecto al diseño del cebador múltiple incluyen:

- Temperaturas de fusión in silico ($T^{\circ}m$) superiores a 58°C, cuando sea posible
- % de contenido de GC de 40-65%, cuando sea posible
- Evitar pruebas de más de 3 G's o C's consecutivos
- 30 • Longitud de amplicón minimizada (a menos de 150 pb cuando sea posible)

35 En el caso de las dianas de ARN, el cebador marcado con AlexaFluor (5'-amino modificado) fue el cebador responsable de cebar la síntesis de ADNc a partir del molde de ARN durante la RT-PCR. Los oligonucleótidos sonda se sintetizaron con una modificación 5' de tiol (Thio) o acridito (AmM) para permitir el acoplamiento a gránulos de sílice, y se realizó una modificación de amino interna a los oligonucleótidos de la sonda para permitir el marcaje con colorante fluorescente (BoDipy-TMR). Los pares de cebadores de amplificación (directos e inversos) se diseñaron en regiones altamente conservadas en todas las cepas analizadas, con un énfasis particular en maximizar la conservación y minimizar la degeneración en los extremos 3'.

Influenza A

Alternativas del amplicón diana: segmento 7 (MP)

40 Gene diana: Segmento 7 (MP)

Número de secuencias analizadas: 16026

'Constructo control: RTI-C2

45 Comentarios: Se obtuvieron las secuencias para Influenza A de huéspedes humanos a través del recurso de diseño de cebador de influenza (IPDR). Un total de 16026 secuencias de la Proteína de Matriz de Influenza A (MP) se utilizaron para generar la secuencia de consenso que luego se utilizó para crear un archivo de secuencia consenso en el Vector NTI. Los cebadores se diseñaron en regiones altamente conservadas en todas las cepas, con un énfasis particular en maximizar la conservación y minimizar la degeneración en los extremos 3'.

Cebadores/Sonda 1: Obsoleto

Nombre	Secuencia	T ^o m	% GC	Amplicón primario (pb)	Amplicón anidado (pb)
Am-InfA	F/5AmMC6/TRGGRTTGTGTTTCACGCTCACCGTG (SEQ ID NO: 127)	60	50	72	
P-InfA R	GGGCATTTTGGACAAAGCGTCTACGC (SEQ ID NO: 128)	61	54		
AS InfA P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCG GATCCTGCAGTCCTCGCTC ACTGGGCA (SEQ ID NO: 129)	62	64		46

- 5 La eficiencia de la amplificación de la diana usando Cebadores/Sonda 1 se consideró demasiado grande para fines prácticos de diagnóstico. Las pruebas de repetición confirmaron que se observó esporádicamente una señal de InfA positiva en muestras sin plantilla de entrada de Influenza A. Debido a la irregularidad de estos resultados falsos positivos, la contaminación puntual del entorno del lugar de trabajo con bajas cantidades de Influenza A se aceptó como la causa probable. En consecuencia, el cebador directo fue rediseñado (alt Am-InfA F) de modo que la longitud del amplicón aumentó y se redujo la eficacia de la amplificación (véase Cebadores/Sonda 2, a continuación):

Cebadores/Sonda, 2: obsoleto

Nombre	Secuencia	T ^o m	% GC	Amplicón primario (pb)	Amplicón anidado (pb)
alt Am-InfA F	/5AmMC6/GACAAGACCAA TCCTGTCACCTCTGAC (SEQ ID NO: 130)	59	52	110	
P-InfA R	GGGCATTTTGGACAAAGC GTCTACGC (SEQ ID NO: 131)	61	54		
AS InfA P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCTGCAGTCCTCGC TCACTGGGCA (SEQ IDNO: 132)	62	64		84

- 10 El uso de alt Am-InfA F (Cebadores/Sonda 2) dio como resultado la detección altamente sensible del ADN diana de Influenza A. Sin embargo, se siguieron obteniendo resultados falsos positivos bajo estas condiciones de amplificación. Como consecuencia, se diseñó y sintetizó un conjunto alternativo de cebadores/sonda que permitió la amplificación de Influenza A - Cebadores/Sonda 3 - a continuación.

15 Cebadores/Sonda 3:

Nombre	Secuencia	T ^o m	% GC	Amplicón primario (pb)	Amplicón anidado (pb)
Am-InfA2 F	/5AmMC6/CGAGGTCGAAACGTAYGTTCTYTCTAT (SEQ ID NO: 1)	58	48	122	
InfA2 R	GCCATTCCATGAGAGCCTCRAGATC (SEQ ID NO: 17)	58	52		
InfA2 Pr	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATC CAGTCTCTGCGGATCTC GGCTTTGAG (SEQ ID NO: 37)	63	58		69

- 20 La titulación de Cebadores/Sonda 3 de Influenza A dio como resultado condiciones de amplificación/marcaje que permitieron la detección de 400 copias e incluso 100 copias del constructo sintético de Influenza A. Además, no se observaron falsos positivos en 3 experimentos independientes que implicaban un total de 26 controles de agua designados y 23 controles de HeLa/MS2 designados. Además, bajo estas condiciones, estos cebadores demostraron detectar eficientemente el control positivo de HealthScope para InfA/HINI.

ES 2 662 386 T3

Influenza B

Alternativas de amplicón diana: Segmento 1 (PB2) y Segmento 4 (HA)

Gen diana: Segmento 4 (HA)

Número de secuencias analizadas: 2980

5 Construcción control: RTI-C3

Cebadores/Sonda 1: obsoleto

Nombre	Secuencia	T ^o m	% GC	Amplicón primario (pb)	Amplicón anidado (pb)
InfB F	GCACCAGGAGGACCCTACARAMTTGGA (SEQ ID NO: 133)	63	59	97	
InfB R	TTGGGACRGCCCAAGCCATTGTTGCG (SEQ ID N ^o : 134)	64	58		
Infl P	ACCTCAGGRTCTTGCCCTAACGYTACCA (SEQ ID NO: 135)	61	61		70

10 En el contexto del escenario múltiple, hubo en general una detección deficiente del constructo de control de Influenza B y especímenes clínicos confirmados de Influenza B positivos. Mientras que la amplificación primaria parecía ser eficiente (según la intensidad de banda después de la electroforesis en gel de productos de PCR), la carga sobre gránulos por hibridación después de la digestión con Exonucleasa lambda, o mediante un procedimiento de amplificación en fase sólida parecía muy pobre. Por lo tanto, se diseñó un conjunto adicional de cebadores/sonda para permitir el uso de una secuencia de sonda alternativa (véase Cebadores/Sonda 2, a continuación).

Cebadores/Sonda 2:

Nombre	Secuencia	T ^o m	% GC	Amplicón primario (pb)	Amplicón anidado (pb)
Am-InfB-2 F	/5AmMC6/TACGGTGGATTAAACAAAAGCAAGCC (SEQ ID NO: 2)	57	42	124	
P-InfB-2 R	CAGGAGGTCTATATTTGGTTCCATTGGC (SEQ ID NO: 18)	58	46		
AS InfB-2 P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCGGTGTTTTCACCCATATTGGGCAATT (SEQ ID NO: 38)	57	42		64

15

Influenza A (H1N1 2009)

Alternativas del amplicón diana: segmento 4 (HA)

Gen diana: Segmento 4 (HA) de la cepa H1N1 2009 pandémica de influenza

Número de secuencias analizadas: 4839

20 Construcción control: RTI-C4

Comentarios: Los Cebadores/Sonda seleccionados fueron diseñados para discriminar la gripe porcina pandémica de 2009 de otros virus del subtipo H1 del cerdo (y humanos).

ES 2 662 386 T3

Nombre	Secuencia	T°m	% GC	Amplicón primario (pb)	Amplicón anidado (pb)
Am-H1N1 F	/5AmMC6/CCCAAGACAAGTTCATGGCCCAATCA (SEQ ID NO: 3)	59	50	78	
P-H1N1 R	GCTTTTTGCTGTCAGCATG AGGACAT (SEQ ID N°: 19)	58	48		
AS-H1N1 P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTC GGATCCCATGCTGCCGTTACACCTTTGTTTCG (SEQ ID NO: 39)	59	55		47

Influenza A (H5N1)

Alternativas de amplicón diana: segmento 4 (HA)

Gen diana: segmento 4 (HA) de la cepa pandémica H5N1 de Influenza

5 Número de secuencias analizadas: 2757

Construcción control: RTI-C5

Nombre	Secuencia	T°m	% GC	Amplicón primario (pb)	Amplicón anidado (pb)
Am-H5N1 F	/5AmMC6/GCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCC (SEQ ID NO. 4)	61	56	128	
P-H5N1 R	YCTTCTCCACTATGTAAGACCATTCCGG (SEQ ID NO: 20)	58	50		
AS-H5N1 P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGA TCCCCGAGGAGCCATCCAGCTACACTAC (SEQ ID N°: 40)	60	60		84

Virus Sincitial Respiratorio (Tipos A y B)

Alternativas del amplicón diana: Polimerasa; Glicoproteína/Fusión; Nucleoproteína

10 Gen diana: Gen de Polimerasa

Número de secuencias analizadas: 14

Construcción control: RTI-C18 y RTI-C19

15 Comentarios: Genes de nucleoproteína y polimerasa altamente conservados muy adecuados para la detección de RSV-A y RSV-B. Sin embargo, la amplificación ineficaz utilizando los cebadores iniciales (cebadores/sonda 1) dirigidos al gen de nucleoproteína (construcciones de control RTI-C6 y RTI-C7) condujo al rediseño de cebadores/sonda dirigidos al gen de la polimerasa (construcciones de control RTI-C18 y RTI-C19; véase Cebadores/Sonda 2, a continuación).

Cebadores/Sonda 1: Nucleoproteína - Obsoleto

Nombre	Secuencia	T°m	% GC	Amplicón primario (pb)	Amplicón anidado (pb)
RSV F	TTGGGWGGAGAAGCWGGWTTCTACCA (SEQ ID NO: 136)	59	50	122	
RSV R	ATTATGCCTAGRCCWGCWGCATTGCC (SEQ ID NO: 137)	62	54		
RSV P	ARYARTGATGCTTTTGGRTTGTTCAATAT (SEQ ID NO: 138)	53/55 *	31		56

ES 2 662 386 T3

Cebadores/Sonda 2: Polimerasa

Nombre	Secuencia	T°m	% GC	Amplicón primario (pb)	Amplicón anidado (pb)
Am-RSV-3 F	/5AmMC6/ACAGTCAGTAGACCATGTGAATTC (SEQ ID NO: 5)	55	41	126	
P-RSV-3 R	RTCRATATCTTCATCACCATACTTTTCTGTGA (SEQ ID NO: 21)	54	28		
AS-RSV-3 P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCGTTCTATAAGCTGGTATTGATGCAGG (SEQ ID NO: 41)	54	42		53

Virus de Parainfluenza Humano Tipo 1 (HPIV-1)

Alternativas de amplicón diana: HN

5 Gen diana: HN

Número de secuencias analizadas: 30

Construcción control: RTI-C8

10 Comentarios: Si bien el producto de amplificación primario que usa las secuencias de Cebadores/Sonda 1 a continuación parecía altamente eficiente a partir del molde sintético (como se juzga por electroforesis en gel), la carga en los gránulos y por lo tanto la detección de fase sólida era pobre. Por lo tanto, se diseñó y sintetizó un conjunto alternativo de Cebadores/Sonda (Cebadores/Sonda 2). Después de la optimización de la concentración del cebador, la sensibilidad de detección de la fase sólida no se mejoró dramáticamente con el nuevo conjunto cebadores/sonda. Sin embargo, Cebadores/Sonda 2 se utilizó finalmente siguiendo una comparación de secuencia directa de los dos conjuntos de cebadores que indica que los cebadores/sonda 2 probablemente detectarían una mayor proporción de las secuencias de la base de datos de HN analizadas.

15

Cebadores/Sonda 1: Obsoleto

Nombre	Secuencia	T°m	% GC	Amplicón primario (pb)	Amplicón anidado (pb)
Am-Paral F	/5AmMC6/TGGCACTCCAACCTGCAAATAGGATCA (SEQ ID NO: 139)	60	48	108	
P-Paral R	CCAGTTGCAGTCTTGGTTTCCTGGTTCG (SEQ ID NO: 140)	62	56		
AS-Paral P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCACAGGACTTYATGAGGCGCCCA (SEQ ID NO: 141)	60	59		51

Cebadores/Sonda 2:

Nombre	Secuencia	T°m	% GC	Amplicón primario (pb)	Amplicón anidado (pb)
Am GB	/5AmMC6/TGGTGATGCAA	54	37	131	
HPIV1 F	TATATGCGTATTCATC (SEQ ID NO: 6)				
P GB HPIV1 R	CCGGGTTTAAATCAGGATACATATCTG (SEQ ID NO: 22)	54	41		
GB HPIV1 P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCCCTATATCTGCA CATCCTTGAGTGATT (SEQ ID NO: 42)	55	41		60

Virus de parainfluenza humano tipo 2 (HPIV-2)

Alternativas de amplicón diana: HN

Gen diana: HN

Número de secuencias analizadas: 13

5 Construcción de control: RTI-C9

Comentarios: Un total de 18 secuencias se alinearon utilizando el software EMBL-EBI y se identificó una región altamente conservada para la cual había datos para 13/18 secuencias. A partir de la secuencia consenso resultante, se identificaron las siguientes secuencias cebadores/sonda.

Nombre	Secuencia	T°m	% GC	Amplicón primario (pb)	Amplicón anidado (pb)
Am-Para2 F	/5AmMC6/CYCGTCCTGGAGTCATGCCATGCAA (SEQ ID NO: 7)	63	60	90	
P-Para2 R	CRTTAAGCGGCCACACATCTGCGT (SEQ ID N°: 23)	62	58		
AS-Para2 P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCACCCCTGTGATG CAATTAGCAGGGCA (SEQ ID NO: 43)	62	54		52

10 Virus de parainfluenza humano tipo 3 (HPIV-3)

Alternativas de amplicón diana: HN

Gen diana: HN

Número de secuencias analizadas: 5 secuencias completas del genoma y 18 secuencias HN

Construcción control: RTI-C10

Nombre	Secuencia	T°m	% GC	Amplicón primario (pb)	Amplicón anidado (pb)
Am-Para3 F	/5AmMC6/CAAGTTGGCAYAGC AAGTTACAATTAGGA (SEQ ID NO: 8)	58	41	123	
P-Para3 R	GTCCCATGGACATTCATTGTTTCCTGGT (SEQ ID NO: 24)	61	48		
AS-Para3 P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCAGCACATTATGCCATGTCC ATTTTATCC (SEQ ID NO: 44)	56	39		63

15

Virus de Parainfluenza Humano Tipo 4 (HPIV-4)

Alternativas de amplicón diana: gen de fosfoproteína (P)

Gen diana: gen P

Número de secuencias analizadas: 40

20 Construcción control: RTI-C11

Comentarios: La alineación de 40 secuencias de genes de fosfoproteína 4a (22) y 4b (18) con la única secuencia completa del genoma en la base de datos NCBI (HPIV 4b; número de acceso EU627591) utilizando el software EMBL-EBI dio como resultado una secuencia consenso que podría ser utilizada para diseñar cebadores/sonda.

ES 2 662 386 T3

Nombre	Secuencia	T°m	% GC	Amplicón primario (pb)	Amplicón anidado (pb)
Am-Para4 F	/5AmMC6/GTTGATCAAGACAATACAATTACTTGA (SEQ ID NO: 9)	53	31	109	
P-Para4 R	TAAGTGCATCTATACGAACRCCTGCTC (SEQ ID N°: 25)	59*	46*		
AS-Para4 P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCGGTTCCAGAYAAWATG GGTCTTGCTA (SEQ ID NO: 45)	59*	44*		75

*Basado en EU627591

Metapneumovirus humano (hMPV)

Alternativas del amplicón diana: nucleoproteína (N), matriz (M)

5 Gen diana: región M2 de la Matriz

Número de secuencias analizadas: 74

Construcción control: RTI-C12

10 Comentarios: Una secuencia consenso del gen M2 se hizo inicialmente a partir de alineamientos de 12 secuencias de genoma completas utilizando el software en EMBL-EBI, y a partir de estos cebadores/sonda se diseñó. Estos cebadores se comprobaron luego contra Contig 4 del ensamblaje de Matriz y NC_004148 que ensamblaron todas las secuencias de matriz hMPV con la secuencia de referencia hMPV (NC_004148).

Nombr e	Secuencia	T° m	% G C	Amplicó n primario (pb)	Amplicó n anidado (pb)
Am-hMPV F	/5AmMC6/GACAAATCATMATGTCTCGYAARGCTCC (SEQ ID NO: 10)	58	45	109	
P-hMPV R	CTATCWGGCCAACTCCAGTAATTGTG (SEQ ID NO: 26)	56	46		
AS-hMPV P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCTTGCCCCGYACTTCATATTTG CA (SEQ ID NO: 46)	58	46		80

Adenovirus (tipos B, C y E) (AdV)

Alternativas de amplicón diana: Hexón

15 Gen diana: Hexón

Número de secuencias analizadas: 247 secuencias de Hexón y 15 secuencias de genoma completas

Construcción control: RTI-C13

Nombre	Secuencia	T°m	% GC	Amplicón primario (pb)	Amplicón anidado (pb)
P-AdV F	TGCCSCARTGGKCDTACATGCACATC (SEQ ID NO: 11/12)	62	54	82	

ES 2 662 386 T3

AdV R	/5AmMC6/GCRCGGGCRAACTGCACCAG (SEQ ID NO: 27/28)	64	70		
AdV B/E P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCGCTTCGGAGTACCTGAGTCCGGGT (SEQ ID NO: 47)	63*	63		44
AdV C P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCTCGGGCCAGGACGCC TCGGAGTAC (SEQ ID NO: 48)	64*	63		56

*Calculado en el Vector NTI

Rhinovirus/Enterovirus (RhV)

Alternativas del amplicón diana: 5'UTR (región no traducida)

Amplicón diana: 5'UTR

5 Número de secuencias analizadas: 962 secuencias 5'UTR y 138 secuencias completas del genoma

Construcción control: RTI-C14

Nombre	Secuencia	T°m	% GC	Amplicón primario (pb)	Amplicón anidado (pb)
truncRhi R	/5AmMC6/GAAACACGGACACCCAAAGTAGT (SEQ ID NO: 13)	54	48	209	
P-T7truncRhi F	ACTCACTATAGGAGCCTGCGTGGCKGCC (SEQ ID NO: 29)	55	75		
Rhi P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCTCCTCCGGCCCC TGAATGYGGCTAA (SEQ ID NO: 49)	69	60		120

Bordetella pertussis (Bper)

Alternativas del amplicón diana: IS481; ptx

10 Gen diana: Segmento 4 (HA)

Número de secuencias analizadas: 2980

Construcción control: RTI-C15

Nombre	Secuencia	T°m	% GC	Amplicón primario (pb)	Amplicón anidado (pb)
P-Bper F	CCGGCCGGATGAACACCCATAAGCA (SEQ ID NO: 14)	63	60	105	
Bper R	/5AmMC6/GGGCCGCTTCAGGCACACAACTTG (SEQ ID NO: 30)	63	60		
Bper P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCTGCCGATTGACCTTCCTACGTCGA (SEQ ID NO: 50)	61	56		80

Chlamidophilus pneumoniae (Cpn)

15 Alternativas del amplicón diana: MOMP

Gen diana: MOMP

ES 2 662 386 T3

Número de secuencias analizadas: 19

Construcción de control: RTI-C16

Comentarios: cebadores/sonda localizados dentro de una región altamente conservada de la Proteína de Membrana Externa Mayor (MOMP).

Nombre	Secuencia	T°m	% GC	Amplicón primario (pb)	Amplicón anidado (pb)
P-Cpn F	CATGAATGGCAAGTAGGAGCCTCTC (SEQ ID N°: 15)	57	52	122	
Cpn R	/5AmMC6/AGTTTTGGCTGAGCAATGCGGATGT (SEQ ID NO: 31)	60	48		
Cpn P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCTGGTCTCGAGCAACTTTT GATGCTG (SEQ ID N°: 51)	58	48		53

5

Mycoplasma pneumoniae (Mpneu)

Alternativas del amplicón diana: PI Citadhesina, 16s rRNA y ATPasa

Gen diana: PI citadhesina

Número de secuencias analizadas: 212

10 Construcción control: RTI-C17

Comentarios: El consenso finalmente se derivó de 5 secuencias de una región altamente conservada del gen PI citadhesina.

Nombre	Secuencia	T°m	% GC	Amplicón primario (pb)	Amplicón anidado (pb)
P-Mpneu F	GAACCGAAGCGGCTTTGACCGCATC (SEQ ID NO: 16)	63	60	114	
Mpneu R	/5AmMC6/GCGTGGGCGTTTGCGGGTTTAACTT (SEQ ID NO: 32)	63	56		
Mpneu P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCGGGCGCGCCTTATACGAC CTGATT (SEQ ID N°: 52)	63	60		55

Fago MS-2 (MS-2)

15 Alternativas de amplicón diana: matriz

Gen diana: Matriz

Número de secuencias analizadas: 2 genomas completos

Construcción control: RTI-C1

20 Comentarios: El control MS-2 se usó para determinar que el ARN intacto se había extraído con éxito utilizando el procedimiento de purificación de ácido nucleico recomendado. Se añadió ARN de MS2 purificado a los tubos de reacción inmediatamente después de la adición de la solución de lisis dentro del procedimiento de extracción/purificación del ácido nucleico.

Nombre	Secuencia	T°m	% GC	Amplicón primario (pb)	Amplicón anidado (pb)
P-MS2-2 F	GCACGCTCCTGCTACAGCCTCTTCC (SEQ ID NO: 35)	63	64	102	
MS2-2 R	/5AmMC6/CTTTTGCAGGACTTCGGTCGACGCC (SEQ ID NO: 36)	62	60		
MS2-2 P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCGAAGTGCCGCAG AACGTTGCGAACC (SEQ ID NO: 54)	63	60		51

Ser humano

Alternativas de amplicón diana: MYL3, β -actina

Gen diana: MYL3

5 Número de secuencias analizadas: 1

Control: preparación genómica de HeLa libre de RNasa (Qiagen)

Comentarios: El propósito de este control interno era establecer una cantidad e integridad de muestra adecuadas. El gen MYL3 es un gen de copia única que se expresa principalmente en el tejido cardíaco. Por el contrario, el gen de la β -actina tiene múltiples copias y pseudogenes, y está altamente expresado en todos los tejidos.

Nombre	Secuencia	T°m	% GC	Amplicón primario (pb)	Amplicón anidado (pb)
P-MYL3 F	GCACCCAGACAATACACACAGGTGT (SEQ ID NO: 33)	59	52	131	
MYL3 R	/5AmMC6/GGCGGAAGTCAGCATGTGTCTG (SEQ ID NO: 34)	59	59		
PapType ProbeML C_Int Oligo	/5Acryd/AAT/iAmMC6T/AAAGGGAGGACAGCTATGGACCA AACACAGACACAGAGAGACCCACAGACA (SEQ ID NO: 53)	64	58		87

10

*calculado en el Vector NTI

Ejemplo 2

Preparación de oligonucleótidos sin marcar

15 Todos los oligonucleótidos se ordenaron desalinizados en Integrated ADN Technologies (IDT). Después de 3 rondas de precipitación con etanol, los cebadores se disolvieron en agua de modo que se alcanzó una concentración teórica de aproximadamente 400 μ M en base a la hoja de datos proporcionada por IDT.

20 Los oligonucleótidos sonda no marcados se ordenaron desalinizados en IDT y después de 3 rondas de precipitación de etanol se disolvieron en agua de modo que se alcanzó una concentración teórica de aproximadamente 400 μ M en base a la hoja de datos proporcionada por IDT. Los oligonucleótidos originales sin marcar se almacenaron a -20°C.

Ejemplo 3

Marcaje de oligonucleótidos Bodipy-TMR y AlexaFluor647

25 Los oligonucleótidos de cebador y sonda sintetizados con una modificación de amina en la posición C6 de un nucleótido de timidina interno se marcaron durante la noche con un exceso molar de 15 veces del éster de succinimidilo del colorante apropiado (Invitrogen) en presencia de tampón carbonato 0,1 M, pH 9,0. Los oligonucleótidos se sometieron luego a 3 rondas de precipitación con etanol para eliminar el colorante no conjugado

y se ajustaron con oligonucleótidos no marcados (pero por lo demás idénticos) para conseguir las proporciones de oligonucleótidos marcadas a no marcadas deseadas. La concentración final y TO:FLO de los oligonucleótidos marcados se ajustaron usando las siguientes fórmulas:

$$V_0 = V_2 \times C_2 \times ((TF_1/TF_0)-1)/C_0$$

$$5 \quad V_w = (1/C_t \times ((V_2 \times C_2) + (V_0 \times C_0))) - (V_2 + V_0)$$

Dónde:

V₀ Oligo sin marcador requerido para agregar

V₂ Volumen de oligo marcado para ser utilizado para el ajuste

C₂ Conc. de oligo marcado para ser utilizado para el ajuste

10 TF₁ TO:FLO diana

TF₀ TO:FLO inicial

C₀ Conc. de oligo sin marcador

V_w Volumen de agua requerido para agregar.

C_t Conc. diana

15 En general, para oligonucleótidos cebadores marcados, la relación de oligonucleótido marcado a no marcado fue de 1:1,8. Para los oligonucleótidos sonda marcados diseñados para conjugarse con los gránulos TMR altos y TMR altos, la relación de oligonucleótido marcado a no marcado fue de 1:2 y 1:100, respectivamente. Los oligonucleótidos cebadores marcados ajustados con TO:FLO se almacenaron a -20°C.

Ejemplo 4

20 Silanización de gránulos, acoplamiento de sondas y acumulación de gránulos

Se usó un volumen de 5 µL de la mezcla de gránulos preparada de esta manera por reacción de RT-PCR. Los gránulos de sílice (Bangs Laboratories Inc.) se lavaron 3 veces en agua y los gránulos granulados se trataron luego con HNO₃ 1,55 M durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los gránulos se lavaron 5 veces en agua y 3 veces en isopropanol. En un matraz de fondo redondo, aproximadamente 1 x 10⁹ gránulos en 95 ml de isopropanol se llevaron entonces a ebullición y se añadieron 0,5 ml de agua y 5 ml de 3-mercaptopropiltrimetoxisilano recién abierto (3 MPTS; Sigma). La silanización se llevó a cabo durante 23-25 h bajo reflujo, después de lo cual los gránulos se lavaron 3 veces en isopropanol y se secaron a 45°C durante 40 min en un concentrador al vacío. Los gránulos secos se curaron luego con calor durante 16-24 h a 105°C antes de almacenarse a temperatura ambiente bajo gas de Argón. Para el acoplamiento de oligonucleótidos sonda, se pesaron gránulos silanizados y se resuspendieron en tampón MES 0,1 M (Sigma Aldrich) ajustado a pH 4,75 y luego se acoplaron a oligonucleótidos sonda (IDT) mediante una modificación de 5'-acrilato (marca registrada) en presencia de 1% p/v de persulfato de amonio (APS) antes de lavarse y luego resuspendirse en Tampón de Adquisición (Tris-Cl 10 mM, EDTA 0,5 mM, NaN₃ 0,0125% p/v, Triton X-100 al 0,01% v/v). Entonces se contaron las soluciones de gránulos individuales en un contador de partículas ZI Coulter (Beckman Coulter) y se ajustaron a 2,1 x 10⁷ gránulos/ml antes de agruparlos en proporciones equimolares y ajustarlos a una concentración final de 1,26 x 10⁷ gránulos/ml. Específicamente, la combinación de gránulos se realizó mezclando proporciones iguales de cada (18) poblaciones de gránulos acoplados a 2,1 x 10⁷ gránulos/ml seguido de la adición de Tampón de Adquisición equivalente a 2/3 del volumen de los gránulos mezclados. Véase la Tabla 3.

Por ejemplo: Agrupar 10 µl de cada gránulo

40 18 x 10 µl de gránulos individuales = 180 µL

Agregar 2/3 x 180 µL = 120 µL de Tampón de Adquisición

Volumen final = 180 µl + 120 µl = 300 µL de agrupación de esferas

Se usó un volumen de 5 µL de la mezcla de gránulos preparada de esta manera por reacción de RT-PCR. También debe observarse que los experimentos iniciales implicaron la resuspensión de gránulos agrupados en un tampón similar al Tampón de Adquisición pero con Triton X-100 reducido (Triton X-100 al 0,001% v/v). Los datos experimentales posteriores (nv3pg8) mostraron que se obtuvieron resultados equivalentes cuando los gránulos se agruparon en Tampón de Adquisición o Tampón de Adquisición con Triton X-100 reducido (Triton X-100 al 0,001% v/v). Por lo tanto, para la conveniencia y los procesos de fabricación más protocolos actuales en línea, los grupos de gránulos finalmente se ensamblaron en Tampón de Adquisición.

ES 2 662 386 T3

Una vez que se decidió un par de cebadores, se diseñó la construcción control. Las construcciones control se obtuvieron a partir de GenScript en 100 µg de la forma liofilizada en la que se clonó como un inserto de ADN fabricado sintéticamente de aproximadamente 500 pb en un polienlazador del vector interno pUC57. En general, los insertos de ADN hechos sintéticamente se diseñaron con las siguientes características clave:

- 5 1) Promotores 5' T7 y T3 para la transcripción eficiente in vitro;
- 2) Amplicón diana más > 20 pb o secuencia flanqueante;
- 3) Amplicones alternativos (p. ej. HealthScope u otra literatura) con > 20 pb de secuencia flanqueante;
- 4) 3' Not I es un sitio de restricción para la linealización de la plantilla que permite la terminación de la transcripción (asegurando que no haya sitios internos Not I en las secuencias del patógeno).

Tabla 3

Volúmenes de oligonucleótido sonda requeridos 100 µM/mg de gránulos

Sonda olido ID	Secuencia	Tamaño de gránulo (µm)	TO:FLO	Vol (µm) de oligo 100 µM por mg de gránulos
InfA2 Pr	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCC AGTCTCTGCGGATCTCGGCTTTGAG	5,66	na	17,5
AS InfB-2 P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCC GGTGTTTTACCCCATATTGGGCAATT	5,20	120,00	34
AS-H1N1 P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCC CATGCTGCCGTTACACCTTTGTTCG	3,00	na	73
AS-H5N1 P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCC CCGAGGAGCCATCCAGCTACACTAC	5,01	na	34
AS-RSV-3 P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCC GTTCTATAAGCTGGTATTGATGCAGG	3,77	na	72
GB HPIV1 P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCC CCTATATCTGCACATCCTTGAGTGATT	3,77	2,00	72
AS-Para2 P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCC ACCCCTGTGATGCAATTAGCAGGGCA	3,49	2,00	53
AS-Para3 P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCC AGCACATTATGCCATGTCCATTTATCC	3,00	2,00	73
AS-Para4 P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCC GGTTCCAGYAAAWATGGGCTTGCTA	5,66	80,00	17,5
AS-hMPV P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCC TTGCCCCGYACTTCATATTTGCA	3,77	75,00	72
AdV B/E P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCC GCTTCGGAGTACCTGAGTCCGGGT	5,20	na	34
AdV C P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCC TCGGGCCAGGACGCCCTCGGAGTAC	5,20	na	34
Rhi P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCC TCCTCCGGCCCTGAATGYGGCTAA	5,01	100,00	34
Bper P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCC TGCCCGATTGACCTTCCTACGTCGA	5,66	2,00	17,5
Cpn P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCC TGGTCTCGAGCAACTTTTGATGCTG	5,20	1,50	34
Mpneu P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCC GGGCGGCCCTTATACGACCTCGATT	5,01	2,00	34
MS2-2 P	/5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCC GAAAGTGCCGCAGAACGTTTCCGAACC	3,49	na	53
Pap Type ProbeMLC Int Oligo	/5Acryd/AAT/iAmMC6T/AAAGGGAGGACAGCTATGGACCAACACAGACACAGAGAGACCCACACACA	3,49	100,00	53

Ejemplo 5

Diseño y construcción de la construcción control

Para los virus de ARN, se tuvo especial cuidado de asegurar que tras la transcripción de ARN del inserto, se produjera el ARN sentido correcto (genómico).

5 Todas las construcciones control fueron diseñadas y guardadas en Vector-NTI para fines de registro. Copias impresas de los diagramas de vectores fueron archivadas. Las secuencias presentadas a GenScript se muestran en la Figura 1. Cabe señalar que debido a un re-diseño de cebador/sonda necesario para el virus sincicial respiratorio, se diseñaron y sintetizaron construcciones control adicionales para este patógeno. Las construcciones control RTI-C18 y RTI-C19 que abarcan porciones del gen de la polimerasa de RSV son aquellas plantillas dirigidas por los
10 cebadores/sonda finales de RSV.

La transcripción in vitro usando las plantillas de construcción control sintéticas se realizó usando el kit Ambion Megascript de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se disolvieron moldes de ADN liofilizado en agua libre de RNasa hasta aproximadamente 1 µg/µl y se linealizaron 10 µg con la enzima de restricción Not I durante 2 horas a 37°C en 1 x NEBuffer 3 + BSA. Las reacciones se inactivaron luego por calor durante 20 min a
15 65°C y el ácido nucleico purificado usando el kit de extracción de gel Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN eluido en 100 µl de agua libre de nucleasas se sometió luego a precipitación con etanol con el sedimento de ADN final disuelto en 12 µl de agua libre de nucleasas. Luego se cuantificó una alícuota de cada muestra de ADN usando el espectrofotómetro.

La transcripción in vitro se realizó en 1 µg de las plantillas de ADN recién preparadas y se dejó avanzar durante 3
20 horas y 30 minutos a 37°C en el termociclador. Luego se añadió 1 µL de Turbo DNasa y las reacciones se incubaron durante 15 minutos adicionales a 37°C para eliminar todos los restos del molde de ADN de entrada. El ARN se recuperó usando el kit RNeasy según las instrucciones del fabricante y se eluyó en 50 µl de la solución de almacenamiento de ARN (Ambion). El ARN se cuantificó por triplicado usando el espectrofotómetro y la integridad y concentración del ARN se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturizante. La identidad del
25 ARN transcrito se confirmó por PCR con cebadores diseñados para amplificar secuencias internas específicas (véase la Figura 2).

En general, alícuotas de las soluciones madre de ARN se diluyeron a 1×10^9 copias/µL en solución de almacenamiento de ARN (Ambion) y se almacenaron a -20°C hasta que se requirieron. La optimización del ensayo se realizó de forma rutinaria en cantidades conocidas de ARN recién diluido a partir de las 1×10^9 copias/µL de los
30 tubos de almacenamiento.

No se observó degradación obvia de las reservas de ARN (almacenadas en tampón de almacenamiento de ARN) después de 1 mes de almacenamiento a -20°C, según se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturizante y espectrofotometría.

Ejemplo 6

35 RT-PCR en fase sólida

Se establecieron RT-PCR de un paso esencialmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen). Brevemente, se añadieron 10 µL de una mezcla maestra que contenía 1 x tampón de reacción, dNTPs, oligonucleótidos (véase el texto del cuerpo para las secuencias de oligonucleótidos) y la mezcla de enzimas a 5 µL de gránulos preplanificados. Luego se añadió la muestra (10 µL) y las placas se sellaron y centrifugaron a 300 x g
40 durante 1 min. A continuación, las bandejas se sometieron a incubaciones de 50°C durante 20 min y 95°C durante 15 min antes de ciclar (45 ciclos) de la siguiente manera: 95°C durante 30 segundos, 60°C 30 segundos y 72°C durante 1 min. Se incluyó un paso de extensión final de 2 minutos a 72°C antes de iniciar un perfil de hibridación que implicaba una incubación inicial de 90°C durante 30 segundos y luego la reducción gradual de la temperatura de incubación en 1°C cada 15 segundos durante 65 ciclos, de forma tal que se logró una temperatura de 25°C.

45 Ejemplo 7

Adquisición y análisis de datos

Después del ciclo de RT-PCR en fase sólida, las placas se centrifugaron durante 1 min a 1000 x g y los sedimentos granulados se lavaron 5 veces en 120 µl de tampón Sheath (NaCl 8 mM, Triton X-100 al 0,0001% v/v) con un centrifugado a 300 x g durante 1 min entre la adición de tampón de lavado a los sedimentos de los gránulos.
50 Alternativamente, se realizaron lavados de placa en un lavaplatos Hydrospeed (Tecan), lo que permite un tiempo de asentamiento del gránulo de 5 min entre los ciclos de aspiración suave y dispensación. Los gránulos finalmente se resuspendieron en 80 µl a 120 µL de tampón Sheath antes del análisis en el citómetro de flujo FACSArray (BD Biosciences). Los datos exportados como archivos FCS 2.0 se analizaron entonces utilizando FCS Express (software De Novo) o software de análisis personalizado (Genera Biosystems).

Ejemplo 8

Optimización de la PCR

Temperatura de recocido I: Cebadores flanqueantes (ausencia de oligonucleótido sonda interno)

5 Las temperaturas de recocido para los pares de cebadores que permitieron la amplificación eficiente de la PCR de las plantillas diana se determinaron inicialmente usando PCR de gradiente y HotStar Taq en tampón Qiagen RT-PCR. Las PCR se realizaron en 10000 copias de la plantilla diana (10 µL de 1000 copias/µL). Para asegurar que se evaluara una amplia gama de temperaturas de recocido, se usó un gradiente de temperaturas de recocido de 52-70°C. Esto se tradujo a unas temperaturas de 51,8°C, 52,2°C, 53,3°C, 55,0°C, 57,1°C, 59,5°C, 61,9°C, 64,3°C, 66,5°C, 68,2°C, 69,5°C y 70,0°C a través de los pozos dentro de cada fila del Eppendorf Mastercycler Ep S usado en este experimento. Las PCR se ciclaron de la siguiente manera: 95°C 15 minutos y luego 40 ciclos de 95°C 30 segundos, grad 52-70°C 30 segundos, 72°C 30 segundos con una extensión final de 10 min.

15 En todos los casos, se procesaron 5 µL de producto de la PCR en un gel de TAE agarosa al 2,5% (procesado a 150V) y se visualizó el ADN en un transiluminador UV después de tinción en colorante SYBR-Safe (Invitrogen) durante 20 min a una concentración 2x final. A continuación se determinó la temperatura de recocido que resulta en la amplificación eficiente de la PCR (según la determinación de la intensidad de banda) para cada conjunto de cebadores, y se muestra a continuación en la Tabla 4 siguiente:

Tabla 4

Temperaturas de recocido para cebadores de primera generación

Patógeno	T ^a recocido
Influenza A*	61,9
Influenza B*	64,3
Influenza A H1N1	61,9
Influenza A H5N1	66,5
RSV-A*	61,9
RSV-B*	64,3
Parainfluenza 1	61,9
Parainfluenza 2	66,5
Parainfluenza 3	61,9
Parainfluenza 4	61,9
Metapneumovirus	59,5
Adenovirus	61,9
Rhinovirus*	64,3
B. pertussis	61,9
C. pneumoniae	64,3
M. pneumoniae	61,9
MS2 Phage*	70

*resultados obtenidos en los primeros pares de cebadores que son diferentes a los utilizados en el ensayo final.

20 De acuerdo con las predicciones in silico, las temperaturas de recocido que permitían la amplificación máxima de las plantillas diana generalmente eran altas (> 59°C) y variaban de 59,5°C a 70°C. Una temperatura de hibridación de 60°C permitió la amplificación eficiente de todas las dianas y, por lo tanto, se seleccionó inicialmente como la temperatura de hibridación para el componente de RT-PCR en fase sólida del ensayo. Debe reiterarse que algunos de estos datos se derivaron de pares de cebadores de primera generación no utilizados en el ensayo final.

25

PCR multiplexadas: plantilla de ADN; Sin ADN de fondo

5 Se realizaron reacciones de PCR (en ausencia de la transcripción inversa) usando plantillas de ADN inicialmente con una mezcla de cebador que contenía 0,6 μM (final) de concentración de cada cebador (según lo recomendado por el fabricante para usar con el kit Qiagen de RT-PCR en una etapa). En estas condiciones, todas las dianas se amplificaron según se juzgó visualizando las bandas después de la electroforesis de PAGE durante 4 h a 100 V a 15% p/v de geles preempacados TBE (Biorad). Se observó una mala amplificación de forma reproducible para RSV-A, hMPV y RhV. Experimentos posteriores en los que las concentraciones de pares de cebadores dentro de la mezcla de cebadores se modularon identificaron mezclas de cebadores que facilitaron la amplificación eficiente de todos los analitos diana (véase la Figura 3).

10 RT-PCR múltiplex: Plantilla de ARN +/- ADN de fondo

15 Utilizando las concentraciones de cebadores establecidas en los experimentos de plantilla de ADN, las RT-PCR iniciales en 10.000 copias de dianas de ARN mostraron una amplificación ineficiente de una variedad de analitos diana, incluidos MS2, RSV-A, Para3, Para4, hMPV, AdV y RhV. Los experimentos de optimización que modulan la duración (20 min frente a 30 min) y la temperatura (40°C frente a 45°C frente a 50 frente a 55 frente a 60) del paso RT no dieron como resultado una amplificación más eficiente de las plantillas diana según el análisis PAGE. Por lo tanto, la recomendación del fabricante de 50°C durante 20 minutos se utilizó para todos los pasos posteriores de transcripción inversa.

20 Se modularon experimentos en los que las concentraciones de cebadores estaban dentro de la mezcla de cebador y se rediseñaron las combinaciones cebadores/sonda para las mezclas de cebadores MS2 y RSV identificadas que facilitaron la amplificación visible (mediante electroforesis en gel de poliacrilamida) de todos los analitos diana, excepto RhV (véase la Figura 4).

La adición posterior del ADN cromosómico de HeLa de fondo, libre de ARNasa (a una concentración final de aproximadamente 2500 equivalentes de células por reacción) no alteró significativamente el perfil de amplificación según lo juzgado por el análisis de PAGE (véase la Figura 5 a continuación).

25 Ejemplo 9

RT-PCR asimétrica

30 Para optimizar la carga de los productos PCR sobre los gránulos durante la RT-PCR de fase sólida, los cebadores se titularon cuidadosamente con el fin de introducir un nivel de asimetría en la amplificación de los analitos diana. Específicamente, para cada analito, el cebador no marcado (del mismo sentido que el del oligonucleótido sonda) se redujo en serie a un déficit molar 50 veces mayor que cuando se comparó con el cebador marcado. Se esperaba que el perfil de amplificación asimétrico resultante permitiera que se acumulara un exceso de las cadenas nacientes disponibles para el posterior cebado exitoso con el oligonucleótido sonda. De hecho, en la mayoría de los casos se observó una carga más eficiente sobre los gránulos con cantidades decrecientes de los cebadores sin marcar. Sin embargo, las relaciones molares de cebadores marcados: no marcados que proporcionaban una carga óptima de los productos de PCR sobre gránulos análogos variaban de 1:1 a 1:6, respectivamente (véase la Tabla 5 a continuación).

Tabla 5

Concentraciones de cebador que dirigen la detección eficiente basada en gránulos después de la amplificación por RT-PCR de los analitos diana

Cebador	Concentración de cebador final (μM)	Relación (marcado/no marcado)
InfA2 R	0,4	1,5
Am-InfA2 F*	0,6	
P-InfB-2 R	0,2	6
Am-InfB-2 F*	1,2	
P-H1N1 R	0,4	1,5
Am-H1N1 F*	0,6	
P-H5N1 R	0,2	6
Am-H5N1 F*	1,2	

ES 2 662 386 T3

P-RSV-3 R	0,8	1,25
Am-RSV-3 F*	1	
GB P-HPIV1 R	1	1
GB HPIV1 F*	1	
P-Para2 R	0,15	3,33
Am-Para2 F*	0,5	
Para3 R	0,5	2,4
Am-Para3 F*	1,2	
Para4 R	0,7	1,29
Am-Para4 F*	0,9	
P-hMPV R	0,6	1,33
Am-hMPV F*	0,8	
P-AdV F	0,35	2,57
AdV R*	0,9	
P-T7truncRhi F	0,6	1,33
truncRhi R*	0,8	
P-Bper F	0,1	4
Bper R*	0,4	
P-Cpn F	0,4	2,5
Cpn R*	1	
P-Mpneu F	0,2	2
Mpneu R*	0,4	
P-MS2-2 F	0,4	2,5
Am-MS2-2 R*	1	
hum f	0,075	5,33
hum R*	0,4	

* Cebadores marcados com AlexaFluor 647

Ejemplo 10

Sensibilidades de detección de analitos

- 5 Las sensibilidades preliminares de detección del analito se definieron después de la amplificación y detección de cantidades conocidas de construcciones de control sintéticas usando los valores umbral de RTIplots establecidos. Se realizaron lavados (x 6) usando 1 x tampón Sheath. Se realizaron con éxito requerimientos inequívocos para las siguientes copias de construcciones sintéticas (véase la Tabla 6):

Tabla 6

Sensibilidades confirmadas de detección de analitos

Analito	Copias detectadas
Influenza A	400

Influenza B	400
H1N1	400
H5N1	2000
RSV (A&B)	2000
Parainfluenza 1	2000
Parainfluenza 2	2000
Parainfluenza 3	5000
Parainfluenza 4	2000
hMPV	2000
AdV	2000
RhV	10000
B. pertussis	400
C. pneumophila	2000
M. pneumophila	400

Ejemplo 11

Sensibilidades de detección de RSV-A frente a RSV-B

5 Los datos preliminares que analizan la sensibilidad de detección de RSV (RSV-A y RSV-B) implicaron el uso de una mezcla equimolar de las construcciones control C18 y C19 (véase la Figura 1 para las secuencias) como una plantilla diana. Por lo tanto, para obtener datos de sensibilidad de detección independientes para RSV-A y RSV-B, se evaluaron independientemente copias conocidas de cualquiera de las construcciones usando el ensayo múltiplex de acuerdo con la presente invención. El ensayo permitió la detección exitosa de 125 copias del constructo RSV-A (C18) y 250 copias del constructo RSV-B (C19) después del análisis utilizando el software RTIplots (con un ajuste del umbral de 400 para RSV).

10 Ejemplo 12

Datos clínicos

15 Se llevó a cabo una evaluación preliminar del ensayo de forma ciega en un conjunto enriquecido de 72 muestras archivadas (Tabla 7) para el que se registraron los datos generados a través del aislamiento viral del cultivo celular. Las muestras se almacenaron a -80°C como ácido nucleico o como muestras clínicas que requirieron una nueva extracción antes del ensayo. Un resumen de los hallazgos de este estudio se muestra en la Figura 6. Debe observarse que los datos del cultivo viral de 3 muestras indicaron una coinfección; por lo tanto, el número total de muestras (72) es igual a las 62 muestras positivas al analito más las 13 muestras negativas al analito menos 3 para sumar las muestras coinfectadas.

20 Brevemente, los datos indican una concordancia del 95% del ensayo con los datos del cultivo celular para muestras positivas al analito (excluyendo los resultados RTIplex indeterminados del análisis). Además, de las 13 muestras para las cuales el virus no se pudo aislar y/o identificar después del cultivo, el ensayo fue capaz de detectar patógenos en 7 (54%) de estas muestras. Además, a partir de estos 72 especímenes clínicos, el ensayo detectó un total de 24 analitos previamente no informados por las técnicas de cultivo celular. Muchos de estos analitos adicionalmente identificados han sido confirmados por métodos basados en PCR (realizados en el Departamento de

25 Microbiología Molecular, Royal Women's Hospital, Melbourne, Victoria, Australia).

Tabla 7

Análisis de datos de cultivos celulares en muestras clínicas archivadas

	Cultivo celular	MM PCR POS	RTIplex* concordante	% concordancia con cultivo celular	Notas	RTIplex* POS; cultivo celular NEG	Infecciones de cultivo celular no registradas/coinfecciones infectadas por RTIplex
InfA	11	NT	10	91%			0
InfB	4	NT	4	100%			0
H1N1	NT	(4/7)	(8)	Na			0
H5N1	NT	-	-	Na	-		0
RSV	13	NT	12	92%	*RTIplex Hu IC NEG (IND)		2
Para1	0	-	-	Na			1
Para2	9	NT	7	78%	*RTIplex Hu IC NEG (IND)		1
Para3	11	1/1	11	100%			0
Para4	NT	-	-	Na			0
hMPV	3	NT	3	100%			0
Adv	4	NT	4	100%			2
RhV	NT	-	-	Na			9
Bper	3	NT	3	100%			4
Cpn	0	-	-	Na			0
Mpneu	4	NT	3	75%			5
Total	62	na	57	92%	(95% si se excluye INDs)		24
Sin aislamiento	13	na	5	Na		7	

NT = No probado

MM = Departamento de Microbiología Molecular, Royal Womens Hospital, Melbourne, Victoria, Australia

IND = Indeterminante

na = no aplicable

5 Hu IC = control interno humano

Ejemplo 13

Cebadores oligonucleótidos y sondas usados en el método de ensayo

10 La Tabla 8 proporciona una lista de cebadores y sondas de captura utilizados en el método y kit de análisis para patógenos respiratorios. Al menos dos pares de cebadores y sondas correspondientes se usan en el kit. Por "al menos dos" se entiende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ó 18.

15 Los expertos en la técnica apreciarán que los aspectos de los aspectos descritos en este documento son susceptibles de variaciones y modificaciones distintas a las específicamente descritas. Debe entenderse que estos aspectos incluyen todas las variaciones y modificaciones. Estos aspectos también incluyen todos los pasos, características, composiciones y compuestos mencionados o indicados en esta memoria descriptiva, individual o colectivamente, y todas y cada una de las combinaciones de dos o más de los pasos o características.

Tabla 8

Cebadores y sondas de captura utilizados en el método de ensayo para patógenos respiratorios

Análito	Diana	Longitud de amplicón primario (bp)	Oligo ID	Secuencia (5'-3')
Influenza A	Segmento 7 MP	122	Am-InfA2 InfA2 R InfA2 Pr	/5AmMC6/CGAGGTCGAAACGTA YGTTCYTCAT GCCATTCCATGAGAGCCTCRAGATC /5Acryd/AATTGAATTCGGATCCAGTCTCTGCGCGATCTCGGC TTTGAG
Influenza B	Segmento 4 HA	124	Am-InfB-2 InfB-2 R AS InfB-2 P	/5AmMC6/TACGGTGGATTAACAAAAAGCAAGCC CAGGAGGTCTATATTTGGTTCCATTGGC /5Acryd/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCGGTGTTCACCCCATATTTGGCAATT
Influenza H1N1(2009)	Segmento 4 HA	78	H1N1 R F Acry H1N1 P	/5AmMC6/GCTTTTGGCTCCAGCATGAGGACAT CCCAAGACAAGTTTCATGGCCCAATCA /5Acryd/AATTGAATTCGGATCCCGAACAAGGTGTAAAGGCAGCATG
Influenza H5N1 (Avian)	Segmento 4 HA	128	Am-H5N1 H5N1 R AS-H5N1 P	/5AmMC6/GCTCTCGCATCTAGATGGAGTGAAGCC YCTTCTCCACTATGTAAGACCATTCCGG /5Acryd/AATTGAATTCGGATCCCGAGGAGCCATCCAGTACTAC
RSV (A&B)	Polimerasa	126	Am-RSV-3 RSV-3 R AS-RSV-3 P	/5AmMC6/ACAGTCAGTAGACCATGTGAATTC RTCRATATCTTCATCACCATACTTTTCTGTTA /5Acryd/AATTGAATTCGGATCCCGTCTATAAGCTGGTATTGATGCAGG
HPIV-1	HIN	131	Am-GB HPIV1 F GB HPIV1 R Acry GB HPIV1 P	/5AmMC6/TGGTGATGCAATATATCGGTATTCATC CCGGGTTTAAATCAGGATACATACTCTG /5Acryd/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCCCCTATATCTGCACATCCTTGAGTGATT
HPIV-2	HIN	90	Am-Para2 Para2 R AS-Para2 P	/5AmMC6/CYCGTCCCTGGAGTCATGCCATGCAA CRTTAAAGCGGCCACACATCTGCGT /5Acryd/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCACCCTGTGATGCAATTAGCAGGGCA
HPIV-3	HIN	123	Am-Para3 Para3 R AS-Para3 P	/5AmMC6/CAAGTTGGCAYAGCAAGTACAATTAGGA GTCCCATGGACATTCATTGTTTCCCTGGT /5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCAGCACACATTATGCCA TGTCCTTTTA TCC
HPIV-4	Fosfoproteína	109	Am-Para4 Para4 R GB HPIV-4 Pr1 Acry GB HPIV-	/5AmMC6/GTTTGATCAAGACAATAACAATTACACTTGA TAAGTGCATCTATACGAACRCCCTGCTC /5Acryd/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCC /5Acryd/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCC GGTTCAGATAAATATGGGTCTTGCTA

			4 Pr2	
hMPV	M2	109	Am-hMPV F hMPV R Acry AS-hMPV P	/5AmMC6/GACAAAATCATMATGTCTCGYAARGCTCC CTATCWGGCCAAACTCCAGTAAATTGTG /5ThioMC6-D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCTTGCCTCCCGGACCTTGCATA TTTGCA
Adv (B.C&E)	Hexón	82	Adv F Adv R Acry Adv B/E P Acry Adv C P	TGCCSCARTGGKCDTACATGCACATC /5AmMC6/GCRCGGGCRRAACTGCACCAG /5Acryd/AATTGAATTCGGATCC GCITTCGGAGTACCTGAGTCCGGGT /5Acryd/AATTGAATTCGGATCC TCGGGCCAGGACGCCTCGGAGTAC
RhV	5'UTR	209	truncRhi R T7truncRhi F Acry Rhi P	/5AmMC6/GAAACACGGACACCCCAAAGTAGT ACTCACTATAGG AGCCTGCGTGGCKGCC /5ThioMC6- D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCTCCCGGCCCTGAATGYGGCTAA
B. pertussis	IS481	105	Bper F Bper R Acry Bper P	CCGGCCGGATGAACACCCCAAGCA /5AmMC6/GGGCCGCTTCAGGCCACACAAAATTG /5ThioMC6- D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCTCCCGGATTGACCTTCCCTACGTCGA
C.pneumoniae	MOMP	122	Cpn F Cpn R Acry Cpn P	CATGAATGGCAAGTAGGAGCCTCTC /5AmMC6/AGTTTTGGCTGAGCAATGCGGATGT/5ThioMC6- D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCTGGTCTCGAGCAACTTTTGATGCTG
M. pneumoniae	P1 Citadhesina	114	Mpneu F Mpneu R Acry Mpneu P	GAACCGAAGCGGCTTTGACCGCATC /5AmMC6/GCGTGGCGTTTGGGGTTTAACTT /5ThioMC6- D/AAT/iAmMC6T/GAATTCGGATCCGGCGGCCCTTATACGACCTCGATT
Control MS2 RNA	Matriz	102	MS2-2 R MS2- 2 F Acry MS2- 2 P	/5AmMC6/CTTTTGCAGGACTTCGGTCGACGCC GCACGCTCCTGCTACAGCCTCTTCC /5Acryd/AATTGAATTCGGATCC GAAGTGCCCGCAGAACGTTGCCAACC
Control Humano	MYL3	131	MYL3 F MYL3 R PapType ProbeMLC_Int Oligo	GCACCCAGACAAATACACACAGGTGT /5AmMC6/GGCGGGAAGTCAGCATGTGTCTG /5Acryd/AAT/iAmMC6T/AAAGGGAGGACAGCTATGGACCAAAACACACACAGAGAGACACAGAC

Bibliografía

Chadwick et al. (1998) J. Virol Methods 70: 59-70
 Chan and Fox (1999) Rev. Med. Microbiol. 70: 185- 196
 Compton (1991) Nature 550: 91-92

5 Demidov y Broude Eds. (2004) Horizon Bioscience
 Guatelli et al. (1990) Proc. Natl Acad. Sci USA 7: 1874-1878
 Hill (1996) J. Clin. Ligand Assay 7P:43-51
 Kievits et al. (1991) J Virol. Methods 35: 273-286
 Lyamichev et al. (1999) Nat. Biotechnol. 77:292-296
 10 Ryan et al. (1999) Mol. Diagn. 4:135-144

Listado de secuencias

<110> GENERA BIOSYSTEMS PTY LTD VANDEGRAAFF, Nick (US SOLO) POETTER, Karl (US SOLO)

<120> UN ENSAYO

<130> 35114801/EJH

15 <150> AU 2011904105
 <151> 2011-10-04

<160> 141

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

20 <211> 27

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> Virus Influenza A

25 <400> 1

cgaggtcgaa acgtaygttc tytctat 27

<210> 2

<211> 26

<212> ADN

30 <213> artificial

<220>

<223> Virus Influenza B

<400> 2

tacggtggat taaacaaaag caagcc 26

35 <210> 3

<211> 26

<212> ADN

<213> artificial

<220>

40 <223> Virus Influenza A

<400> 3

cccaagacaa gttcatggcc caatca 26

<210> 4

<211> 27

45 <212> ADN

<213> artificial
 <220>
 <223> Virus Influenza A
 <400> 4
 5 gctctgcat ctatggag tgaagcc 27
 <210> 5
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> artificial
 10 <220>
 <223> virus sincitial respiratorio
 <400> 5
 acagtcagta gtagaccatg tgaattc 27
 <210> 6
 15 <211> 27
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Virus parainfluenza humano 1
 20 <400> 6
 tggatgca atatgcatg attcatc 27
 <210> 7
 <211> 25
 <212> ADN
 25 <213> artificial
 <220>
 <223> Virus parainfluenza humano 2
 <400> 7
 cycgtctgg agtcatgcca tgcaa 25
 30 <210> 8
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 35 <223> Virus parainfluenza humano 3
 <400> 8
 caagttggca yagcaagta caattagga 29
 <210> 9
 <211> 29
 40 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Virus parainfluenza humano 4
 <400> 9
 45 gttgatcaag acaatacaat tacactga 29
 <210> 10
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> artificial
 50 <220>

<223> metaneumovirus humano
 <400> 10
 gacaaatcat matgtctcgy aargctcc 28
 <210> 11
 5 <211> 26
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Adenovirus tipos B y E
 10 <400> 11
 tgccscartg gkcdtacatg cacatc 26
 <210> 12
 <211> 26
 <212> ADN
 15 <213> artificial
 <220>
 <223> Adenovirus tipo C
 <400> 12
 tgccscartg gkcdtacatg cacatc 26
 20 <210> 13
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 25 <223> Rhinovirus/Enterovirus humano
 <400> 13
 gaaacacgga cacccaaagt agt 23
 <210> 14
 <211> 25
 30 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Bordetella pertussis
 <400> 14
 35 ccggccggat gaacacccat aagca 25
 <210> 15
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> artificial
 40 <220>
 <223> Chlamidophila pneumoniae
 <400> 15
 catgaatggc aagtaggagc ctctc 25
 <210> 16
 45 <211> 25
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Mycoplasma pneumoniae
 50 <400> 16

gaaccgaagc ggctttgacc gcatc 25
 <210> 17
 <211> 25
 <212> ADN
 5 <213> artificial
 <220>
 <223> Virus Influenza A
 <400> 17
 gccattccat gagagcctcr agatc 25
 10 <210> 18
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 15 <223> Virus Influenza B
 <400> 18
 caggaggctc atatttggtt ccattggc 28
 <210> 19
 <211> 25
 20 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Virus Influenza A
 <400> 19
 25 gcttttgct ccagcatgag gacat 25
 <210> 20
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> artificial
 30 <220>
 <223> Virus Influenza A
 <400> 20
 ycttctccac tatgtaagac cattccgg 28
 <210> 21
 35 <211> 32
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Virus sincitial respiratorio
 40 <400> 21
 rtratatct tcatcacat acttttctgt ta 32
 <210> 22
 <211> 27
 <212> ADN
 45 <213> artificial
 <220>
 <223> Virus parainfluenza humano 1
 <400> 22
 ccgggtttaa atcaggatac atatctg 27
 50 <210> 23

<211> 24
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 5 <223> Virus parainfluenza humano 2

 <400> 23
 crttaagcgg ccacacatct gcgt 24

 <210> 24
 <211> 29
 10 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> Virus parainfluenza humano 3

 <400> 24
 15 gtccccatgg acattcattg ttctctggt 29

 <210> 25
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> artificial

 20 <220>
 <223> Virus parainfluenza humano 4

 <400> 25
 taagtgcac tatacgaacr cctgctc 27

 <210> 26
 25 <211> 26
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> metaneumovirus humano

 30 <400> 26
 ctatcwgcc aactccagta attgtg 26

 <210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> artificial

 <220>
 <223> Adenovirus tipos B y E

 <400> 27
 gcrctggcra actgcaccag 20

 40 <210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 45 <223> Adenovirus tipo C

 <400> 28
 gcrctggcra actgcaccag 20

 <210> 29
 <211> 28
 50 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Rhinovirus/Enterovirus humano

 <400> 29
 actcactata ggagcctgcg tggckgcc 28

 5 <210> 30
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 10 <223> Bordetella pertussis

 <400> 30
 gggccgcttc aggcacacaa acttg 25

 <210> 31
 <211> 25
 15 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> Chlamidophila pneumoniae

 <400> 31
 20 agtttgct gagcaatgcg gatgt 25

 <210> 32
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> artificial

 25 <220>
 <223> Mycoplasma pneumoniae

 <400> 32
 gcgtggcgt ttgcgggtt aactt 25

 <210> 33
 30 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 33
 gcaccagac aatacacaca ggtgt 25

 35 <210> 34
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 34
 40 ggcggaagtc agcatgtgc tg 22

 <210> 35
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 45 <400> 35
 gcacgctcct gctacagcct ctcc 25

 <210> 36
 <211> 25
 <212> ADN
 50 <213> Homo sapiens

 <400> 36

ctttgcagg acttcggtcg acgcc 25

<210> 37
 <211> 38
 <212> ADN
 5 <213> artificial

<220>
 <223> Virus Influenza A

<400> 37
 gaattcggat ccagtctctg cgcgatctcg gctttgag 38

10 <210> 38
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 15 <223> Virus Influenza B

<400> 38
 gaattcggat ccggtgtttt cacccatatt gggcaatt 38

<210> 39
 <211> 37
 20 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Virus Influenza A

<400> 39
 25 gaattcggat cccatgctgc cgttacacct ttgttcg 37

<210> 40
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> artificial

30 <220>
 <223> Virus Influenza A

<400> 40
 gaattcggat ccccgaggag ccatccagct acactac 37

<210> 41
 35 <211> 38
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Virus sincitial respiratorio

<400> 41
 40 gaattcggat ccgttctata agctggatt gatgcagg 38

<210> 42
 <211> 39
 <212> ADN
 45 <213> artificial

<220>
 <223> Virus parainfluenza humano 1

<400> 42
 gaattcggat ccctatatc tgacatcct tgagtgatt 39

50 <210> 43

<211> 38
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 5 <223> Virus parainfluenza humano 2

 <400> 43
 gaattcggat ccaccctgt gatgcaatta gcagggca 38

 <210> 44
 <211> 40
 10 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> Virus parainfluenza humano 3

 <400> 44
 15 gaattcggat ccagcacatt atgcatgtc catttatcc 40

 <210> 45
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> artificial

 20 <220>
 <223> Virus parainfluenza humano 4

 <400> 45
 gaattcggat ccggtccag ayaawatggg tcttgcta 38

 <210> 46
 25 <211> 35
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> metaneumovirus humano

 30 <400> 46
 gaattcggat cctgccccg yactcatat ttgca 35

 <210> 47
 <211> 36
 <212> ADN
 35 <213> artificial

 <220>
 <223> Adenovirus tipos B y E

 <400> 47
 gaattcggat ccgctcgga gtacctgagt ccgggt 36

 40 <210> 48
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 45 <223> Adenovirus tipo C

 <400> 48
 gaattcggat cctcgggcca ggacgcctcg gtagtac 36

 <210> 49
 <211> 37
 50 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Rhinovirus/Enterovirus humano

 <400> 49
 gaattcggat cctcctccgg ccctctgaatg yggctaa 37

 5 <210> 50
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 10 <223> Bordetella pertussis

 <400> 50
 gaattcggat cctgcccgat tgaccttct acgtcga 37

 <210> 51
 <211> 37
 15 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> Chlamidophila pneumoniae

 <400> 51
 20 gaattcggat cctggtctcg agcaactttt gatgctg 37

 <210> 52
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> artificial

 25 <220>
 <223> Mycoplasma pneumoniae

 <400> 52
 gaattcggat ccgggcgcgc cttatcgcac ctcgatt 37

 <210> 53
 30 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 53
 aaagggagga cagctatgga ccaaacacag acacagagag acccacagac a 51

 35 <210> 54
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 54
 40 gaattcggat ccgaagtgcc gcagaacgtt gcgaacc 37

 <210> 55
 <211> 407
 <212> ADN
 <213> artificial

 45 <220>
 <223> fase MS-2

 <400> 55

ES 2 662 386 T3

taatacgact cactataggg agaaattaac cctcactaaa gggagagttt cggttctcc 60
 ctcgacgcac gctcctgcta cagcctcttc cctgtaagcc aaaacttgac ttacatcgaa 120
 gtgccgcaga acgttgcgaa ccgggcgctg accgaagtcc tgcaaaaggt caccagggt 180
 aattttaacc ttggtgtgc tttagcagag gccaggtcga cagcctcaca actcgcgacg 240
 caaacattg cgctcgtgaa ggcgtacact gccgctcgtc gcggaattg gcgccaggcg 300
 ctccgctacc ttgccctaaa cgaagatcga aagtttcgat caaacacgt gccggcagg 360
 tggttggagt tcagttcgg ttggttacca ctaatgagtg cggccgc 407
 <210> 56
 <211> 407
 <212> ADN
 5 <213> artificial
 <220>
 <223> Virus Influenza A
 <400> 56
 taatacgact cactataggg agaaattaac cctcactaaa gggagacttt ggccccatgg 60
 aatgttatct cctttttaag cttcctatac agtttaactg ctctgtccat gttatttga 120
 tccccattcc catttagggc attttgaca aagcgtctac gctgcagtcc tcgctcactg 180
 ggcacgggtg gcgtgaacac aaatcctaaa atccccttag tcagaggtga caggattggt 240
 cttgtcttta gccattccat gagagcctca agatctgtgt tcttccctgc aaagacatct 300
 tcaagtctct gcgcgatctc ggccttgagg ggcctgacg ggacgataga gagaacgtac 360
 gtttcgacct cggttagaag actcatcttt caatatctag cggccgc 407
 10 <210> 57
 <211> 454
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 15 <223> Virus Influenza B
 <400> 57
 taatacgact cactataggg agaaattaac cctcactaaa gggagacttc taagaaacca 60
 gcaatagctc cgaagaaacc cctttccttt aatagttttg caggaggtct atatttgggt 120
 ccattggcaa gcttcaaagg tgttttcacc catattgggc aatttcctat ggcttttgca 180
 tgttctcctg tgtagtaagg cttgcttttg tttaatccac cgtatttttc gtgaaggcaa 240
 tctgcttaat ttggtctctc ccttctgtac aaatgatgg tacttctact gttagtggat 300
 tcgttgctgt tttgtgttg tcgttctttg ggacagccca agccattggt gcgaaaaatc 360
 cgtttctact ggtaacgtta ggcgaagatc ctgaggttcc aagtctgtag ggtcctcctg 420
 gtgccttttc tgcattgata acgttagcgg ccgc 454
 <210> 58
 <211> 514
 20 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Virus Influenza A (H1N1 2009)
 <400> 58
 taatacgact cactataggg agaaattaac cctcactaaa gggagattta tcattaatgt 60
 25 aggatttgct gagctttggg tatgaatttc cttttttaac tagccatatt aaattttgt 120

ES 2 662 386 T3

agaagctttt tgctccagca tgaggacatg ctgccgttac acctttgttc gagtcatgat 180
 tgggccatga acttgtcttg ggaatatct caaaccttc aatgatgac actgagctca 240
 attgctctct tagctcctca taatcgatga aatctcctgg gtaacacggt ccattgtctg 300
 aactagatgt ttccacaatg taggaccatg agcttgctgt ggagagtgat tcacactctg 360
 gatttcccag gatccagcca gcaatgttac atttaccxaa atgcaatggg gctaccctc 420
 ttagtttgca tagtttcccg ttatgcttgt cttctagaag gttaacagag tgtgttactg 480
 ttacattctt ttctagtact gtgtctgceg ccgc 514
 <210> 59
 <211> 406
 5 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Virus Influenza A (H5N1)
 <400> 59
 aatacgactc actatagggg gaaattaacc ctactaaaag ggagacacaa atttaaagtc 60
 aaattctgca ttgtaacgat ccattggagc acatccataa agatagacca gccaccatga 120
 ttgccagtgc tagggaactc gccactgttg aataaattga cagtatttgg taagttccta 180
 ttgattccaa ttttatttca gttcttcata gtcgtgaaa ttccctgggt aacagaggtc 240
 attggctgga ttggccttct ccactatgta agaccattcc ggcacattga tgaattcgtc 300
 acacattggg ttcccgagga gccatccagc tacactacaa tctcttaaaa ttagaggctt 360
 10 cactccatct agatcgaga gcttccggtt gtgtgtctgc ggccgc 406
 <210> 60
 <211> 529
 <212> ADN
 <213> artificial
 15 <220>
 <223> Virus sincitial respiratorio
 <400> 60
 taatacgact cactataggg agaaattaac cctcactaaa gggagataga aaatgtcttt 60
 atgattccac gatttttatt ggatgctgta catttagttt tgccatagca tgacacaatg 120
 gctcctagag atgtgataac ggagctgctt acatctgttt ttgaagtcac aattttgcaa 180
 tcatatgtgt acctctgtat tctcccatta tgccctaggcc agcagcattg cctaacta 240
 cactggagaa gtgaggaaat tgagtcaaag acaataatga tgcttttggg ttgttcaata 300
 tatggtagaa cctgcttctt ccacccaatt tttgggcata ttcatatgct ccgttggatg 360
 gtgtatttgc tggatgacag aagttagctt ttgttgatg tatcattcaa cttgactttg 420
 ctaagagcca tttttgtatt tgcctcatct ttcattttat gtctctcctt aattttaaat 480
 20 tactataatt ttcaggctcc atttgaacta tggagtgtgg tgcggcgcg 529
 <210> 61
 <211> 564
 <212> ADN
 <213> artificial
 25 <220>
 <223> Virus sincitial respiratorio

ES 2 662 386 T3

<400> 61
 taatacgact cactataggg agaaattaac cctcactaaa gggagaataa tcccacgatt 60
 tttgttggat gcagtgcatt tagttttacc atagcatgac actatagctc caagagaagt 120
 aattactgag ctgcttatgt ctgtttttga tgtcatatac tctcccatta tgcctagacc 180
 tgctgcattg cctaggacca cacttgagaa gttaggaaat tgagttaatg acagcaatga 240
 tgcttttggga ttgttcaata tatggtagaa tccagcttct cctcccact tctgtgcata 300
 ctcataattg ggagtgtcaa tattatctcc tgtactacgt tgaatagtgt atttgcctgga 360
 tgacagcagc tgatccttat ttaatgtatc atttaacttg actttgctaa gagccatctt 420
 tgtatttggc ccaatttatg ttattggctt tacttttatt ttaattact aaaacggatt 480
 agctccttct taactattga gcattgttgt ttgaggaata gcttggtttg gttgggttgg 540
 ttttttttgt tggaatgcgg ccgc 564

<210> 62
 <211> 454
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Virus parainfluenzia humano 1

<400> 62
 taatacgact cactataggg agaaattaac cctcactaaa gggagattga accagttgca 60
 gtctgggttt cctggctcgg acaggacttt atgaggcgcc caattaatgg tcatgggggt 120
 gttgatattc aatgatccta ttgacaggtt ggagtgcca cctgaacccc ttgttcctgc 180
 agctattaca gaacatgatt tctgtttgct gttgatgtca taggtatgag aaattaccgg 240
 gtttaaatca ggatacatat ctgaatttaa ggatagttaa cctaattgta aaacctgata 300
 tgacttccct atatctgcac atccttgagt gattaagttt gatgaatacg catatattgc 360
 atcaccaatt gataatgaag gtagtctaac acatcctgaa attgtgggtg atccagaaag 420
 tagacttggc ccaggaata atgagagcgg ccgc 454

10

<210> 63
 <211> 427
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Virus parainfluenzia humano 2

<400> 63
 taatacgact cactataggg agaaattaac cctcactaaa gggagacatt aagcggccac 60
 acatctgcgt acaccctgt gatgcaatta gcagggcaaa aacttgttgc attgcatggc 120
 atgactccag gacgaggaac ttgataggac ggtaccatt gagcctcaat gatcggagct 180
 gcaggattga ttgtggccca ctgccctgtt gtatttggaa gagatagac tctttcaata 240
 aaggatcat tataataata gaaagcaagt ctcagttcag ctgatcagc cgtggcataa 300
 tcttcttttt cagacctgt agctacatag caatacaaga cacaacctcc tggatagca 360
 gtgactgaac agcttttgcg attgattcca toacttaggt aaatggtttt catagtctctg 420
 cggccgc 427

15

<210> 64
 <211> 344
 <212> ADN
 <213> artificial

20

ES 2 662 386 T3

<220>

<223> Virus parainfluenza humano 3

<400> 64

```

taatacgcact cactataggg agaaattaac cctcactaaa gggagatgga catgaatgtc      60
cccatggaca ttcatgtttt cctggctcttg atagcacatt atgccatgtc cattttatcc      120
ttatatcact gtagtcagta atgtcaatta ttccctaattg taacttgctg tgccaacttg      180
tagatcttgt atatataaag tatgagagat cctgggattt aagtcaggta ccaagtctga      240
gtttacagtt attatcccta tctgtaatac ttgatatgat tttcctatat cctgacaacc      300
tcgagtaatt agatttgagg tgtaagcata aatcaggcgg ccgc                          344
    
```

5

<210> 65

<211> 428

<212> ADN

<213> artificial

<220>

10 <223> Virus parainfluenza humano 4

<400> 65

```

taatacgcact cactataggg agaaattaac cctcactaaa gggagactgt tattttaagt      60
gcatctatac gaacacctgc tctgtctctca tcgggttttt gtttggttcc agataaatag      120
ggctcttgcta atgagtcagg tgtaattgta ttgtcttgat caacaaattt tgagacgtct      180
ccgttaccag taacaattat aggaacttg: tctgattcct tgtttaaact cctgagactt      240
acttttgatg ggactccagg atccattatt ttcattggtg tgattaagcc ctcaattgtg      300
gcaagtgaac ctttgatttg ttgagtgtca ttctttggtt gctgaattgt attttgagta      360

agcataattt tgtcaacttt cccttcaatc ctgtctagtc tcacttctaa tgccttaatt      420
gcggccgc                                          428
    
```

15

<210> 66

<211> 477

<212> ADN

<213> artificial

<220>

20 <223> metaneumovirus humano

<400> 66

```

taatacgcact cactataggg agaaattaac cctcactaaa gggagaggac catgctcact      60
gcacttgatt agtgcttca ctgtcttgca gggcatatga agagtcattg tcagcgctg      120
ctgataagtc ctatctggcc aactccagta attgtggta aacttgcaact cacttctct      180
gttgcaattg ccccgcaact catatttgca tggagcctg cgagacatta tgatttgta      240
tcctagagct gtgctaatac attgtattc: tatttctgca gcatatttgc aatcagtatg      300
tttagcatat agaatttctc cacacaaaag tgttatttct tgttgcaatg atgagggtgt      360
cactgcagtt gttgtgecta catctctttt tattgtgtac tgagactcct ttaatatagc      420
atgcttgtat gatagatcac tcaggtgaat cccttgaaga gacattttcg cggccgc          477
    
```

<210> 67

<211> 461

25

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> Adenovirus tipos B, C y E

ES 2 662 386 T3

<400> 67
 taatacgcact cactataggg agaaattaac cctcactaaa gggagaaatgg ccaccccatc 60
 gatgctgccc caatgggcat acatgcacat cgccggacag gatgcttcgg agtacctgag 120
 tccgggtctg gtgcagttcg cccgcgccac agacacctac ttcaatctgg gaaataagtt 180
 tagaaatccc accgtagcgc cgaccacga tgtgaccacc gaccgtagcc agcggctcat 240
 gttgcgcttc gtgacttggg acagaatatg ctctatgcca actcagctca tgctctggac 300
 atgacctttg aggtggatcc catggatgag cccaccctgc tttatcttct ctctgaagtt 360
 ttcgacgtgg tcagagtga tcagccacac cgccgcatca tcgaggcagt ctacctgcgt 420
 acaccgttct cggccggtaa cgctaccag taagcggcgc c 461

<210> 68
 <211> 413
 5 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Rhinovirus/Enterovirus humano

<400> 68
 taatacgcact cactataggg agaaattaac cctcactaaa gggagacaat agtagacctg 60
 gcagatgagg ctagaaattc cccactggcg acagtgttct agcctgcgtg gctgcctgca 120
 cacccttttt tgggctgtga agccatata ttgacaaggt gtgaagagcc ccgtgtgctc 180
 acttttgagt cctccggccc ctgaatgtgg ctaacctaa cctgcagcc attgcacaca 240
 atccagtggt tatctggctg taatgagcaa ttgcgggatg ggaccaacta ctttgggtgt 300
 ccgtgtttca ttttttttcc ttttatattc tgcttatggt gacaatgtat atatagtata 360
 10 tatatatttg tcatcatggg cgctcaggta tctagacaga atggtgcggc cgc 413

<210> 69
 <211> 414
 <212> ADN
 <213> artificial

15 <220>
 <223> Bordetella pertussis

<400> 69
 taatacgcact cactataggg agaaattaac cctcactaaa gggagactag gtgtgaagat 60
 tcaataggtt gtatgcatgg ttcatccgaa ccggatttga gaaactggaa atcgccaacc 120
 ccccagttca ctcaaggagc ccggccggat gaacacccat aagcatgccc gattgacctt 180
 cctacgtcga ctcgaaatgg tccagcaatt gatcgcccat caagtttgtg tgcctgaagc 240
 ggcccgttg ctcaccgaca atggctcggc ctttcgcagc cgcgccttcg ccgcgctgtg 300
 ccatgagctg ggcacaaagc accgctttac ccgaccttac cgcccacaga ccaatggcaa 360
 ggccgaacgc ttcatccagt cggccttgcg tgagtgggct tacgctgagg ccgc 414

<210> 70
 20 <211> 423
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Chlamidophila pneumoniae

25 <400> 70

ES 2 662 386 T3

taatacgcact cactataggg agaaattaac cctcactaaa gggagacttg cgctacttgg 60
 tgcgacgcta ttagcttaag tgctggattt tacggagact atgttttcga ccgtatctta 120
 aaagtagatg cacctaaaac attttctatg ggagccaacg ctggcgtagc aacagctact 180
 ggaacaaagt ctgcgacat caattatcat gaatggcaag taggagcctc tctatcttac 240
 agactaaact ctttagtgcc atacatgga gtacaatggt ctcgagcaac ttttgatgct 300
 gataacatcc gcattgctca gccaaaacta cctacagctg ttttaactt aactgcatgg 360
 aacccttctt tactagggaa tgccacagca ttgttacta ctgattcgtt ctcaggcggc 420

 cgc 423

 <210> 71
 5 <211> 461
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> Mycoplasma pneumoniae

 10 <400> 71
 taatacgcact cactataggg agaaattaac cctcactaaa gggagagcca gcaatttagc 60
 tacacccgcc ctgacgaggt cgcgctgccc cacaccaatg ccatcaacce gcgcttaacc 120
 ccgtgaacgt atcgtaaac gagcttttcc tccctcccc tcacgggtga aaatcccggg 180
 gcgtgggctc tagtgcgca caacagcgc aagggcatca ctgccggcag tggcagtcaa 240
 caaacacgt atgatccac ccgaaccgaa gcggcttga ccgcatcaac cacctttgcg 300
 ttacgccggt atgacctgc cgggcccgcc ttatacgacc tcgatttttc gaagttaaac 360
 ccgaaaacgc ccacgcgca ccaaacggg cagatcacct ttaaccctt tggcggcttt 420
 ggtttgagtg gggctgcacc ccaacagtga aacgcggccg c 461

 <210> 72
 <211> 354
 <212> ADN
 15 <213> artificial

 <220>
 <223> Virus sincitial respiratorio

 <400> 72
 taatacgcact cactataggg agaaattaac cctcactaaa gggagaaata attctgtag 60
 gacatacatt agtaaattgt tctactactg acattaagct aaggccaag cttatacagt 120
 tttggaatac tatatcaata tottcatcac catacttttc tgtaatatg cgattaatag 180
 ggctagtatc aaagtataa tttgtagttc tataagctgg tattgatgca ggaattcac 240
 atggctact actgactgta aggcgatgca aatagttaac acttaaatac tgggaaata 300
 atttttggc tttctcatat gtaacccea gaattcctat gctaaggcgg ccgc 354

 20 <210> 73
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 25 <223> Virus sincitial respiratorio

 <400> 73

ES 2 662 386 T3

```

taatacagact cactataggg agaaattaac cctcactaaa gggagaataa ttctattagg      60
acatatgttt gtgaattggt ccacaaccga catcaggcta agaccaaaac ttatgcaatt      120
ttgaaacaca atgtogatat cttcatctcc atacttttct gttaatacat gattgatagg      180
actagtatcg aaatgataat ttgttgttct ataagctggt attgatgcag ggaattcaca      240
tggctacta ctgactgtta aacgggtgaa ataattgaca cttagatatt gtggaacaa      300
ctttttggct ttttcatacg acagtccaag tgttccagta ctcagtgcgg ccgc          354

<210> 74
<211> 27
<212> ADN
5 <213> artificial

<220>
<223> Am-InfA2 F

<400> 74
cgaggtcgaa acgtaygttc tytctat      27

10 <210> 75
<211> 25
<212> ADN
<213> artificial

<220>
15 <223> InfA2 R

<400> 75
gccattccat gagagcctcr agatc      25

<210> 76
<211> 42
20 <212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Acry InfA2 Pr

<400> 76
25 aattgaattc ggatccagtc tctgcgcat ctcggcttg ag      42

<210> 77
<211> 26
<212> ADN
<213> artificial

30 <220>
<223> Am-InfB-2 F

<400> 77
tacggtggat taacaaaag caagcc      26

35 <210> 78
<211> 28
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> InfB-2 R

40 <400> 78
caggaggtct atattgggt ccattggc      28

<210> 79
<211> 38
<212> ADN

```

<213> artificial
 <220>
 <223> Acry AS InfB-2 P
 <400> 79
 5 gaattcggat ccggtgtttt cacccatatt gggcaatt 38
 <210> 80
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> artificial
 10 <220>
 <223> H1N1 R
 <400> 80
 gcttttgct ccagcatgag gacat 25
 <210> 81
 15 <211> 26
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> N1N1 F
 20 <400> 81
 cccaagacaa gttcatggcc caatca 26
 <210> 82
 <211> 41
 <212> ADN
 25 <213> artificial
 <220>
 <223> Acry H1N1 P
 <400> 82
 aattgaattc ggatcccga caaaggtgta acggcagcat g 41
 30 <210> 83
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 35 <223> Am-H5N1 F
 <400> 83
 gctctcggat ctatagggag tgaagcc 27
 <210> 84
 <211> 28
 40 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> H5N1 R
 <400> 84
 45 ycttctccac tatgtaagac cattccgg 28
 <210> 85
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> artificial
 50 <220>

<223> Acry AS-HFN1 P

<400> 85
aattgaattc ggatccccga ggagccatcc agctacacta c 41

5 <210> 86
<211> 27
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Am-RSV-3 F

10 <400> 86
acagtcagta gtagaccatg tgaattc 27

<210> 87
<211> 32
<212> ADN

15 <213> artificial

<220>
<223> RSV-3 R

<400> 87
rtcratatct tcatcacat acttttctgt ta 32

20 <210> 88
<211> 42
<212> ADN
<213> artificial

<220>

25 <223> Acry AS-RSV-3 P

<400> 88
aattgaattc ggatccggtc tataagctgg tattgatgca gg 42

30 <210> 89
<211> 27
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Am GB HPIV1 F

35 <400> 89
tggatgatgca atatatgctg attcac 27

<210> 90
<211> 27
<212> ADN
<213> artificial

40 <220>
<223> GB HPIV1 R

<400> 90
ccgggtttaa atcaggatac atatctg 27

45 <210> 91
<211> 39
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Acry GB HPIV1 P

50 <400> 91

gaattcggat ccctatatc tgcacatcct tgagtgatt 39

<210> 92
 <211> 25
 <212> ADN
 5 <213> artificial

<220>
 <223> Am-Para2 F

<400> 92
 cycgtcctgg agtcatgcca tgcaa 25

10 <210> 93
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 15 <223> Para2 R

<400> 93
 crttaagcgg ccacacatct gcgt 24

<210> 94
 <211> 38
 20 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Acry AS-Para2 P

<400> 94
 25 gaattcggat ccaccctgt gatgcaatta gcagggca 38

<210> 95
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> artificial

30 <220>
 <223> Am-Para3 F

<400> 95
 caagttggca yagcaagta caattagga 29

<210> 96
 <211> 29
 35 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Para3 R

<400> 96
 40 gtcccatg acattcattg tttcctggt 29

<210> 97
 <211> 40
 <212> ADN
 45 <213> artificial

<220>
 <223> Acry AS-Para3 P

<400> 97
 gaattcggat ccagcacatt atgccatgac cattttatcc 40

50 <210> 98

<211> 29
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 5 <223> am-Para4 F

 <400> 98
 gttgatcaag acaatacaat tacactga 29

 <210> 99
 <211> 27
 10 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> Para4 R

 <400> 99
 15 taagtgcatc tatacgaacr cctgctc 27

 <210> 100
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> artificial

 20 <220>
 <223> Acry GB HPIV-4 Pr1

 <400> 100
 gaattcggat ccggtccag acaaaatggg tcttgcta 38

 <210> 101
 25 <211> 38
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> Acry GB HPIV-4 Pr2

 30 <400> 101
 gaattcggat ccggtccag ataatatggg tcttgcta 38

 <210> 102
 <211> 28
 <212> ADN
 35 <213> artificial

 <220>
 <223> Am-hMPV F

 <400> 102
 gacaaatcat matgtctcgy aargctcc 28

 40 <210> 103
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 45 <223> hMPV R

 <400> 103
 ctatcwggcc aactccagta attgtg 26

 <210> 104
 <211> 35
 50 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Acry AS-hMPV P

 <400> 104
 gaattcggat cctgccccg yacttcatat ttgca 35

 5 <210> 105
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> AdV F

 <400> 105
 tgccscartg gkcdtacctg cacatc 26

 <210> 106
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> AdV R

 <400> 106
 20 gcrccggcra actgcaccag 20

 <210> 107
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> artificial

 25 <220>
 <223> Acry AdV B/E P

 <400> 107
 aattgaattc ggatccgctt cggagtacct gactccgggt 40

 <210> 108
 30 <211> 40
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> Acry AdV C P

 <400> 108
 35 aattgaattc ggatcctcgg gccaggacgc ctccgagtac 40

 <210> 109
 <211> 23
 <212> ADN
 40 <213> artificial

 <220>
 <223> truncRhi R

 <400> 109
 gaaacacgga cacccaaagt agt 23

 45 <210> 110
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 50 <223> T7truncRhi F

<400> 110
 actcactata ggagcctgcg tggckgcc 28

 <210> 111
 <211> 37
 5 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> Acry Rhi P

 <400> 111
 10 gaattcggat cctcctcgg ccctggaatg yggctaa 37

 <210> 112
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> artificial

 15 <220>
 <223> Bper F

 <400> 112
 ccggccggat gaacacccat aagca 25

 20 <210> 113
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> Bper R

 25 <400> 113
 gggccgctc aggcacacaa acttg 25

 <210> 114
 <211> 37
 <212> ADN
 30 <213> artificial

 <220>
 <223> Acry Bper P

 <400> 114
 gaattcggat cctgcccgat tgacctct acgtcga 37

 35 <210> 115
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 40 <223> Cpn F

 <400> 115
 catgaatggc aagtaggagc ctctc 25

 <210> 116
 <211> 25
 45 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 <223> Cpn R

 <400> 116
 50 agtttggct gagcaatgcg gatgt 25

<210> 117
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> artificial
 5 <220>
 <223> Acry Cpn P
 <400> 117
 gaattcggat cctggtctcg agcaacttt gatgctg 37
 <210> 118
 10 <211> 25
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Mpneu F
 15 <400> 118
 gaaccgaagc ggctttgacc gcatc 25
 <210> 119
 <211> 25
 <212> ADN
 20 <213> artificial
 <220>
 <223> Mpneu R
 <400> 119
 gcgtggcgt ttgcgggtt aactt 25
 25 <210> 120
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 30 <223> Acry Mpneu P
 <400> 120
 gaattcggat ccgggcgcg cttatacgac ctcgatt 37
 <210> 121
 <211> 25
 35 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> MS2-2 R
 <400> 121
 40 cttttgcagg acttcggtcg acgcc 25
 <210> 122
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> artificial
 45 <220>
 <223> MS2-2 F
 <400> 122
 gcacgctcct gctacagcct ctcc 25
 <210> 123
 50 <211> 41
 <212> ADN

<213> artificial
 <220>
 <223> Acry MS2-2 P
 <400> 123
 5 aattgaattc ggatccgaag tgccgcagaa cgttgcgaa c 41
 <210> 124
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> artificial
 10 <220>
 <223> MYL3 F
 <400> 124
 gcaccagac aatacacaca ggtgt 25
 <210> 125
 15 <211> 22
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> MYL3 R
 20 <400> 125
 ggcggaagtc agcatgtgc tg 22
 <210> 126
 <211> 51
 <212> ADN
 25 <213> artificial
 <220>
 <223> Oligo SondaMLC_Int tipo Pap
 <400> 126
 aaagggagga cagctatgga ccaaacacag acacagagag acccacagac a 51
 30 <210> 127
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 35 <223> Cebador directo Am-InfA
 <400> 127
 trggrttgt gttcagctc accgtg 26
 <210> 128
 <211> 26
 40 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso P-InfA
 <400> 128
 45 ggcattttg gacaaagcgt ctacgc 26
 <210> 129
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> artificial
 50 <220>

<223> AS InfA
 <400> 129
 gaattcggat cctgcagtcc tcgctcactg ggca 34
 5 <210> 130
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador directo alt Am-InfA
 10 <400> 130
 gacaagacca atcctgtcac ctctgac 27
 <210> 131
 <211> 26
 <212> ADN
 15 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso P-InfA
 <400> 131
 gggcattttg gacaaagcgt ctacgc 26
 20 <210> 132
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 25 <223> AS InfA
 <400> 132
 gaattcggat cctgcagtcc tcgctcactg ggca 34
 <210> 133
 <211> 27
 30 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador directo InfB
 <400> 133
 35 gcaccaggag gaccctacar amttgga 27
 <210> 134
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> artificial
 40 <220>
 <223> Cebador inverso InfB
 <400> 134
 ttgggacrgc ccaagccatt gttgcg 26
 <210> 135
 45 <211> 28
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> InfB
 50 <400> 135

acctcaggrt ctgcccctaa cgytacca 28
 <210> 136
 <211> 26
 <212> ADN
 5 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador directo RSV
 <400> 136
 ttggwggag aagcwggtt ctacca 26
 10 <210> 137
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 15 <223> Cebador inverso RSV
 <400> 137
 attatgccta grccwgcwgc attgcc 26
 <210> 138
 <211> 29
 20 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> RSV
 <400> 138
 25 aryartgatg ctttggrtt gttcaatat 29
 <210> 139
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> artificial
 30 <220>
 <223> Cebador directo Am-Paral
 <400> 139
 tggcactcca acctgcaaat aggatca 27
 35 <210> 140
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso P-Para1
 40 <400> 140
 ccagttgcag tcttggttc ctggtcg 27
 <210> 141
 <211> 34
 <212> ADN
 45 <213> artificial
 <220>
 <223> AS-Paral
 <400> 141
 gaattcggat ccacaggact tyatgaggcg ccca 34
 50

REIVINDICACIONES

1. Un método de cribado de una muestra para una multiplicidad de patógenos respiratorios para detectar un patógeno particular en un método de amplificación en fase sólida, comprendiendo el método:

5 (a) aislar el ácido nucleico de la muestra, cuyo ácido nucleico supuestamente comprende ácido nucleico de dos o más patógenos respiratorios;

(b) someter el ácido nucleico a amplificación en presencia de un conjunto de gránulos que tiene subconjuntos de gránulos a los que se inmovilizan las sondas de oligonucleótidos con dos o más combinaciones de pares de cebadores que comprenden cebadores directos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 16, 33 y 35 y cebadores inversos correspondientes seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 17 a 32, 34 y 36, respectivamente, en donde los pares de cebadores dirigen la amplificación de una región de ácido nucleico de un patógeno respiratorio y en donde se captura el amplicón mediante la hibridación a dicho conjunto de gránulos, en donde las sondas de oligonucleótidos son complementarias a una región de un amplicón generado por amplificación utilizando las combinaciones de pares de cebadores y las sondas correspondientes se seleccionan de 2 o más de las siguientes secuencias (SEQ ID NO: 54, 76, 79, 82, 85, 88, 91, 94, 97, 100, 101, 104, 107, 108, 111, 114, 117, 120, 123, 126); y en el que un miembro de cada par de cebadores comprende un primer marcador ópticamente detectable que se incorpora en un amplicón resultante después de la amplificación; y en donde dicho conjunto de gránulos tiene subconjuntos de gránulos, siendo cada subconjunto homogéneo con respecto al tamaño del gránulo y, opcionalmente, la intensidad de un segundo marcador ópticamente detectable, creando de este modo un conjunto de gránulos heterogéneo basado en el tamaño y/o la intensidad del segundo marcador detectable y en donde el número de subconjuntos corresponde a la cantidad de patógenos respiratorios que se van a cribar;

(c) determinar a cuál de los gránulos se ha unido un amplicón sobre la base de la intensidad del primer marcador detectable y, cuando los amplicones están unidos a múltiples subconjuntos de gránulos, distinguir entre los subconjuntos múltiples de gránulos en función del tamaño del gránulo; en donde la unión de un amplicón a un subconjunto particular de gránulos es indicativa de la presencia de un patógeno respiratorio particular en la muestra.

25 2. El método de la reivindicación 1, que comprende distinguir entre subconjuntos múltiples de gránulos en base a la intensidad del segundo marcador ópticamente detectable.

3. El método de la reivindicación 1, en el que el patógeno respiratorio se selecciona del grupo que consiste en Influenza A, Influenza B, Influenza A H1N1, Influenza A H5N1, Virus Sincitial Respiratorio subtipo A, Virus Sincitial Respiratorio Subtipo B, Virus de la parainfluenza humano 1, Virus de la Parainfluenza Humano 2, Virus de la Parainfluenza Humano 3, Virus de la Parainfluenza Humano 4, Metapneumovirus Humano, Adenovirus Humano subtipo B, Adenovirus humano subtipo C, Adenovirus Humano subtipo E, Enterovirus/Rhinovirus humano, Bordetella pertussis, Haemophilus Influenza, y microbios de los géneros Haemophilus, Mycoplasma y Chlamydomphila.

4. El método según la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico de uno o más patógenos respiratorios se selecciona del grupo que consiste en el gen que codifica el segmento 7 de la proteína de matriz de Influenza A, el gen que codifica el segmento 4 de la hemaglutinina de Influenza B, el gen que codifica el segmento 4 de la cepa pandémica H1N1 2009 de Influenza A, el gen que codifica el Segmento 4 de la cepa pandémica H5N1 de Influenza A, el gen de la polimerasa del Virus Sincitial Respiratorio (tipos A y B), el gen que codifica la glicoproteína hemaglutinina-neuraminidasa del Virus de la Parainfluenza Humano 1, 2 y 3, el gen de fosfoproteína del Virus de la Parainfluenza Humano 4, el gen que codifica la región M2 de la proteína matricial del Metapneumovirus Humano, el gen que codifica la región Hexón de Adenovirus Tipos B, C y E, región 5'UTR del Rhinovirus Humano/Enterovirus, la secuencia de inserción (IS) 481 de Bordetella pertussis, el gen que codifica la proteína de membrana externa principal de Chlamydomphila pneumoniae y el gen que codifica P1 Citadhesina de Mycoplasma pneumoniae.

5. El método de la reivindicación 1, en el que los primeros y segundos marcadores ópticamente detectables son fluoróforos seleccionados del grupo que consiste en hidroxycumarina, aminocoumarina, metoxicoumarina, azul cascada, amarillo Lucifer, NBD, ficoeritrina (PE), PerCP, alofocianina, hoechst 33342, DAP1, SYTOX Azul, hoechst 33258, cromomicina A3, mitramicina, YOYO-I, SYTOX verde, SYTOX naranja, 7-AAD, naranja de acridina, TOTO-1, To-PRO-I, naranja de tiazol, TOTO-3, TO-PRO-3, LDS 751, colorantes Alexa Fluor que incluyen Alexa Fluoro-350, -430, -488, -532, -546, -555, -556, -594, -633, -647, -660, -680, -700 y -750; Colorantes BoDipy, incluidos BoDipy 630/650 y BoDipy 650/665; Colorantes CY, particularmente Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy 5.5 y Cy7; 6-FAM (fluoresceína); PE-Cy5, PE-Cy7, fluoresceína dT; Hexaclorofluoresceína (Hex); 6-carboxi-4',5'-dicloro-2', Tdimetoxifluoresceína (JOE); Tintes verdes de Oregón, incluidos 488-X y 514; Colorantes de rodamina, que incluyen X-Rodamina, Lisamina Rodamina B, Rodamina Verde, Rodamina Rojo y ROX; TRITC3 Tetrametilrodamina (TMR); Carboxitetrametilrodamina (TAMRA); Tetracloro fluoresceína (TET); Rojo de 6B5 FluorX, BODIPY-FL y Texas Rojo.

6. El método de la reivindicación 5, en el que el primer marcador detectable ópticamente es AlexaFluor-647.

75 7. El método de la reivindicación 5 o de la reivindicación 6, en el que el segundo marcador detectable ópticamente es boro-dipirrometeno (BoDipy)-TMR.

8. El método de la reivindicación 1, en el que la sonda de oligonucleótidos está unida covalentemente al gránulo a

través de un ligando de tiol o de metacrilato.

9. El método de la reivindicación 1, en el que el tamaño de los gránulos dentro de cada subconjunto se selecciona del grupo que consiste en 3,0 μm , 3,5 μm , 3,8 μm , 4,1 μm , 5,0 μm , 5,2 μm y 5,7 μm de diámetro.

Secuencias del inserto de la construcción control

MS2P (RTI-C1)

taatacgaactcactatagggagaaattaacccctactaaagggagagtttcggcttccctcgacgcacgctcctgctacagcctct
tccctgtaagccaaaacttgacttacatcgaagtgcgcgagaacgttgcgaaccggcgctgaccgaagtcctgcaaaaggctcac
ccagggtaatttaaccttggtgtttagcagagggccaggctgacagcctcacaactcgcgacgcaaaccattgctcgtgaa
ggcgtacactgccgctcgcggtaattggcggcaggcctccgctaccttgcctaaacgaagatcgaagtttcgatcaaac
acgtggccggcagggtggttgagttgcagttcggfllggttaccactaatgagtgccggccgc (SEQ ID NO: 55)

InA (RTI-C2)

taatacgaactcactatagggagaaattaacccctactaaagggagactttggcccatggaatgttatccttttaagcttctat
agtttaactgctctgtccatgttatttggatccccattcccatttagggcattttggacaaagcgtctacgctgcagtcctcgtcactgg
gcaoggtgagcgtgaacacaaatcctaaaatcccccttagtcagaggtgacaggttggcttctttagccattccatgagagcctc
aagatctgttctcctgcaaaagacatctcaagtcctcgcgcatctcggctttagggggcctgacgggacgatagagagaac
gtacgttgcacctgggttagaagactcatcttcaatatctagcggccgc (SEQ ID NO:56)

InB (RTI-C3)

taatacgaactcactatagggagaaattaacccctactaaagggagacttctaagaaaccagcaatagctccgaaagaaacccttcc
tttaatagtttgcaggaggtctatatttgggtccattggcaagcttcaaaggtgtttcaccatattgggcaatttccatggcttttgc
gttctcctgtgtagtaaggcttcttttgaatccaccgtattttcgtgaaggcaatctgcttaatttggctctctctctctgtaca
atgtggtacttctactgttagtggttctgttctgttctgttcttgggacagcccaagccattgtgcaaaaatccgttctac
tggtaacgttagggcaagatctgaggtccaagctgttagggctcctcctggtgcttttctgattgataacgttagcggccgc
(SEQ ID NO:57)

H1 (RTI-C4)

taatacgaactcactatagggagaaattaacccctactaaagggagatttatcattaatgtaggatttgcctgagcttgggtatgaattc
ctttttaactagccatataaaattttagaagcttttgcctcagc atgaggacatgctccgttacaccttgcgagtcattggtg
gcatgaactgtcttggggaalatcfaaaccttcaaalgatgacactgagctcaattgctctcttagctcctcataatcgaatga
tctcgggtaacacgttccattgtcgaactagatgttccacaatgtaggacatgagcttgcctggagagtgattcacactctgatt
tcccagatccagccagcaatgttacatttaccxaaatgcaatggggctaccctcttagttgcatagttcccgttatgcttctct
agaaggttaacagagtggttactgttaccattctttctagtactgttctgctgcccgc (SEQ ID NO:58)

H5 (RTI-C5)

taatacgaactcactatagggagaaattaacccctactaaagggagacacaaatttaaatgcaattctgcatgtaacgatccattg
agcacatccataaagatagaccagccaccatgattgccagtgctagggaaactgccactgtgaataaattgacagfatttggtaag
ttcctattgatccaattttttagtctctcatagctgtgaaattccctggtaacagaggtcattggctggattggccttctccactat
gtaagaccattccggcactgtgaaattcgtcacacattgggttccgaggagccatccagctacactacaatctcttaaaattaga
ggcttcaactccatctagatcgcagagcttcccgtgtgtctgcccgc (SEQ ID NO:59)

Figura 1A

RSVA (RTI-C6)-OBSOLETO (véase RTI-C18)

taatacgactcactatagggagaaattaaccctcactaaagggagaaagaaaatgctttatgattccacgatttttattggatgctgta
catttagtttggccatagcatgacacaatggctcctagagatgtagataacggagctgcttacatctgttttgaagtcataatttgc
aatc
atatggtaccctctgtattcctccattatgcctagccagcagcattgcttaatactacactggagaagtgaggaaattgagtcaaaga
caataatgatgcttttgggtgttcaatataatgtagaacctgcttccaccacaattttggccatattcatatgctccgttgatggg
tattgctggatgacagaagtgatctttgtagtgatcattcaactgactttgtaagagccattttgattgccccatcttcatctt
atgctctcctaattttaaactactataaatttcaggctccatttgaactatggagtggtgctggccgc (SEQ ID NO:60)

RSVB (RTI-C7)-OBSOLETO (véase RTI-C19)

taatacgactcactatagggagaaattaaccctcactaaagggagaaataatcccacgatttttggatgacagtgacatttagttacc
atagcatgacactatagctccaagagaagtaactactgagctgcttatgctgttttggatgcatatactcctccattatgcctagacctg
ctgcaattgcttaggaccacactgagaagttaggaaattgagttaatgacagcaatgatgcttttggattgtcaatataatgtagaac
cagcttctcctcccaactctgtgcatactcataattgggagtgtaaatattatctctgtactacgttgaatagtgatttggatgac
agcagctgatccttattaatgtatcatttaactgactttgtaagagccatcttgtatttggcccaatttatgtattggcttactttatt
ttaactactaaaacggattagctccttcttaactattgagcattgtgttggaggaatagcttggttgggtgggtttttttgttgaat
gctggccgc (SEQ ID NO:61)

Para1 (RTI-C8)

taatacgactcactatagggagaaattaaccctcactaaagggagaaatgaaccagttgacagctgggttctctgctgcgacaggac
ttatgaggcgcaccaattaatggctatgggttggatctaatgatcctatttgcaggttggagtgccaacctgaaccttcttct
gacgctattacagaacatgatttctgtgtgctgtagatgtagatgagaaattaccgggtttaaaccaggatacatatctgaattta
aggatattgaacctaatgtaaaacctgatagacttccctatactgcacatcctgagtgalttaagttgatgaatagcacaatattgca
tcaccaattgataatgaaggttagtctaacacatcctgaaattgtgtggatccagaaagtagacttggccaggttaataatgagagc
gctggccgc (SEQ ID NO:62)

Para2 (RTI-C9)

taatacgactcactatagggagaaattaaccctcactaaagggagacattaagcggccacacatctgcgtacaccttctgtagca
attagcaggcgcacaaacttgttgcattgcatggcatgactccaggacgaggaacttgataggcggtaacctttagcctcaatgat
cggagctgacaggttattgtggccactgcccctgttatttggagagatagactcttcaataaagggtatcattataataatagaa
agcaagtctcagttcagctagatcagctgtggcataatcttctttcagacctttagctacatagcaatacaagacacaacctctg
gtatagcagtgactgaacagctttgctgattgattccatcacttaggtaaatggtttcatagtctcggccgc (SEQ ID NO:
63)

Para3 (RTI-C10)

taatacgactcactatagggagaaattaaccctcactaaagggagatggacatgaatgtccccatggacattcattgttctctgctt
gatagcacattatgcatgctcattttatccttatcactgtagtcagtaagtcaattatcctaatgttaactgctgtgccaactgtgag
atctgtatataaagtatgagagatcctgggatttaagtcaggtacaagctgagttacagttattatccctatctgtaataactgat
atgatttctatctgacaacctcagtaattagattgaggtgtaagcataaatcagcggccgc (SEQ ID NO:64)

Figura 1B

Para4 (RTI-C11)

taatacgactcactatagggagaaattaaccctcactaaagggagactgttatttaagtgcactatatacgaacacctgctcgtctc
atcggtttttggttccagataatagggtctgtaaatgagtcgaagtgaattgtattgcttgatcaacaaatgagacgtctcc
gtaccagtaacaattataggaacttgcttgattcttggtaaaactccgagactactttgatgggactccaggatccatttttcaat
gttgatgaaagccctcaattgtggcaagtgaacctttgattgttgagtgctattcttggttgctgaattgtatttgagtaagcataat
gtcaactttccctcaatcctgtctagtctcacttctaatgccttaattgcggccgc (SEQ ID NO:65)

HMPV (RTI-C12)

taatacgactcactatagggagaaattaaccctcactaaagggagaggaccatgctcactgcacttgattagtgttccactgcttgc
agggcatatgaagagtcattgacgcgctgctgalaagtcclatctggccaactccagtaattgtggttaaactgcaactcct
ctgttgcaattgccccgcaactcatattgcatggagccttgcgagacattatgattgcatcctgagagctgtgtaataatattgtattcct
attctgcagcataattgtaacagtatgttagcatatagaattctccacacaaaagtgtattcttgttgcgaatgatgaggggtgctact
gcagttgttgctacatctcttttattgtgactgagactctttaatatagcctgtgatgatagatcactcaggtgaateccctga
agagacattttcggccgc (SEQ ID NO:66)

AdV (RTI-C13)

taatacgactcactatagggagaaattaaccctcactaaagggagaaatggccaccccatc gatgctgccccaatgggcatacatgc
acatcgcggacaggatgcttcggagctgagtcgggtctgggtgcagttcggccgcccacagacacctacttcaatctggg
aaataagtttagaaatcccaccgtagcgcggaccacgatgtaccaccgaccgtagccagcggctcatgttgcgctcgtgactt
gggacagaatatgctctatgccaactcagctcatgctctggacatgacctttgaggtggatcccatggatgagcccacctgcttat
cttctctcgaagtttgcagctgtgtagagtgcaicagccacaccgggcatcatcagggcagctacctgcgtacaccgttctc
gccgtaacgctaccacgtaagcggccgc (SEQ ID NO:67)

Rhino (RTI-C14)

taatacgactcactatagggagaaattaaccctcactaaagggagacaatagtagacctggcagatgaggctagaaattcccact
ggcgacagtgcttagcctgctggtgctgctgcacaccccttttgggctgtgaagccatataattgacaagggtgtaagagcccc
tgtctcactttgagtcctccggcccctgaatgtggctaaccttaaccctgcagccaltgcacacaalccagtggtatctggtcgt
atgagcaattgcgggatgggaccaactactttgggtgctccgtgttctttttctttatatttgcctatggtgacaatgtatatatag
atatatatattgcatcatgggcgctcaggtatctagacagaatgttgcggccgc (SEQ ID NO:68)

B. pertussis IS481 (RTI-C15)

taatacgactcactatagggagaaattaaccctcactaaagggagactaggtgtgaagattcaataggtgtatgcatggttcatccg
aacggatttgagaaactggaaatgccaaacccccagttcactcaaggagcccggccggatgaacaccataagcatgcccga
ttgacctctacgtcactcgaatggctccagcaaltgatgccatcaagttgtgtcctgaagcggcccgttgcaccgaca
atggctcggccttgcagccgcgcttgcggcgtgtgcatgagctgggcatcaagcaccgctttaccgacittaccgccc
cagaccaatggcaagccgaacgcttcatccagtcggccttgcgtgagtgggcttacgctcggccgc (SEQ ID NO:
69)

Figura 1C

C. pneumoniae (RTI-C16)

taatacgactcactatagggagaaattaaccctcactaaagggagacttgcgctacttgggtgcgacgctattagcttacgtgctggat
ttacgggagactatgttttcgaccgtatcttaaaagtagatgcacctaataacattttctatgggagccaacgctggcgtagcaacagct
actggaacaaagtctgcgaccatcaattatcatgaatggcaagtaggagcctctctatcttacagactaaactctttagtgccatacat
tggagtacaatggctcagagcaactttgatgctgataacatccgcatgctcagccaaaactacctacagctgtttaaacttaactgc
atggaaccctcttactaggaatgccacagcattgtctactactgaltcgtttctcaggcggccgc (SEQ ID NO:70)

M. pneumoniae (RTI-C17)

taatacgactcactatagggagaaattaaccctcactaaagggagagccagcaatttagctacacccgccctgacgaggtcgcgct
gcgccacaccaatgccatcaacccgcgcttaaccccgtaacgtatcgtaacacgagcttttctcctccccctcacgggtgaaa
atcccggggcgtggcccttagtgcgcgacaacagcgtcaagggcactcactgccggcagtggcagtcaacaaccacgtatgatc
ccacccgaaccgaagcggctttgaccgcaacacacctttgcgttacccgggtatgacctgccgggcgcgccttatacagcct
cgattttcgaagttaaaccgcaaacgcccacgcgcgaccaaacgggcagatcaccttaaccccttggcggctttggtttgag
tggggctgcacccaacagtgaaacgcggccgc (SEQ ID NO:71)

RSV-A Pol Control (RTI-C18)

taatacgactcactatagggagaaattaaccctcactaaagggagaaataattctgttaggacatacattagtaaattgttctactctg
acattaagtaagccaaagcttatacagtttggaaatactatatcaatatcttcaccatacttttctgtaatatgcgattaataggg
ctagtatcaaagtataattttagttctataagctggattgatgcaggggaattcacatggtctactactgactgtaaggcgtgcaaa
tagttaacactaaatatgtggaataatttttggctttctcatatgtaaccaagaattctatgctaaggcggccgc (SEQ ID
NO:72)

RSV-B Pol Control (RTI-C19)

taatacgactcactatagggagaaattaaccctcactaaagggagaaataattctattaggacataatgttggtaattgtccacaaccg
acatcaggcctaagacaaaacttatgcaattttgaaacacaatgctgatacttcatctccatacttttctgtaatacatgattgatagga
ctagtatcgaatgataatttgttctataagctggattgatgcaggggaattcacatggtctactactgactgtaaacgggtgaaat
aattgacacttagatattgtggaacaacttttggcttttctatgacagtcgaagtgtccagtactcagtgccggccgc (SEQ
ID NO:73)

Figura 1D

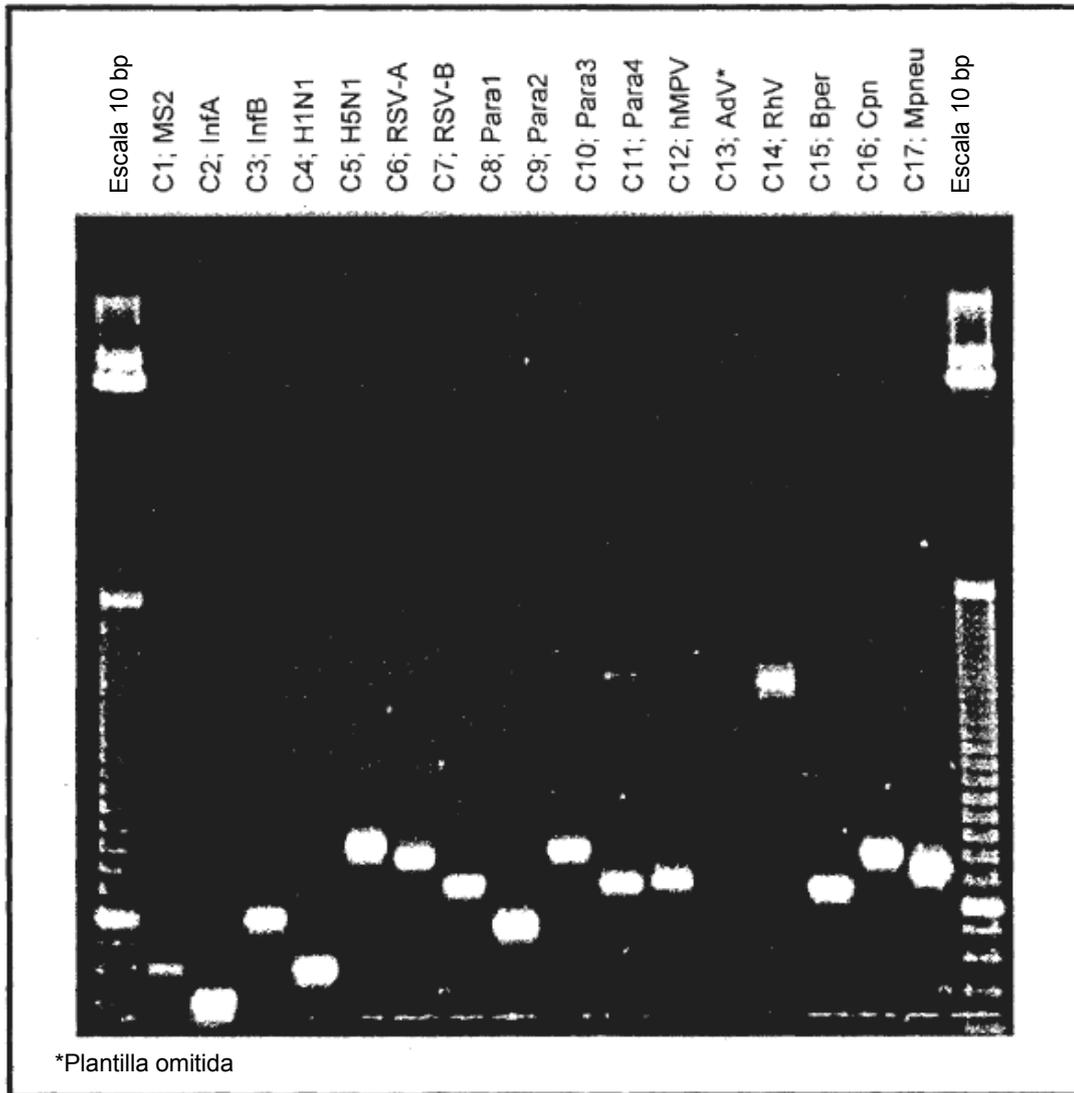


Figura 2

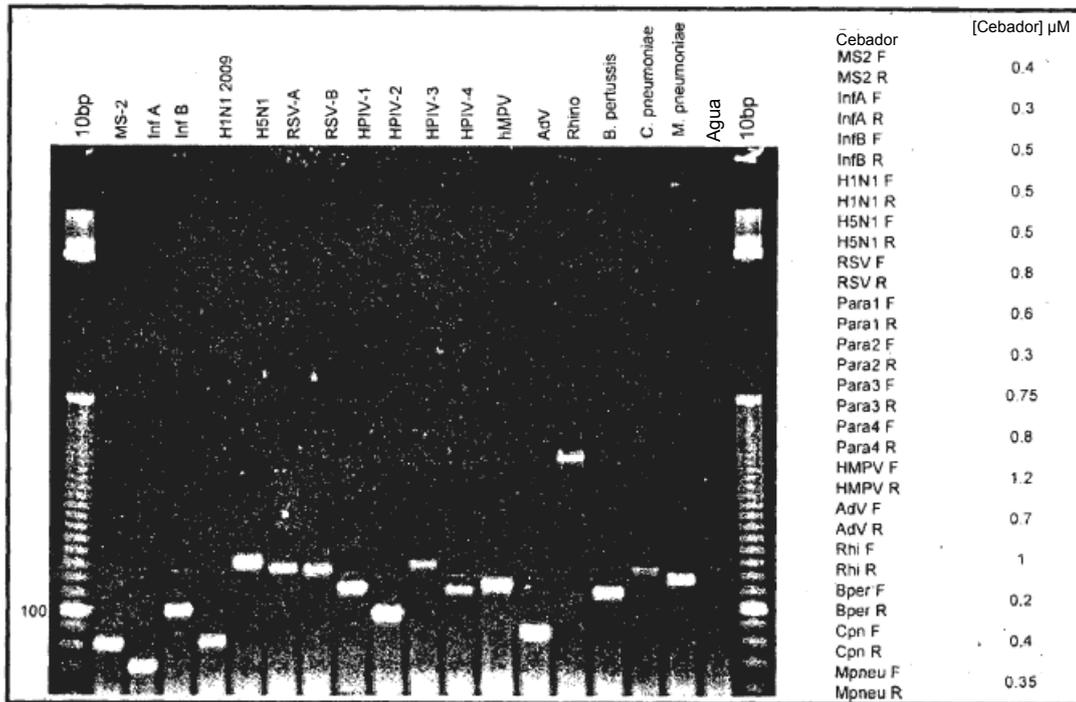


Figura 3

Cebador	[Cebador] final (µM)
P-InfA R	0.3
Am-InfA F	0.3
P-InfB-2 R	0.6
Am-InfB-2 F	0.6
P-H1N1 R	0.4
Am-H1N1 F	0.4
P-H5N1 R	0.7
Am-H5N1 F	0.7
P-RSV-3 R	0.6
Am-RSV-3 F	0.6
P-Para1 R	0.6
Am-Para1 F	0.6
P-Para2 R	0.4
Am-Para2 F	0.4
P-Para3 R	1
Am-Para3 F	1
P-Para4 R	0.7
Am-Para4 F	0.7
P-hMPV R	0.6
Am-hMPV F	0.6
P-AdV F	0.7
AdV R	0.7
P-Rh1 F	1.5
Rh1 R	1.5
P-Bper F	0.1
Bper R	0.1
P-Cpn F	0.8
Cpn R	0.8
P-Mpneu F	0.4
Mpneu R	0.4
P-MS2-2 F	0.8
Am-MS2-2 R	0.8
P B-act F	0.1
B-act R	0.1

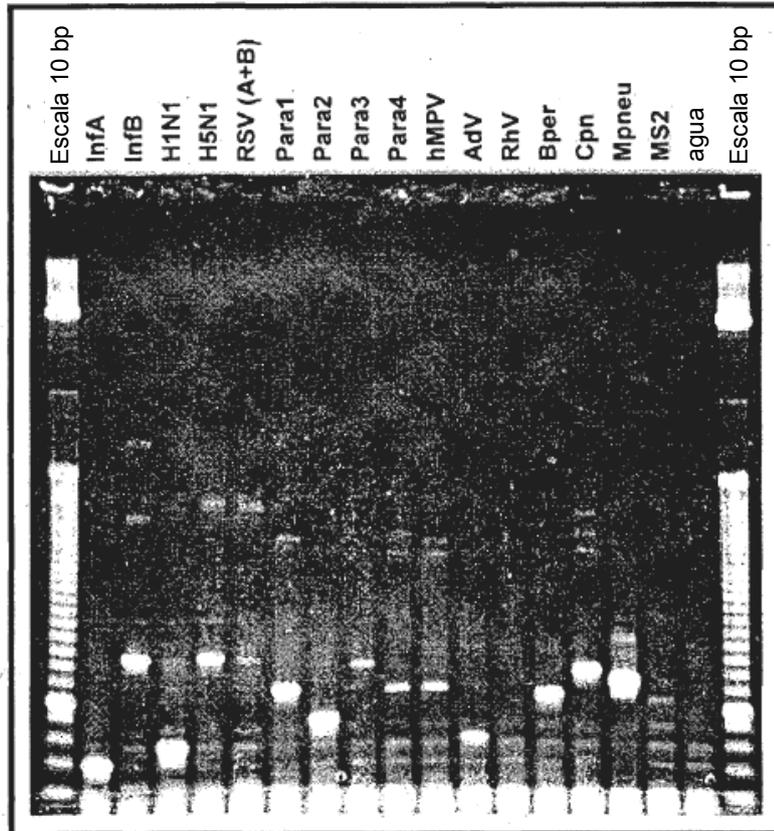


Figura 4

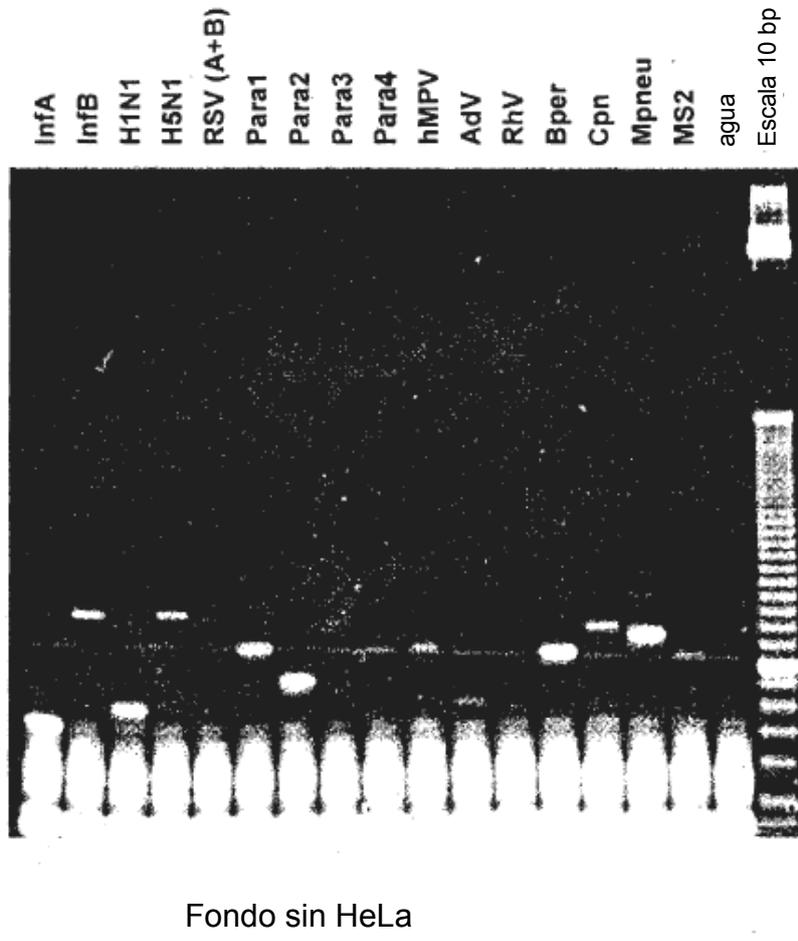


Figura 5A

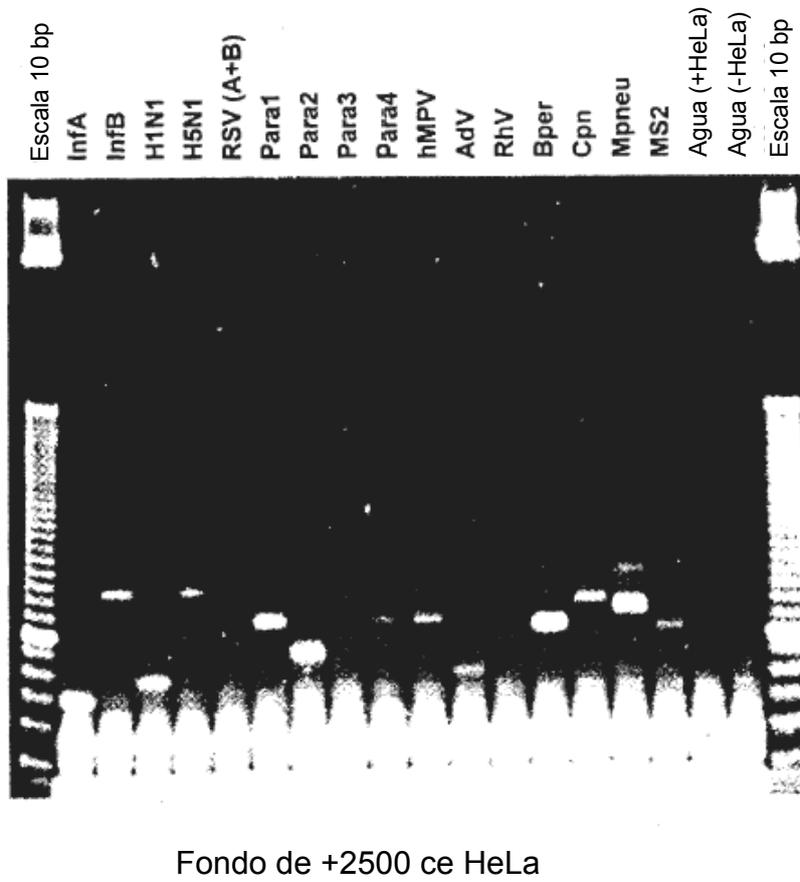


Figura 5B

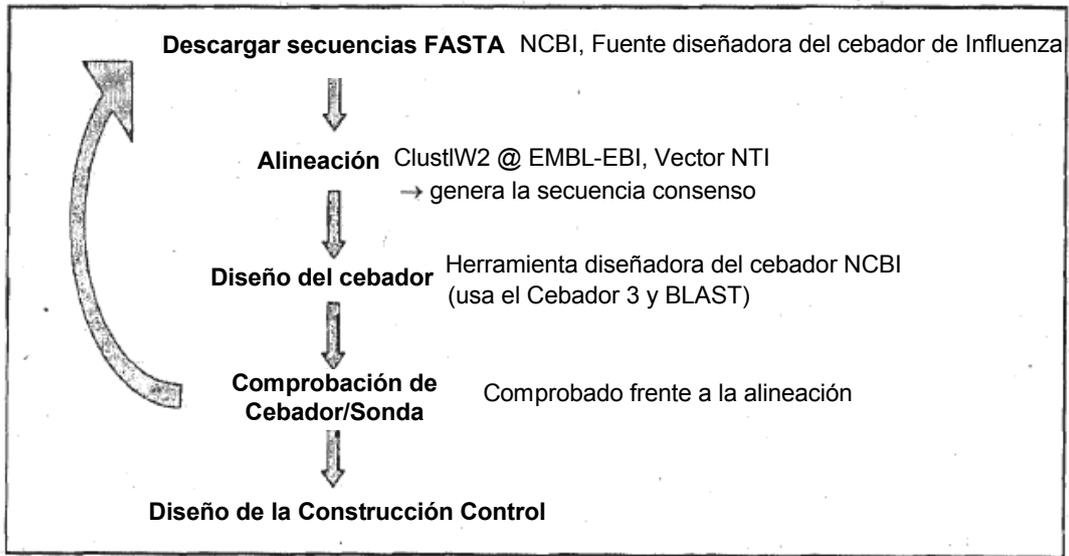


Figura 6