

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 917 630**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.08.2016 PCT/US2016/047962**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.03.2017 WO17035049**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.08.2016 E 16758348 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2022 EP 3337910**

54 Título: **Composiciones y métodos para el uso en un ensayo por PCR para determinar el genotipo y la carga viral del virus respiratorio sincitial**

30 Prioridad:

21.08.2015 US 201562208556 P

21.10.2015 US 201562244320 P

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

11.07.2022

73 Titular/es:

**LABORATORY CORPORATION OF AMERICA
HOLDINGS (100.0%)**

**358 South Main Street
Burlington, North Carolina 27215, US**

72 Inventor/es:

DE LA CRUZ, JUSTIN PHILIP

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 917 630 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 el uso en un ensayo por PCR para determinar el genotipo y la carga viral del virus respiratorio sincitial

Campo de la invención

5 Las realizaciones de la presente invención se refieren al análisis de un virus respiratorio sincitial ("VRS"). En particular, se aportan métodos para determinar el genotipo y/o la carga viral del VRS en una muestra biológica, diagnosticar una infección por VRS, y determinar la eficacia de la terapia para la infección por VRS en un sujeto; el uso de sondas de ácido nucleico en dichos métodos; y kits para la detección de la carga viral y el genotipo de un VRS en una muestra biológica.

10 Antecedentes

El VRS es un virus de ARN de una sola hebra, sentido negativo, de la familia de los paramixovirus. El VRS puede causar infecciones respiratorias graves en los seres humanos, particularmente en bebés y niños, así como en ancianos y en personas inmunodeprimidas. El genoma del VRS codifica la síntesis de varias proteínas virales, incluyendo tres glicoproteínas transmembrana (glicoproteína de unión (G), proteína de fusión (F), y proteína hidrofóbica pequeña (SH)); proteína de matriz M; proteína antiterminación de transcripción (M2-1); proteína reguladora (M2-2); tres proteínas asociadas con la nucleocápside (N, P, y L); y dos proteínas no estructurales (NS1 y NS2). Las cepas del VRS pueden dividirse en dos grupos principales, genotipos A y B (VRS A y VRS B).

El VRS humano (VRSh) es la principal causa de infecciones respiratorias graves, como bronquiolitis y enfermedades del tracto inferior, que afectan especialmente a los recién nacidos y a los niños pequeños. Aproximadamente 30 millones de niños menores de cinco años sufren una infección respiratoria inferior aguda por VRSh, y el VRSh es la causa de muchas complicaciones en pacientes nacidos prematuramente, así como en bebés que sufren enfermedades del corazón congénitas e inmunodeficiencias. Los efectos a largo plazo de la infección del VRS incluyen alteraciones del sistema nervioso central, convulsiones, apnea central y encefalopatía, por citar algunas. Se pueden atribuir más de 200.000 muertes al año por el VRSh y no existen terapias eficaces para combatir la enfermedad. Por consiguiente, se ha hecho lo posible para crear una vacuna con el fin de prevenir la infección por VRS, así como para desarrollar nuevos fármacos terapéuticos para tratar las infecciones por VRS y reducir los posibles efectos a largo plazo causados por una infección por VRS. Perkins et al., *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 43, n.º 5, 2005, páginas 2356-2362 aporta un ensayo por PCR de transcriptasa inversa en tiempo real para evaluar la carga viral en niños infectados por VRS mediante el análisis del gen N del VRS. Dewhurst-Maridor et al., *Journal of Virology Methods*, vol. 120, n.º 1, 2014, páginas 41-49 describe la secuenciación y comparación de los dos marcos abiertos de lectura en el ARNm de 22K (M2) en los subtipos A y B del VRS. Lien Anh Ha Do et al., *Journal of Virological Methods*, Vol. 179, edición 1, 2012, páginas 250-255 aporta un ensayo cuantitativo de RT-PCR en tiempo real utilizando sondas de ácido nucleico bloqueado (LNA) para evaluar la carga viral del VRS mediante el análisis del gen N del VRS. Van Elden et al., *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 41, n.º 9, 2003, páginas 4378-4381 describe un ensayo cuantitativo de PCR en tiempo real basado en TaqMan para detectar el VRS mediante el análisis del gen N del VRS. El documento US2007065813 aporta un ensayo de PCR de transcriptasa inversa en tiempo real para detectar la presencia o ausencia de VRS mediante el análisis del gen N del VRS.

Para que los profesionales de la salud puedan determinar la eficacia del tratamiento en un individuo en particular o para determinar el mejor curso de tratamiento en un individuo en particular, es importante determinar la cantidad de VRS presente en el individuo y/o el genotipo del VRS que ha infectado al individuo. Por lo tanto, lo que se necesita son composiciones y métodos para el genotipado eficiente de un VRS y para la determinación eficiente de la carga viral.

Resumen

La invención viene definida en las reivindicaciones adjuntas.

45 En el presente documento se proporcionan métodos para determinar simultáneamente la carga viral y el genotipo de un virus respiratorio sincitial (VRS) en una muestra biológica. Estos métodos incluyen los pasos de a) amplificar una secuencia de ácido nucleico que codifica un marco abierto de lectura (ORF) del VRS en una muestra biológica utilizando una serie de cebadores que amplifican específicamente un ORF del subtipo A del VRS y un ORF del subtipo B del VRS y al menos dos sondas de ácido nucleico en un ensayo cuantitativo de reacción en cadena de la polimerasa, en el que al menos una sonda se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo A del VRS y al menos una sonda se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo B del VRS, y en el que al menos dos sondas de ácido nucleico están etiquetadas diferencialmente, en el que la amplificación comprende la transcripción inversa y la amplificación cuantitativa por PCR en tiempo real, donde la serie de cebadores comprende una secuencia de ácido nucleico comprendiendo la SEQ ID NO:1, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:1, y una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:2, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:2, y donde la sonda que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo A del SRV comprende la SEQ ID NO:3, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:3, y la sonda que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo B del VRS comprende la SEQ ID NO:4, o una

secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:4; y b) determinar la carga viral y el subtipo o subtipos de VRS presentes en la muestra biológica.

Se proporcionan los métodos para determinar el genotipo o la carga viral de un virus respiratorio sincitial (VRS) en una muestra biológica. Estos métodos incluyen los pasos de a) amplificar una secuencia de ácido nucleico que codifica un marco abierto de lectura (ORF) del VRS en una muestra biológica utilizando un cebador que comprende la SEQ ID NO:1, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO: 1, un cebador que comprende la SEQ ID NO:2 o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:2, un cebador que comprende la SEQ ID NO:3 o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:3, y una sonda que comprende la SEQ ID NO:4 o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:4, o tanto una sonda que comprende la SEQ ID NO:3, como una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:3, y una sonda que comprende la SEQ ID NO:4, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:4, en un ensayo cuantitativo de reacción en cadena de la polimerasa, donde las sondas están etiquetadas diferencialmente; donde la amplificación comprende la transcripción inversa y la amplificación cuantitativa por PCR en tiempo real; y b) determinar la presencia o ausencia de un producto de amplificación que se une a una de las sondas, o determinar la carga viral, determinando así el genotipo o genotipos del VRS presentes y/o la carga viral del VRS en la muestra biológica. Además, se proporcionan los métodos para determinar el genotipo o la carga viral de un virus respiratorio sincitial (VRS) en una muestra biológica, incluyendo los pasos de a) amplificar una secuencia de ácido nucleico que codifica un marco abierto de lectura (ORF) del VRS en una muestra biológica utilizando un cebador que comprende la SEQ ID NO: 1, un cebador que comprende la SEQ ID NO:2, y o bien una sonda que comprende la SEQ ID NO:3 o una sonda que comprende la SEQ ID NO:4 en un ensayo cuantitativo de reacción en cadena de la polimerasa, donde la sonda está etiquetada; y b) determinar la presencia o ausencia de un producto de amplificación que une la sonda, o determinar la carga viral, determinando así el genotipo o genotipos del VRS presentes o la carga viral del VRS en la muestra biológica.

También se proporcionan métodos para diagnosticar una infección por VRS en un sujeto. Estos métodos incluyen los pasos de a) amplificar una secuencia de ácido nucleico que codifica un ORF del VRS en una muestra biológica del sujeto utilizando una serie de cebadores que amplifican específicamente un ORF del subtipo A del VRS y/o un ORF del subtipo B del VRS y al menos dos sondas de ácido nucleico en un ensayo cuantitativo de reacción en cadena de la polimerasa, donde al menos una sonda se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo A del VRS y al menos una sonda se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo B del VRS, y donde al menos dos sondas de ácido nucleico están etiquetadas diferencialmente, donde la serie de cebadores comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 1, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO: 1, y una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:2, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:2, y donde la sonda que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo A del VRS comprende la SEQ ID NO:3, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:3, y la sonda que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo B del VRS comprende la SEQ ID NO:4, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:4, donde la amplificación comprende la transcripción inversa y la amplificación cuantitativa por PCR en tiempo real, y opcionalmente donde la transcripción inversa y la amplificación cuantitativa en tiempo real, ocurren en un solo paso; y b) determinar la carga viral y el subtipo o subtipos de VRS presentes en la muestra biológica, diagnosticando así a un sujeto con una infección por VRS.

También se proporcionan los métodos para determinar la eficacia de una terapia para la infección por VRS en un sujeto. Estos métodos incluyen los pasos de amplificar una secuencia de ácido nucleico que codifica un ORF del VRS en una primera muestra biológica del sujeto utilizando una serie de cebadores que amplifican específicamente un ORF del subtipo A del VRS y un ORF del subtipo B del VRS y al menos dos sondas de ácido nucleico en un ensayo cuantitativo de reacción en cadena de la polimerasa, donde al menos una sonda se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo A del VRS y al menos una sonda se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo B del VRS, y donde al menos dos sondas de ácido nucleico están etiquetadas diferencialmente; b) determinar la carga viral y el subtipo o subtipos de VRS presentes en la primera muestra biológica; c) amplificar una secuencia de ácido nucleico que codifica un ORF del VRS en una segunda muestra biológica del sujeto utilizando una serie de cebadores que amplifican específicamente un ORF del subtipo A del VRS y/o un ORF del subtipo B del VRS y al menos dos sondas de ácido nucleico en un ensayo cuantitativo de reacción en cadena de la polimerasa, donde el sujeto ha recibido al menos un tratamiento con una primera terapia para la infección por VRS, donde al menos una sonda se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo A del VRS y al menos una sonda se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo B del VRS, y donde al menos dos sondas de ácido nucleico están etiquetadas diferencialmente; d) determinar la carga viral y el subtipo o subtipos de VRS presentes en la segunda muestra biológica; comparar la carga viral y/o los subtipos de VRS de la primera muestra biológica con la carga viral y/o los subtipos de VRS de la segunda muestra biológica, donde una disminución en la carga viral en la segunda muestra biológica o un cambio en el subtipo o subtipos de VRS en comparación con la carga viral y/o el subtipo o subtipos de la primera muestra biológica indica que el tratamiento es efectivo y donde un aumento o la ausencia de cambio de la carga viral y/o del subtipo o subtipos del VRS en comparación con la carga viral y/o el subtipo o subtipos del VRS en la primera muestra biológica indica que el tratamiento no es efectivo, donde la serie de cebadores comprende una secuencia de ácido nucleico comprendiendo la SEQ ID NO: 1, o una secuencia

de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO: 1, y una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:2, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:2, y donde la sonda que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo A del VRS comprende la SEQ ID NO:3, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:3, y la sonda que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo B del VRS comprende la SEQ ID NO:4, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:4, donde la amplificación de la secuencia de ácido nucleico comprende la transcripción inversa y la amplificación cuantitativa por PCR en tiempo real, y opcionalmente donde la transcripción inversa y la amplificación cuantitativa en tiempo real, se producen en un solo paso.

Se proporciona el uso de sondas de ácido nucleico para la detección del genotipo de un VRS. En algunas realizaciones, las sondas comprenden la SEQ ID NO:3, una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:3, o la SEQ ID NO:4, una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:4. SEQ ID NO:36 (GCAAGCTTAACAAC-TCAAATTCAAATCAAC), una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:36, o SEQ ID NO:37 (TCAAGCTTGACATCAGAAATACAAGTCAAT), o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:37, y una fracción detectable. Se proporciona el uso de una o más de estas sondas en los métodos para la detección del genotipo de un VRS en una muestra biológica. En algunas realizaciones, se utiliza una sonda de control. La sonda de control puede comprender, por ejemplo, la SEQ ID NO:5.

Se proporcionan kits para la detección de la carga viral y el genotipo de un VRS en una muestra biológica. Los kits pueden incluir un cebador de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:1 o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO: 1, un cebador de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:2 o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:2, una sonda que comprende la SEQ ID NO:3 o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:3, y una sonda que comprende la SEQ ID NO:4 o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:4, y opcionalmente un cebador nucleico que comprende la SEQ ID NO:30 o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:30, un cebador nucleico que comprende la SEQ ID NO:31 o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:31, y una sonda de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:5 o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:1. En determinadas realizaciones, los kits además comprenden un cebador de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:34, un cebador de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:35, una sonda de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:36 y una sonda de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:37.

También se proporcionan, como un aspecto de la divulgación, los métodos para amplificar y secuenciar el marco abierto de lectura (ORF) de una proteína F del VRS y métodos para amplificar y secuenciar el ORF de una proteína F del VRS. Determinados de estos métodos pueden incluir los pasos de a) amplificar una secuencia de ácido nucleico que codifica un marco abierto de lectura F del VRS en una muestra biológica utilizando una serie de cebadores que comprende la SEQ ID NO:6 y la SEQ ID NO:7 en un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa; y b) secuenciar el producto de amplificación utilizando uno o más cebadores seleccionados del grupo compuesto por la SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, y SEQ ID NO:19. Algunos otros métodos pueden incluir los pasos de a) amplificar una secuencia de ácido nucleico que codifica un marco abierto de lectura F del VRS en una muestra biológica utilizando una serie de cebadores que comprende la SEQ ID NO:8 y la SEQ ID NO:9; y b) secuenciar el producto de amplificación en un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa utilizando uno o más cebadores de secuenciación del grupo compuesto por la SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:29.

También se proporcionan, como un aspecto de la divulgación, kits para la amplificación y secuenciación del ORF de una proteína F del VRS y kits para amplificar y secuenciar el ORF de una proteína F del VRS. Los kits incluyen una serie de cebadores que comprenden la SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:7 y/o una serie de cebadores que comprenden la SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:9. En algunas realizaciones, los kits pueden incluir uno o más cebadores seleccionados del grupo compuesto por la SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:29.

Descripción de las ilustraciones

Las figuras que se aportan aquí pretenden ilustrar determinadas realizaciones y/o características de las composiciones y métodos, y complementar cualquier descripción de las composiciones y métodos. Las figuras no limitan el alcance de las composiciones y métodos, salvo que la descripción escrita indique expresamente que ese es el caso.

Las Figuras 1A y 1B muestran los resultados de ensayos qRT-PCR multiplexados para determinar simultáneamente la carga viral y la especificidad del subtipo de VRS. La Figura 1A es una representación gráfica de los datos que aparecen en la tabla en la Figura 1B, donde los datos del subtipo A del VRS se muestran en los paneles superiores y los datos del subtipo B del VRS se muestran en los paneles inferiores. La Figura 2 es una tabla donde se muestran los resultados de un estudio comparativo del ensayo qRT-PCR con el ensayo cualitativo RVP de GenMark Diagnostics. Los datos que se muestran representan los resultados de las reacciones qRT-PCR que se hicieron en triplexado.

La Figura 3 presenta las tablas donde aparece un panel a efectos comparativos para el ensayo qRT-PCR multiplexado. Los datos son el resultado de diluciones seriadas 10 veces, muestras por triplicado de la carga viral conocida, reportados en copias/mL. La VL (carga viral) conocida se refiere a la carga viral detectada utilizando un ensayo uniplexado, y MGB triplexado se refiere al ensayo qRT-PCR multiplexado donde el subtipo A del VRS, el subtipo B del VRS y el control pueden detectarse en el mismo ensayo. Los datos demuestran que no hay pérdida de sensibilidad en la reacción multiplexada.

La Figura 4 es un diagrama esquemático del vector de clonación pCR®4-TOPO y el sitio de clonación para el producto de amplificación producido utilizando cebadores universales que amplifican la región N del VRS A2 y el VRS B1.

La Figura 5 muestra las pantallas de entrada y salida de la calculadora en línea utilizada para determinar el número de copias del virus VRS.

La Figura 6A es un gráfico de control de calidad de la secuenciación Illumina MiSeq® de una cepa aislada de VRSh, donde se muestra que la puntuación Q es superior a 30 en todas las lecturas. La Figura 6B es un gráfico de control de calidad que muestra que más del 99% de las lecturas se corresponden con el genoma de referencia con una distribución uniforme de las longitudes de las lecturas e insertos. Se detectaron variantes menores utilizando umbrales del 3-10%, con datos acompañantes sobre cada codón variante, aminoácido y frecuencia. La Figura 7A es un diagrama esquemático que muestra las ubicaciones relativas de los cebadores de secuenciación utilizados para secuenciar el ORF F del VRS utilizando la secuenciación Sanger. La Figura 7B es un árbol según el método *neighbor joining* de las muestras de VRS A y VRS B derivadas del análisis Illumina MiSeq®.

Descripción

Se proporcionan métodos de ensayo y composiciones de la reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa multiplexada cuantitativa (qRT-PCR) para el uso en estos métodos. Los métodos presentes proporcionan un ensayo sensible y específico para la determinación de la carga viral, el genotipo del VRS o ambos en una muestra biológica.

En determinadas realizaciones, los métodos usan cebadores universales de amplificación de VRS para amplificar la secuencia deseada de ambos subtipos A y B del VRS en presencia de sondas específicas del subtipo A del VRS etiquetadas diferencialmente y de sondas específicas del subtipo B del VRS que se utilizan para distinguir entre cada cepa del VRS. Estos métodos qRT-PCR pueden ser ensayos multiplexados que empleen cebadores universales de amplificación del VRS y sondas específicas del subtipo A y del subtipo B del VRS etiquetadas diferencialmente. Estos métodos permiten la cuantificación de la carga viral del VRS y la determinación del subtipo del VRS (A o B).

Por ejemplo, en el presente documento se proporcionan métodos para determinar simultáneamente la carga viral y el genotipo de un virus respiratorio sincitial (VRS) en una muestra biológica. Los métodos incluyen los pasos de a) amplificar una secuencia de ácido nucleico que codifica un marco abierto de lectura (ORF) del VRS en una muestra biológica utilizando una serie de cebadores que amplifican específicamente un ORF del subtipo A del VRS y un ORF del subtipo B del VRS y al menos dos sondas de ácido nucleico en un ensayo cuantitativo de reacción en cadena de la polimerasa, donde al menos una sonda se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo A del VRS y al menos una sonda se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo B del VRS, y donde al menos dos sondas de ácido nucleico están etiquetadas diferencialmente, donde la amplificación comprende la transcripción inversa y la amplificación cuantitativa por PCR en tiempo real, donde la serie de cebadores comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:1, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:1, y una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:2, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:2, y donde la sonda que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo A del VRS comprende la SEQ ID NO:3, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:3, y la sonda que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo B del VRS comprende la SEQ ID NO:4, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:4; y b) determinar la carga viral y el subtipo o subtipos de VRS presentes en la muestra biológica. Este método también se puede utilizar para diagnosticar a un sujeto con infección por VRS o para determinar la eficacia de un tratamiento o vacuna contra el VRS.

Tal como se usa aquí, "una serie de cebadores universales" es una serie de cebadores de ácido nucleico que puede amplificar específicamente un ácido nucleico del subtipo A del VRS (VRS A) y/o del subtipo B del VRS (VRS B), si una molécula de ácido nucleico VRS A y/o VRS B está presente en la muestra biológica. En los métodos que se proporcionan aquí, la serie de cebadores universales puede incluir un par de cebadores de ácido nucleico que amplifican específicamente una región de la proteína de la nucleocápside (N) del VRS A y del VRS B. La serie de cebadores universales que amplifican específicamente una región de la proteína de la nucleocápside (N) del VRS A y del VRS B incluye una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:1 o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO: 1, y una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:2 o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:2. En otro aspecto de la divulgación, otros cebadores que pueden utilizarse incluyen, entre otros, un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:34 (RGAAATGAAATTYGAAGTRTTAAC) y un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:35 (GARTCATGCCTRTATTCTGGAGC).

Tal como se usa aquí, el término "cebador" se refiere a un oligonucleótido que puede iniciar la síntesis de 5' a 3' de un producto de extensión del cebador que es complementario a una cadena de ácido nucleico. En los métodos proporcionados aquí, la serie de cebadores contiene un cebador directo y un cebador inverso.

Tal como se usa aquí, el término "sonda" se refiere a un oligonucleótido que forma una estructura híbrida con una secuencia diana, por ejemplo, una secuencia del VRS A o del VRS B, contenida en una muestra biológica, debido a la complementariedad de al menos una secuencia de la sonda con la secuencia diana. Los nucleótidos de cualquier sonda particular pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y/o análogos de nucleótidos sintéticos. Los ejemplos de sondas de ácido nucleico que pueden utilizarse en los métodos aquí descritos incluyen, entre otros, una sonda de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:3 o la SEQ ID NO:36 (GCAAGCT-TAACAACTGAAATTCAAATCA) que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo A del VRS y una sonda de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:4 o la SEQ ID NO:37 (TCAAGCTTGACATCAGAAATACAAGTCAAT) que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo B del VRS.

Tal como se usa aquí, el término "complementario" o "complementariedad" se refiere al emparejamiento de bases entre nucleótidos o ácidos nucleicos. Los ejemplos incluyen el emparejamiento de bases entre un cebador oligonucleótido y un sitio de unión del cebador en un ácido nucleico de hebra simple a secuenciar o amplificar y el emparejamiento de bases entre una sonda y una secuencia de ácido nucleico diana.

Los nucleótidos complementarios son, generalmente, adenina (A) y timina (T) (o A y uracilo (U)), y guanina (G) y citosina (C). Se entiende que las longitudes específicas de las secuencias de nucleótidos que aquí se proporcionan son a modo de ejemplo y no limitantes. Además, las secuencias que cubren las mismas posiciones o lugares dentro de una secuencia del VRS, por ejemplo, las posiciones de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína N del VRS o la proteína F del VRS, pero que tienen un número menor o mayor de bases en comparación con las secuencias de cebadores o sondas proporcionadas en el presente documento, también se contemplan aquí siempre que las secuencias hibriden en los mismos lugares de la secuencia diana del VRS A y/o del VRS B que las secuencias descritas. Aquellos expertos en la materia apreciarán que los ácidos nucleicos no requieren una complementariedad del 100% para hibridarse. Por lo tanto, las secuencias de sonda y cebador que tengan una identidad de aproximadamente el 80%, el 85%, el 90% o el 95% con las secuencias de la sonda y el cebador que se aportan aquí también pueden utilizarse en los métodos que se en este documento.

En los métodos aquí establecidos, hay numerosos métodos en la técnica para determinar la carga viral. Por ejemplo, y entre otros, se puede utilizar la qRT-PCR para cuantificar la cantidad de virus VRS, es decir, la carga viral, la cantidad de virus o el título viral, en una muestra biológica. Los métodos de la qRT-PCR para determinar la carga viral son conocidos en la técnica. (ver por ejemplo, Payungporn et al. "Single step multiplex real-time RT-PCR for H5N 1 influenza A virus detection." J Virol Methods. 22 de septiembre de 2005; Landolt et al. "Use of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction assay and cell culture methods for detection of swine influenza A viruses" Am J Vet Res. enero de 2005; 66(1):119-24). Aquellos expertos en la materia entienden que la RT-PCR evalúa la cinética de amplificación, que se basa en el número de copias de la plantilla inicial. La métrica es Ct, que significa umbral de ciclo. Ct es una medida relativa de la concentración de la diana en la reacción de PCR que representa el ciclo de amplificación computado en el punto en el que la detección del fluoróforo liberado supera estadísticamente la señal del fluoróforo de fondo (el punto de inflexión de la generación de la señal del fluoróforo). En otras palabras, Ct es el número de ciclos necesarios para que la señal fluorescente traspase el umbral, es decir, que supere el nivel de fondo. Un experto en la materia sabría cómo establecer valores de corte Ct para la positividad, así como generar curvas estándar para la cuantificación de la carga viral. Otros métodos incluyen, entre otros, la PCR digital y la amplificación isotérmica mediada por bucle de transcripción (LAMP). Estos y otros métodos desarrollados en el futuro para la amplificación y la detección de ácidos nucleicos pueden utilizarse en los métodos facilitados en este documento.

En los métodos aquí establecidos, las secuencias del VRS en la muestra biológica pueden transcribirse inversamente antes de la amplificación. De forma alternativa, las secuencias del VRS en la muestra biológica pueden ser transcritas inversamente y amplificadas en un solo paso.

Al utilizar sondas etiquetadas diferencialmente para el VRS A y el VRS B, la producción de productos de amplificación durante cada ciclo de la reacción de PCR puede monitorizarse, permitiendo así la discriminación entre múltiples genotipos virales y la cuantificación de cada genotipo. En los métodos aquí descritos, las sondas y/o los cebadores pueden estar etiquetados. Las etiquetas incluyen átomos y moléculas que se unen a un ácido nucleico con el fin de producir una señal que sea detectable y cuantificable por fluorescencia, quimioluminiscencia, radiactividad, colorimetría, espectrometría de masas, difracción de rayos X, absorción, magnetismo, actividad enzimática y similares. Algunos ejemplos de etiquetas son los fluoróforos, cromóforos, átomos radiactivos, enzimas y ligandos que tienen parejas de unión específicas.

Por ejemplo, y entre otros, las sondas se pueden etiquetar con fracciones fluorescentes donantes y con las receptoras correspondientes. Entre los ejemplos de fracciones donantes fluorescentes se incluyen, entre otras, los colorantes fluorescentes FAMTM, VIC[®] y NEDTM. Entre los ejemplos de fracciones receptoras fluorescentes se incluyen, entre otras, BHQ[®] y ZENTM. Estas y otras fracciones fluorescentes para el uso en la RT-PCR son conocidas por los expertos en la materia y están disponibles a través de numerosas fuentes comerciales.

Como se ha establecido antes, los métodos que se aportan aquí pueden incluir opcionalmente la amplificación y la detección de un control de recuperación. Por ejemplo, los métodos proporcionados aquí pueden incluir una serie de cebadores que amplifican específicamente una región MS2 bacteriófaga y una sonda de ácido nucleico que se une específicamente a un ácido nucleico M2 bacteriófago. Los ejemplos de cebadores que pueden utilizarse para amplificar una región MS2 incluyen una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:30 y una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:31. Un ejemplo de una sonda que se puede utilizar para detectar un ácido nucleico MS2 se establece en este documento como SEQ ID NO:5.

Un control de recuperación puede incluir una molécula de ácido nucleico de un origen diferente al de una molécula de VRS. Por ejemplo, un control de recuperación puede incluir un ácido nucleico de un virus o bacteriófago diferente, como MS2. Un experto en la materia sabría cómo diseñar cebadores que amplifiquen específicamente un producto de amplificación de control y sondas que detecten específicamente el producto de amplificación de control de recuperación. Los métodos que se proporcionan en el presente documento también pueden incluir muestras separadas que incluyan una o más muestras de control positivo que incluyan secuencias de VRS A y/o de VRS B.

Cualquiera de los métodos de determinación de la carga viral y/o subtipo(s) de VRS descritos aquí puede comprender además la amplificación del marco abierto de lectura F del VRS en una muestra biológica y b) la secuenciación del producto de amplificación. A continuación se indican los métodos, los cebadores para la amplificación y los cebadores para la secuenciación de los marcos abiertos de lectura F del VRS A y del VRS B. Por lo tanto, la secuenciación de la proteína F del VRS se puede utilizar para confirmar los subtipos identificados en los métodos que se aportan aquí.

Tal como se usa aquí, una muestra biológica es una muestra derivada de un sujeto como un mamífero o un ser humano e incluye, entre otros, cualquier fluido biológico, incluido un fluido corporal. Los ejemplos de fluidos corporales incluyen, entre otros, sangre total, plasma, suero, orina, saliva, fluido ocular, ascitis, esputo, hisopos de garganta, lavados de garganta, hisopos nasales, muestras del tracto respiratorio inferior, una muestra de heces, líquido cefalorraquídeo, infiltrado tisular, efusiones pleurales, fluido de lavado pulmonar y similares. El fluido biológico incluye un medio de cultivo celular o sobrenadante de células cultivadas del sujeto. El término "sujeto", que se utiliza a lo largo de todo el documento, se refiere a un individuo. Preferiblemente, el sujeto es un mamífero, como un primate, y, más preferiblemente, un humano de cualquier edad, incluido un recién nacido o un niño. Los primates no humanos también son sujetos. El término sujeto incluye animales domésticos, como gatos, perros, etc., ganado (por ejemplo, ganado vacuno, caballos, cerdos, ovejas, cabras, etc.) y animales de laboratorio (por ejemplo, hurones, chinchillas, ratones, conejos, ratas, jerbos, conejillos de indias, etc.). Por lo tanto, se contemplan aquí los usos veterinarios.

También se proporcionan métodos para diagnosticar una infección por VRS en un sujeto. Los métodos incluyen los pasos de a) amplificar una secuencia de ácido nucleico que codifica un ORF del VRS en una muestra biológica utilizando una serie de cebadores que amplifican específicamente un ORF del subtipo A del VRS y/o un ORF del subtipo B del VRS y al menos dos sondas de ácido nucleico en un ensayo cuantitativo de reacción en cadena de la polimerasa, donde al menos una sonda se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo A del VRS y al menos una sonda se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo B del VRS, y donde al menos dos sondas de ácido nucleico están etiquetadas diferencialmente, y b) determinar la carga viral y el subtipo o subtipos de VRS presentes en la muestra biológica, diagnosticando así a un sujeto con una infección por VRS.

Fármacos antivirales como ribavirina, motavizumab, palivizumab (Synagis®), GS1, GS-5806 (Ver Jordan et al. "Antiviral Efficacy of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Fusion Inhibitor in a Bovine Model of RSV Infection," 59 (8): 4889-4900 (2015), particularmente en lo que se refiere a las estructuras y actividades de GS1 y GS-5806.), VP 14637 y JNJ-2408068 (Ver Douglas et al. "Small Molecules VP-1637 and JNJ-2408068 Inhibit Respiratory Syncytial Virus Fusion by Similar Mechanisms," 49(6):2460-2466 (2005), particularmente en lo que se refiere a las estructuras y actividades de VP14637 y JNJ-2408068) puede utilizarse para tratar las infecciones por el VRS. Tal como se usa aquí, los términos tratamiento, tratar o tratarse se refieren a un método para reducir los efectos de una enfermedad o condición o síntoma de la enfermedad o condición. Por lo tanto, en los métodos descritos, el tratamiento puede referirse a una reducción del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100% en la gravedad de una enfermedad o condición establecida o síntoma de la enfermedad o condición. Por ejemplo, se considera que un método para tratar una enfermedad es un tratamiento si hay una reducción de aproximadamente el 10% de uno o más síntomas de la enfermedad en un sujeto en comparación con un control. Un sujeto de control puede ser un sujeto que no ha sido tratado por una infección por VRS. Por lo tanto, la reducción puede ser de aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, o cualquier reducción porcentual entre el 10% y el 100% en comparación con los niveles nativos o de control. Se entiende que el tratamiento no se refiere necesariamente a la curación o ablación completa de la enfermedad, la condición o los síntomas de la enfermedad o condición.

También se proporcionan métodos para determinar la eficacia de una terapia para la infección por VRS en un sujeto. Los métodos pueden incluir a) amplificar una secuencia de ácido nucleico que codifica un ORF del VRS en una primera muestra biológica del sujeto utilizando una serie de cebadores que amplifican específicamente un ORF del subtipo A del VRS y/o un ORF del subtipo B del VRS y al menos dos sondas de ácido nucleico en un ensayo cuantitativo de reacción en cadena de la polimerasa, donde al menos una sonda se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo A del VRS y al menos una sonda se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo B del VRS, y donde al menos dos sondas de ácido nucleico están etiquetadas diferencialmente; b) determinar la carga viral y el subtipo o subtipos de VRS presentes en la primera muestra biológica; c) amplificar una secuencia de ácido nucleico que codifica un ORF del VRS en una segunda muestra biológica del sujeto utilizando una serie de

cebadores que amplifican específicamente un ORF del subtipo A del VRS y/o un ORF del subtipo B del VRS y al menos dos sondas de ácido nucleico en un ensayo cuantitativo de reacción en cadena de la polimerasa, donde el sujeto ha recibido al menos un tratamiento con una primera terapia para la infección por VRS, donde al menos una sonda se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo A del VRS y al menos una sonda se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo B del VRS, y donde al menos dos sondas de ácido nucleico están etiquetadas diferencialmente; d) determinar la carga viral y el subtipo o subtipos de VRS presentes en la segunda muestra biológica; e) comparar la carga viral y/o los subtipos de VRS de la primera muestra biológica con la carga viral y/o los subtipos de VRS de la segunda muestra biológica, en el que una disminución en la carga viral y/o un cambio en los subtipos en la segunda muestra biológica en comparación con la carga viral y/o los subtipos en la primera muestra biológica indica que el tratamiento es efectivo y donde un aumento o la ausencia de cambio en la carga viral y/o la ausencia de cambio en los subtipos en comparación con la carga viral y/o el subtipo o los subtipos en la primera muestra biológica indica que el tratamiento es ineficaz, donde la serie de cebadores comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:1, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:1, y una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:2, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:2, y donde la sonda que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo A del VRS comprende la SEQ ID NO:3, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:3, y la sonda que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo B del VRS comprende la SEQ ID NO:4, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:4, donde la amplificación de la secuencia de ácido nucleico comprende la transcripción inversa y la amplificación cuantitativa por PCR en tiempo real, y opcionalmente donde la transcripción inversa y la amplificación cuantitativa en tiempo real, se producen en un solo paso.

Los métodos para determinar la eficacia de una terapia también pueden utilizarse durante el tratamiento. Por ejemplo, se puede obtener una primera muestra biológica del sujeto después del primer tratamiento para una infección por el VRS y se puede obtener una segunda muestra biológica del sujeto después del segundo tratamiento para una infección por el VRS con el fin de determinar la diferencia en la carga viral y/o la cantidad de un subtipo(s) de VRS, si lo hubiera, entre la primera y la segunda muestra biológica. De forma similar, se puede obtener una primera muestra biológica del sujeto después del segundo tratamiento para una infección por el VRS y se puede obtener una segunda muestra biológica del sujeto después del tercer tratamiento para una infección por el VRS con el fin de determinar la diferencia en la carga viral y/o la cantidad de un subtipo o subtipos de VRS, si lo hubiera, entre la segunda y la tercera muestra biológica.

La disminución de la carga viral no tiene que ser completa, ya que esta disminución puede ser una reducción de un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o del 100% de la carga viral. La disminución de la carga viral también puede ser una disminución de $\log_{10}$, por ejemplo, una disminución de 3 log, una disminución de 4 log, una disminución de 5 log, o superior. Si hay un aumento o no se produce ningún cambio en la carga viral, el tipo, dosificación y/o frecuencia de la terapia se pueden modificar para el sujeto.

Además, como un aspecto de la divulgación, se proporcionan métodos para determinar la eficacia de una vacuna del VRS en un sujeto. Los métodos incluyen a) administrar una vacuna del VRS a un sujeto; b) contactar con el sujeto con un virus VRS; b) amplificar una secuencia de ácido nucleico que codifica un ORF del VRS en una muestra biológica del sujeto vacunado utilizando una serie de cebadores que amplifican específicamente un ORF del subtipo A del VRS y/o un ORF del subtipo B del VRS y al menos dos sondas de ácido nucleico en un ensayo cuantitativo de reacción en cadena de la polimerasa, donde al menos una sonda se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo A del VRS y al menos una sonda se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo B del VRS, y donde al menos dos sondas de ácido nucleico están etiquetadas diferencialmente; c) determinar la carga viral y el subtipo o subtipos de VRS presentes en la muestra biológica; y d) comparar la carga viral y/o los subtipos de VRS de la muestra biológica con la carga viral y/o los subtipos de VRS de una muestra de control, donde la muestra de control procede de un sujeto que ha entrado en contacto con el virus VRS y no ha sido vacunado con la vacuna del VRS, en la que una disminución de la carga viral y/o un cambio en el o los subtipos en la muestra biológica en comparación con la carga viral y/o el o los subtipos en la muestra de control indica que la vacuna es protectora y en el que un aumento o ningún cambio en la carga viral y/o ningún cambio en el o los subtipos en comparación con la carga viral y/o el o los subtipo(s) en la primera muestra biológica indica que la vacuna no es protectora.

La protección no tiene por qué ser completa, ya que la disminución de la carga viral puede consistir en una reducción de un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o un 100% de la carga viral. La disminución de la carga viral también puede ser una disminución de $\log_{10}$, por ejemplo, una disminución de 3 log, una disminución de 4 log, una disminución de 5 log, o superior.

Los métodos para determinar la eficacia de una terapia para la infección por el VRS o la eficacia de una vacuna contra el VRS pueden comprender además los pasos de determinar la secuencia del marco abierto de lectura F del VRS a partir de la muestra biológica antes del tratamiento, determinar la secuencia del marco abierto de lectura F del VRS después del tratamiento y comparar las secuencias. Si se producen cambios en la secuencia después del tratamiento, por ejemplo, mutaciones asociadas con la resistencia a una terapia determinada, esto indicaría que el sujeto podría desarrollar una resistencia a la terapia. Estos cambios en la secuencia de la proteína F pueden supervisarse en el sujeto a medida que avanza el tratamiento. El tipo, dosificación y/o frecuencia de la terapia se pueden modificar para el sujeto en función de los cambios en la secuencia de ácido nucleico de la proteína F.

Secuenciación de aislados de VRS

Se aportan métodos para la secuenciación de aislados de VRS como un aspecto de la divulgación. Más específicamente, en el presente documento se proporcionan métodos para amplificar y secuenciar el marco abierto de lectura (ORF) de la proteína F del VRS del subtipo A del VRS y/ del subtipo B del VRS. Algunos métodos incluyen los pasos de a) amplificar una secuencia de ácido nucleico que codifica un marco abierto de lectura F del VRS en una muestra biológica utilizando una serie de cebadores que comprende la SEQ ID NO:6 y la SEQ ID NO:7; y b) secuenciar el producto de amplificación utilizando uno o más cebadores seleccionados del grupo compuesto por la SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19. La secuenciación cíclica es un método en el que rondas sucesivas de PCR (desnaturalización, hibridación y extensión) en un termociclador producen una amplificación lineal de los productos de extensión que posteriormente se cargan en un gel o se inyectan en un capilar para el análisis secuencial. Como se establece en los Ejemplos, el marco abierto de lectura F del VRS se transcribe inversamente antes de la amplificación. Después de la amplificación del marco abierto de lectura F del VRS, se puede realizar la secuenciación completa con diez cebadores superpuestos por subtipo.

También se proporcionan, como un aspecto de la divulgación, los métodos para amplificar y secuenciar el marco abierto de lectura (ORF) de una proteína F del VRS incluyendo los pasos de a) amplificar una secuencia de ácido nucleico que codifica un marco abierto de lectura F del VRS en una muestra biológica utilizando una serie de cebadores que comprende la SEQ ID NO:8 y la SEQ ID NO:9; y b) secuenciar el producto de amplificación utilizando uno o más cebadores seleccionados del grupo compuesto por la SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28 y la SEQ ID NO:29. Como se establece en los Ejemplos, el marco abierto de lectura F del VRS se transcribe inversamente antes de la amplificación. Después de la amplificación del marco abierto de lectura F del VRS, se puede realizar la secuenciación completa con diez cebadores superpuestos por subtipo.

En los métodos de secuenciación aportados aquí, el producto de la amplificación se puede secuenciar utilizando cualquier método, incluyendo, entre otros, la secuenciación cíclica, la secuenciación Maxam-Gilbert, la secuenciación Sanger, la secuenciación de nueva generación, y similares. Por lo tanto, en algunas realizaciones, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica un marco abierto de lectura F del VRS en una muestra biológica se amplifica utilizando una serie de cebadores que comprende la SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:7 o una serie de cebadores que comprende la SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:9, y el producto de amplificación es secuenciado por el análisis de secuenciación de nueva generación.

Sondas y kits

Se proporcionan sondas de ácido nucleico para la detección del genotipo de un VRS. En algunas realizaciones, las sondas comprenden la SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:4. En otras realizaciones, las sondas comprenden la SEQ ID NO:36 o SEQ ID NO:37. Se proporciona métodos para utilizar una o más de estas sondas para la detección del genotipo de un VRS en una muestra biológica.

También se proporciona un kit para la detección de la carga viral y el genotipo de un VRS en una muestra biológica que comprende una serie de cebadores de ácido nucleico que amplifica específicamente la región N del subtipo de VRS A (VRS A) y el subtipo de VRS B (VRS B), una sonda de ácido nucleico que se une específicamente a un ácido nucleico del VRS A y una sonda de ácido nucleico que se une específicamente a un ácido nucleico del VRS B. Por ejemplo, el kit puede incluir un cebador de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:1 y un cebador de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:2 para la amplificación de la región N de los subtipos de VRS A y el VRS B así como una sonda que comprende la SEQ ID NO:3 que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del VRS A y una sonda que comprende la SEQ ID NO:4 que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del VRS B. En otra realización, el kit puede incluir un cebador de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:34 y un cebador de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:35 para la amplificación de la región N de los subtipos de VRS A y el VRS B así como una sonda que comprende la SEQ ID NO:36 que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del VRS A y una sonda que comprende la SEQ ID NO:37 que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del VRS B. Opcionalmente, los cebadores y/o las sondas pueden estar etiquetados con diferentes etiquetas detectables.

También se proporciona, como un aspecto de la divulgación, un kit para la amplificación y secuenciación de un ORF F del VRS. El kit incluye un cebador de amplificación que comprende la SEQ ID NO:6 y un cebador de amplificación que comprende la SEQ ID NO:7. El kit puede incluir además uno o más cebadores seleccionados del grupo compuesto por la SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19. Opcionalmente, uno o más de los cebadores pueden estar etiquetados con las mismas etiquetas detectables u otras diferentes. Opcionalmente, el kit comprende además reactivos para aislar y/o secuenciar el ADN de la muestra.

También se proporciona, como un aspecto de la divulgación, un kit para la amplificación y secuenciación de un ORF F del VRS. El kit incluye un cebador de amplificación que comprende la SEQ ID NO:8 y un cebador de amplificación que comprende la SEQ ID NO:9. El kit puede incluir además uno o más cebadores seleccionados del grupo compuesto por la SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:29. Opcionalmente, uno o más de los cebadores pueden estar etiquetados

con las mismas etiquetas detectables u otras diferentes. Opcionalmente, el kit comprende además reactivos para aislar y/o secuenciar el ADN de la muestra. Se describen materiales y composiciones que se pueden utilizar para, se pueden utilizar junto con, se pueden utilizar en la preparación de, o son productos de los métodos y composiciones divulgados. Estos y otros materiales se describen en este documento, y se entiende que cuando se describen combinaciones, subconjuntos, interacciones, grupos, etc., de estos materiales que aunque puede que la referencia específica de cada una de las diversas combinaciones y permutaciones individuales y colectivas de estos compuestos no esté explícitamente descrita, cada una de ellas está específicamente contemplada y descrita en este documento. Por ejemplo, si se divulga y comenta un método y se habla de un número de modificaciones que se pueden hacer a un número de moléculas incluyendo el método, todas y cada una de las combinaciones y permutaciones del método, y las modificaciones que son posibles se contemplan específicamente, salvo que se indique específicamente lo contrario. Del mismo modo, también se contempla y divulga específicamente cualquier subconjunto o combinación de estas. Este concepto se aplica a todos los aspectos de esta divulgación, incluyendo, entre otros, los pasos de los métodos que utilizan las composiciones descritas. Por lo tanto, si hay una variedad de pasos adicionales que pueden realizarse, se entiende que cada uno de estos pasos adicionales puede realizarse con cualquier paso de método específico o combinación de pasos de método de los métodos descritos, y que cada una de dichas combinaciones o subconjuntos de combinaciones está específicamente contemplada y debe considerarse divulgada y descrita.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos no limitativos pretenden ilustrar ciertas realizaciones y/o características de las composiciones y métodos, y complementar cualquier descripción de las composiciones y métodos. Cualquier ejemplo que no se encuentre dentro del alcance de las reivindicaciones se proporciona con fines comparativos.

Ejemplo 1

Purificación del ácido nucleico total

Los ácidos nucleicos se purificaron del VRS a partir de muestras biológicas utilizando el sistema NucliSENS easyMAG® de Bioerieux. Los materiales para la purificación del ácido nucleico incluían los siguientes:

- Instrumento NucliSENS easyMag
- Tampones de lavado 1, 2, 3 easyMag
- Tampón de lisis easyMag
- Sílice magnética easyMag
- Muestras respiratorias (~200 ml)

La purificación del ácido nucleico se realizó de la manera siguiente. Se equilibraron 22 muestras a temperatura ambiente en un banco de flujo laminar. Se encendió la unidad NucliSENS easyMAG antes de entrar en el software. Se preparó una serie del modo siguiente: se seleccionó el tipo de muestra (otros), se seleccionó el protocolo de extracción (Generic 2.0.1), se seleccionó el volumen de la muestra (200 µl), se seleccionó el volumen de elución de cada muestra (50 µl), y se seleccionó el tipo de lisis (on-board).

Se identificaron las muestras a procesar. Se pulsó en el primer icono de la derecha para elegir si la lisis de incubación la realizaría el instrumento NucliSens easyMAG o de forma externa ('on board' u 'off board'). Para la incubación con sílice, se seleccionó 'on board'. Se seleccionaron todas las muestras y se seleccionó "Añadir muestras seleccionadas para analizar". El código de barras de los reactivos se introdujo con el lector pulsando primero en el código de barras de la máquina y luego en el frasco. A continuación, se colocaron 200 µl de muestra en cada pocillo de un cartucho de plástico desechable (de 8 pocillos) en el banco de flujo laminar. Se instalaron tres desechables y sus peines de aspiración en el instrumento escaneando primero el código de barras de la posición y luego el código de barras del desechable. Se añadieron 10 µl de control interno MS2 por cada pocillo de desechable. Se inició el suministro de tampón de lisis.

El protocolo de extracción para la lisis off-board se realizó utilizando el protocolo estándar de extracción de ácido nucleico total de NucliSens easyMAG. Los hisopos secos se volvieron a suspender añadiendo 1.500 µL del tampón de suspensión (Tampón de lisis easyMAG, UTM, solución salina, tampón AVE, o RNAlater). Todas las muestras se agitaron enérgicamente durante 15 segundos al menos tres veces. Una parte del sobrenadante se utilizó para la extracción del ácido nucleico. El sobrenadante restante se transfirió a un tubo de microcentrifugado de 2 µL para su almacenamiento a largo plazo. El volumen de entrada de la muestra para la extracción de ácido nucleico fue de 500 µL con una salida de elución de 100 µL. Durante la fase de lisis, se combinaron 550 µl de ddH₂O libre de ARNasa con 550 µl de sílice magnética y se mezclaron a fondo. A continuación, se añadieron 125 µl de sílice por pocillo y se mezclaron con una pipeta multicanal. Se inició el procedimiento de extracción, y los ácidos nucleicos extraídos se recogieron a la media hora siguiente tras finalizar la prueba. Los ácidos nucleicos extraídos se transfirieron a tubos estériles de 1,5 ml que se utilizaron directamente o se almacenaron a -80 °C.

Ejemplo 2

Determinación de la secuencia de consenso para el marco abierto de lectura del VRS N

Se obtuvieron secuencias de consenso basadas en los 100 mejores resultados para las secuencias de referencia ORF (marco abierto de lectura) de un VRS A2 y B1 N. Ambas secuencias de consenso se establecen a continuación.

ATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGTTGAAYGATACACTCAACAAAGATCAACTTCTGTCA
TCCAGCAAATACACCATCCAACGGAGCACAGGAGAYAGYATTGAYACTCCTAATTA
TGATGTGCAGAAACACATCAAYAAGYTATGTGGCATGTTATTAATCACAGAAGATG

Consenso ORF de VRS A2 N (SEQ ID NO:33)

CTAATCATAAATTCAGTGGGKTAATAGGTATGTTATATGCTATGTCTAGATTAGGAA
GAGAAGACACCATAAAAATACTCARAGATGCDGGATATCATGTAAAAGCWAATGG
AGTGGATGTAACAACACATCGTCAAGAYATTAATGGRAAAGAAATGAAATTTGAAG
TGTTAACATTRGCAAGCTTAACAAGTAAATCAACATTGAGATAGAATCTA
GRAAATCCTACAAAAAATGCTAAAAGAAATGGGAGAGGTRGCTCCAGAATACAGG
CATGACTCWCCTGATTGTGGRATGATAATATTATGTATAGCRGCATTAGTAATAACC
AAATTAGCAGCAGGGGATAGATCTGGTCTTACAGCYGTRATTAGGAGAGCTAATAA
TGTCTAAAAAATGAAATGAAACGTTATAAAGGCTTACTACCHAAGGATATAGCHA
ACAGYTTCTATGAAGTGTGAAAAATATCCTCACTTTATAGATGTTTTTGTTCATTT
TGGTATAGCACAAATCTTCTACCAGAGGTGGCAGTAGAGTTGAAGGGATTTTTGCAGG
ATTGTTTATGAATGCCTATGGTGCAGGGCAAGTGATGTTACGGTGGGRGTCTTAGCA
AAATCAGTTAAAAATATTATGYTAGGACACGCTAGTGTGCAAGCAGAAATGGAACA
AGTTGTGGARGTDTATGAATATGCCCAAAAATTGGGTGGAGAAGCAGGATTCTACC
ATATATTGAAYAACCCAAAAGCATCATTATTATCTTTGACTCAATTYCCYCACTTCTC
YAGTGTAGTATTRGGCAATGCTGCTGGCCTAGGCATAATGGGAGAATACAGAGGTA
CACCAAGGAATCAAGATCTATATGATGCTGCDAAAGCATATGCTGAACAACTCAAA
GAAAATGGTGTGATTAACACAGTGTATTAGACTTGACAGCAGAAGAAGTACAGGC
TATCAAACATCAGCTTAATCCAAAAGATAATGATGTAGAGCTTTGA

5

Consenso ORF de VRS B1 N (SEQ ID NO:34)

ATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGTTAATGATACATTAATAAGGATCAGCTGCTGTCA
TCCAGCAAATACACTATTCAACGTAGTACAGGAGATAATATTGACACTCCCAATTAT
GATGTRCAAAAAACACYTAAACAACTATGTGGTATGCTATTAATCACTGAAGATGC
AAATCATAAATTCACAGGATTAATAGGTATGYTATATGCTATGTCCAGGTTAGGAAG
GGAAGACACTATAAAGATACTTAAAGATGCTGGATATCATGTTAAAGCTAATGGAG
TAGATATAACAACATATCGTCAAGATATAAATGGAAAGGAAATGAAATTCGAAGTA
TTAACATTATCAAGCTTGACATCAGAAATACAAGTCAATATTGAGATAGAATCTAGA
AAGTCTACAAAAAATGCTAAAAGARATGGGAGAAGTGGCTCCAGAATATAGGCA
TGAYTCTCCAGACTGTGGGATGATAATACTRTGTATAGCWGCHCTTGTVATAACCA
ATTAGCAGCAGGAGAYAGATCAGGTCTYACAGCAGTAATTAGGAGRGCRACAATG
TCTTAAAAAACGAAATAAAACGHTACAAGGGCCTVATACCAAAGGAYATAGCYAAC
AGTTTTTATGAAGTGTGAAAAACACCCTCATCTTATAGATGTTTTYGTGCACTTTG
GCATTGCACAATCATCCACAAGAGGGGGTAGTAGAGTTGAAGGAATCTTTCAGGA
TTRTTTATGAATGCCTATGGTTCAGGRCAAGTAATGCTAAGATGGGGAGTTTTAGCC
AAATCTGTAAAAAATATCATGCTAGGWCATGCTAGTGTCCARGCAGAAATGGAGCA
AGTTGTDGAAGTCTATGAGTATGCACAGAAGTTGGGRGGAGAAGCTGGWTTCTACC
ATATATTGAACAATCCAAAAGCATCATTGCTGTCATTAACCTCAATTTCCYAACTTCTC
AAGTGTGGTCTAGGCAATGCAGCAGGYCTAGGCATAATGGGAGAGTATAGAGGTA
CACCAAGAAACARGATCTYTATGATGCWGCCAAAGCATATGCAGAGCAACTCAAA
GAAAATGGAGTAATAAACTACAGTGTATTAGACTTAACARCAGAAGAATTGGAAGC
CATAAAGMATCAACTCAACCCCAAGAAGATGAYGTAGAGCTYTAA

Ejemplo 3

Determinación del genotipo utilizando el ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

- 10 Se diseñaron cebadores que amplifican específicamente la región N de los subtipos de VRS A2 y VRS B1 utilizando las secuencias de consenso descritas. Las secuencias para estos cebadores (RSV499 y RSV636) se establecen a continuación en la Tabla 1. Los cebadores alternativos para amplificar específicamente la región N de los subtipos VRS A y VRS B son RSV322 y RSV458.

También se diseñó una sonda que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del VRS A (RSVA576) y una sonda que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del VRS B (RSVB576). Las sondas alternativas para unir específicamente las secuencias de ácido nucleico del VRS A o del VRS B son RSVA349 y RSVB349, respectivamente. Las secuencias para estas sondas se muestran en la Tabla 1.

- 5 Para el uso como controles, se diseñó un par de cebadores que amplifican una secuencia M2 (MS2F y MS2R) y una sonda que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico M2. Las secuencias para estos cebadores y esta sonda se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1 Secuencias para los cebadores y sondas del VRS y MS2 (control de recuperación)

RSV499	GTV ATA ACC AAA TTA GCA GC (SEQ ID NO: 1.
RSV636	CAC TTC ATA RAA RCT GTT DGC (SEQ ID NO:2)
RSV322	RGAAATGAAATTYGAAGTRTTAAC (SEQ ID NO:34)
RSV458	GARTCATGCCTRTATTCTGGAGC (SEQ ID NO:35)
RSVA576	VIC/TGA AAT GAA ACG TTA TAA AGG CTT AC/BHQ(SEQ ID NO:3)
RSVB576	FAM/CGA AAT AAA ACG HTA CAA GGG CCT VA/ZEN (SEQ ID NO:4)
RSVA349	VIC/GCAAGCTTAACAACCTGAAATTCAAATCAAC/BHQ (SEQ ID NO:36)
RSVB349	FAM/TCAAGCTTGACATCAGAAATACAAGTCAAT/ZEN (SEQ ID NO:37)
MS2F	TGT GGA GAG ACA GGG CAC TG (SEQ ID NO:30)
MS2R	CAG TTG BHQ (GCC ATA CGG ATT (SEQ ID NO:31)
MS2sonda	NED/TAA GGC CCA AAT CTC AGC CAT GCA TC/BHQ(SEQ ID NO:5)

- 10 Los materiales que se utilizaron para la cuantificación de la carga viral incluían muestras de ARN del VRS, un cebador y sondas (de 10 µM cada una), y Ag-Path ID One-Step RT-PCR de ThermoFisher (N.º de catálogo AM1005M).

- 15 La cuantificación de la carga del VRS se realizó de la manera siguiente. Las plantillas de ARN, los cebadores, las sondas y la mezcla de reacción 2x se descongelaron a temperatura ambiente y se colocaron inmediatamente en hielo una vez descongeladas. La enzima se conservó a -20 °C hasta que estuvo preparada para el uso. La mezcla maestra de RT-PCR se preparó en hielo utilizando el volumen de muestra siguiente:

Mezcla de reacción 2x	Volumen	Concentración final 12,5 µl
Cebador directo - VRS	0,5 µl	200 nM
Cebador inverso - VRS	0,5 µl	200 nM
Cebador directo - MS2	0,25 µl	100 nM
Cebador inverso - MS2	0,25 µl	100 nM
Sonda - RSVA/VIC	0,25 µl	100 nM
Sonda - RSVB/FAM	0,5 µl	200 nM
Sonda - MS2/NED	0,25 µl	100 nM
Agua	7,5 µl	
Mezcla de enzimas 25x	1,5 µl	
Total	25 µl (cuando se añade la plantilla de ARN de 1 ml)	

- 20 La mezcla maestra necesaria se alicuotó en cada tubo de PCR. Se añadió 1 ml de plantilla de ARN en su tubo designado y se utilizó agua como control negativo. Se cerraron las tapas y los tubos se sometieron a rotación rápida para recoger todos los líquidos. Los tubos se colocaron en el termociclador y se utilizaron las condiciones de reacción siguientes:

Reacción de RT (síntesis de cDNA)	50 °C	10 min
Inactivación de RT	95 °C	10 min
PCR 40 ciclos		
Desnaturalizar	95 °C	15 seg.
Hibridación	45 °C	45 seg.

El amplicón de la RT-PCR resultante de la amplificación con los cebadores RSV499 y RSV636 era de aproximadamente 137 bp. El ensayo qRT-PCR proporcionó la sensibilidad deseada en el rango dinámico 7 log₁₀; Límite inferior de detección (LLOD) ~100 copias. El ensayo también proporcionó la especificidad de subtipo deseada. Como se muestra en la Figura 1, el VRS A y el VRS B se pueden detectar y cuantificar en una reacción multiplexada.

Para determinar si el ensayo qRT-PCR podía proporcionar resultados de genotipado comparables a los ensayos cualitativos disponibles comercialmente, la realización de pruebas de las muestras de VRS se llevó a cabo con el presente ensayo qRT-PCR o con un ensayo cualitativo RVP de GenMark Diagnostics. Los resultados del estudio comparativo con el ensayo cualitativo RVP de GenMark Diagnostics se muestran en la Figura 2. Los datos que aparecen en las tablas son el resultado de reacciones que se realizaron por triplicado. La tabla de la izquierda muestra los resultados cuantitativos utilizando el ensayo qRT-PCR con dos muestras conocidas de VRS A (PC1_A y PC2_A), dos muestras conocidas del VRS B (PC1_B y PC2_B), y dos controles que no incluían una plantilla. Las cifras que se muestran son los valores Ct, que indican el número de copias presentes en la muestra. UND indica que no se ha detectado el tipo de VRS particular en la reacción. Los datos en las dos tablas de la derecha muestran los resultados cualitativos del ensayo qRT-PCR y el ensayo RVP de GenMark. Especialmente, una muestra de VRS pudo ser genotipada por el presente ensayo qRT-PCR, pero no fue detectada ni tipificada por el ensayo GenMark RVP.

Estos resultados muestran que se desarrolló con éxito una carga viral específica de VRS A y VRS B multiplexada y un ensayo de tipificación que incluye un control de recuperación. La precisión de la tipificación del VRS se confirmó en base a la concordancia con una prueba autorizada por la FDA, así como la secuenciación del gen F.

Se elaboró un panel a efectos comparativos para evaluar la sensibilidad del ensayo qRT-PCR multiplexado, y los resultados se muestran en la Figura 3. La figura presenta las tablas con datos que son el resultado de muestras por triplicado de la carga viral conocida, indicados en copias/mL. La VL conocida se refiere a la carga viral conocida detectada utilizando un ensayo uniplexado, y MGB triplexado se refiere al ensayo en el que las sondas del subtipo A, las sondas del subtipo B, y las sondas de control se incluyen en la misma reacción. Los datos demuestran que no hay pérdida de sensibilidad en la reacción multiplexada.

Ejemplo 4

Cuantificación de la carga viral

Hasta ahora, los kits de VRS disponibles comercialmente solo han sido cualitativos. Como se establece en el ejemplo siguiente, se desarrolló un ensayo qRT-PCR triplexado del VRS que cuantifica la carga viral del VRS (copias/ml), los subtipos para las cepas A/B del VRS y está formateado para detectar un control interno. La precisión de la cuantificación del ensayo qRT-PCR se analizó utilizando un control de transcripción in vitro (IVT). El amplicón de la RT-PCR resultante de los cebadores RSV499 y RSV636 descritos anteriormente se clonó en un plásmido. El amplicón se purificó con gel y se clonó según el protocolo del fabricante (ThermoFisher, N.º de catálogo K4575-02) en pCR®4-TOPO (Figura 4) para crear el plásmido pCR4-TOPO-RSVA2.N y el plásmido pCR4-TOPO-RSVB1.N. Estos vectores se utilizaron en un ensayo de transcripción in vitro, junto con el kit de transcripción ThermoFisher MEGAscript T7 (N.º de catálogo AM1334), el kit ThermoFisher MEGAclear (N.º de catálogo AM1908), y la enzima de restricción SpeI de New England BioLabs (Ipswich, MA).

Se midió la concentración de ADN de cada plásmido y se linealizaron 10 mg de cada plásmido utilizando las condiciones de digestión siguientes:

10 µg ADN	x µl
SpeI	5 µl
Tampón Cutsmart	10 µl
Agua	y µl
Total	100 µl

La linealización se verificó en un gel de agarosa al 1%. A continuación, se realizó el protocolo de purificación del gel utilizando columnas de centrifugado QIAquick (Qiagen). En el paso de elución, la elución se llevó a cabo con 23 µl de ddH₂O libre de RNasa del kit de transcripción MEGAscript T7 (opcional: precalentado a 55 °C). Los reactivos del kit MEGAscript T7 (tampón de reacción 10x, ribonucleótidos) se descongelaron, y la enzima T7 se mantuvo a -20°C. La mezcla maestra de nucleótidos y tampón de reacción se preparó utilizando el volumen de muestra siguiente:

A continuación, se distribuyeron 10 µl de la mezcla en tubos, y se añadieron 8 µl de la plantilla de ADN linealizada y 2 µl de enzima. La mezcla se pipeteó y se sometió a centrifugación (si era necesario). La reacción se incubó a 37 °C, durante 2 horas. Se añadió 1 µl de mezcla TURBO ADNsa, y la reacción se incubó durante 15 minutos a 37 °C. Mientras tanto, se calentó una parte de solución de elución a 95 °C. A continuación, se añadieron 80 µl de solución de elución (a temperatura ambiente) a cada tubo y se mezclaron por completo.

A continuación se transfirieron 100 µl de muestra a 350 µl de concentrado de solución aglutinante y se mezclaron por completo. Se añadió etanol (250 µl de una solución al 100%) de un nuevo frasco a cada muestra y se mezcló suavemente. A continuación, se añadieron 700 µl de la muestra a una columna (proporcionada en el kit) y se sometió a rotación a 13.000 RPM. El flujo continuo se descartó. La columna se lavó dos veces con una solución de lavado de 500 µl y se hizo girar de nuevo durante 4 minutos después del último lavado para eliminar todas las trazas de la solución de lavado. A continuación, se añadieron 50 µl de solución de elución (a temperatura ambiente) y 50 µl de solución de elución (calentada a 95 °C) y se incubaron en la columna durante 1 minuto. La elución se realizó haciéndola rotar a 13.000 RPM en un nuevo tubo de recogida. El ARN eluido se almacenó a -80 °C. Se evaluó la calidad del ARN (Kit Agilent RNA 6000 Nano, N.º de catálogo 5067-1511), y se determinó el producto (ThermoFisher NanoDrop 2000c) (Palo Alto, CA). El ARN tenía una longitud de aproximadamente 220 nucleótidos (nt).

Cálculo del número de copias

El número de copias de ARN se determinó utilizando la siguiente fórmula en la calculadora en línea que se indica abajo: $\text{copias} = (\text{ng} \times 6,022 \times 10^{23} / \text{mol}) / (\text{longitud} \times 1 \times 10^9 \text{ ng/g} \times 325 \text{ g/mol})$ La calculadora en línea se puede encontrar en: [ht-tp://www.endmemo.com/bio/dnacopynum.php](http://www.endmemo.com/bio/dnacopynum.php).

La cantidad de ARN purificado se midió en un ThermoFisher NanoDrop 2000c y se determinó que era de 499 µl para el transcrito de VRS A2 in vitro (IVT) y 584 ng/µl para el IVT del VRS B1.

La información siguiente se introdujo en la calculadora en línea utilizando la pantalla de entrada que aparece en la Figura 5:

Elegir opción 'ssRNA'

Longitud de la secuencia = 200 nt

Peso = 499 ng

Pulsar 'calcular'

Se preparó una serie de diluciones como se muestra a continuación:

$$(4.2 \times 10^{12} \text{ copias}/\mu\text{l})(x) = (5 \times 10^{10} \text{ copias}/\mu\text{l})(100 \mu\text{l})$$

$$x = (5 \times 10^{10} \text{ copias}/\mu\text{l}) / (4.2 \times 10^{12} \text{ copias}/\mu\text{l})$$

$$x = 1.2 \mu\text{l RSV A2 IVT} + 98.8 \mu\text{l RNAse-free ddH}_2\text{O}$$

Copias	Copias
--------	--------

A continuación, se hicieron diluciones seriadas 10 veces (para 1×10^2 , se hace 1:5 de 5×10^2). Los cálculos y las diluciones seriadas se repitieron para el IVT del VRS B1.

Ejemplo 5

Secuenciación de un ORF F del VRS

Las secuencias del VRS A y B se amplificaron utilizando PCR de transcripción inversa (RT-PCR). La secuencia de referencia del VRS A2 se puede encontrar en GenBank Accession N.º JX198138. La secuencia de referencia del VRS B1 se puede encontrar en

GenBank Accession N.º AF013254. Se diseñaron cebadores para la transcripción inversa y la amplificación del VRS A o VRS B, que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2 Cebadores de transcripción inversa de ORF del VRS:

cebador 5_RSV_A2 PCR	GGG CTC GAG ACC GGT TCT GGG GCA AAT AAC AAT GG (SEQ ID NO:6)
cebador PCR y/o 3_RSV_A2 RT	GGG TCT AGA ACG CGT TAG GTG CTA TTT TTA TTT AGT TAC (SEQ ID NO:7)
cebador 5_RSV_B1 PCR	GGG CTC GAG ACC GGT CCT GGG GCA AAT AAC CAT GG (SEQ ID NO:8)
cebador 3_RSV_B1 RT y/o PCR	GGG TCT AGA ACG CGT TCA GGT GGT TTT TTG TCT ATT TGC (SEQ ID NO:9)

Las muestras de ARN se utilizaron en un ensayo de RT-PCR utilizando una serie de cebadores 5' y 3' (o bien A2 o B1) (de 10 μ M cada uno) y el kit ThermoFisher SuperScript III con Platinum Taq (N.º de catálogo 12574-026) (Waltham, MA).

El protocolo para la RT-PCR de los aislados del VRS incluía los pasos siguientes. Las plantillas de ARN, los cebadores, y la mezcla de reacción 2x se descongelaron a temperatura ambiente y se colocaron inmediatamente en hielo una vez descongeladas. La enzima se conservó a -20 °C hasta que estuvo preparada para el uso. La mezcla maestra de RT-PCR se preparó en hielo utilizando el volumen de muestra siguiente:

Mezcla de reacción 2x	25 μ l
Cebador directo 1 ml Cebador inverso	1 μ l
Agua 17	μ l
SSIII/Taq	1 μ l
Plantilla de ARN	5 μ l
Total	50 μ l

La mezcla maestra necesaria se alicuotó en cada tubo de PCR. Se añadió la cantidad de plantilla de ARN en su tubo designado y se utilizó agua como control negativo. Se cerraron las tapas y los tubos se hicieron girar rápidamente para recoger todos los líquidos. A continuación, los tubos se colocaron en el termociclador y las reacciones se analizaron del modo siguiente:

Reacción de RT	55C	30 min
Inactivación de RT	94 °C	2 min
PCR 40 ciclos		
Desnaturalización	94 °C	30 seg.
Hibridación	55 °C	30 seg.
Extensión	68 °C	3 min
Extensión final	68 °C	5 min
Almacenamiento	4 °C	indefinido

Los amplicones resultantes de la RT-PCR eran de aproximadamente 2800 bp. Se analizaron en un gel de agarosa al 1%, se extirparon y se purificaron con gel utilizando el kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen, Valencia, CA, N.º de catálogo 28704).

La purificación incluyó los pasos siguientes. Se añadieron tres volúmenes de tampón QG a 1 volumen de gel (100 mg = 100 μ l). El gel se incubó en el tampón a 50 °C durante 10 minutos. Una vez disuelto el gel, se comprobó el color de la mezcla para confirmar que era amarilla (similar al tampón QG sin la agarosa disuelta). Se añadió un volumen de gel de isopropanol a cada muestra y se mezcló. El ADN se unió a una columna de centrifugado QIAquick y se centrifugó a 50 13000 rpm durante 1 minuto. El flujo continuo se descartó. Las columnas se lavaron añadiendo 0,75 mL de Tampón PE y se centrifugaron durante 1 minuto. El flujo continuo se descartó, y la columna vacía se centrifugó durante un minuto más. La columna de centrifugado QIAquick se colocó en un tubo Eppendorf limpio, el ADN se eluyó en un Tampón de elución (EB) de 40 μ l, y se midió la concentración de ADN.

Los cebadores de secuenciación se diseñaron frente a las cepas de referencia A2 y B1. Se probaron diez cebadores cada uno para la secuenciación del marco abierto de lectura F de los subtipos A y B del VRS. Se analizaron 45 muestras de VRS y 2 cepas de VRS de referencia utilizando los cebadores diseñados. La posición general de los cebadores analizados se muestra en la Figura 5A y un árbol según el método *neighbor joining* de las muestras de VRS A y VRS B analizadas en el ensayo de secuenciación de VRS se muestra en la Figura 5B.

Las tablas 3 y 4 muestran los cebadores que se utilizaron para la secuenciación Sanger.

Tabla 3 Cebadores de secuenciación de ORF F del VRS A2:

440F.RSV.ENVS.A2	CTC TGG GGC AAA TAA CAA TGG AGT TG (SEQ ID NO:10)
74F.RSV.ENVS.A2	GTC AAA ACA TCA CTG AAG AAT TTT ATC (SEQ ID NO:11)
407R.RSV .ENVS .A2	CTT CTT TTC CTT TTC TTG CTT AAT G (SEQ ID NO:12)
449R.RSV .ENVS .A2	CTG GCG ATT GCA GAT CCA ACA CCT A (SEQ ID NO:13)
508F.RSV.ENVS.A2	GCT CTA CTA TCC ACA AAC AAG GCT GTA GTC (SEQ ID NO:14)
792F.RSV.ENVS.A2	GCC TAT AAC AAA TGA TCA GAA AAA G (SEQ ID NO:15)
867R.RSV.ENVS.A2	CAT GAT AGA GTA ACT TTG CTG TCT AAC T (SEQ ID NO:16)
1043R.RSV.ENVS.A2	GAT CCT GCA TTG TCA CAG TAC CAT CC (SEQ ID NO:17)
1480R.RSV.ENVS.A2	GAG ATA TTG ATG CAT CAA ATT CAT C (SEQ ID NO:18)
1397F.RSV.ENVS.A2	GTC TCT ATG TAA AAG GTG AAC CAA TA (SEQ ID NO:19)

Tabla 4 Cebadores de secuenciación de ORF F del VRS B1:

33R.RSV.ENVS.B1	GAT TGC ACT TGA TCT ATG GAT CAG C (SEQ ID NO:20)
74F.RSV.ENVS.B1	GTC AGA ACA TAA CTG AGG AGT TTT ACC (SEQ ID NO:21)
484R.RSV.ENVS.B1	CTT CAA GGT GTA GAA CTT TGG ATA CAG (SEQ ID NO:22)
664F.RSV.ENVS.B1	GAA TTC CAG CAG AAG AAC AGC AGA TTG (SEQ ID NO:23)
835F.RSV.ENVS.B1	CAG ATA GTA AGG CAA CAA AG (SEQ ID NO:24)
901F.RSV.ENVS.B1	GTA CAG CTA CCT ATC TAT GG (SEQ ID NO:25)
1104R.RSV.ENVS.B1	GTC ACA AAA TAC TCG ATT GGA C (SEQ ID NO:26)
1174R.RSV.ENVS.B1	CAT ACT TGG AAT TGA ATA TGT CAG (SEQ ID NO:27)
1121F.RSV.ENVS.B1	CAT TAC CAA GTG AAG TCA GCC TTT G (SEQ ID NO:28)
1324F.RSV.ENVS.B1	GTG TCA AAC AAA GGA GTA GAT ACT G (SEQ ID NO:29)

Se utilizaron los siguientes materiales en la reacción de secuenciación: Muestras de ADN en gel purificado, Big Dye, tampón de dilución, cebadores de secuenciación (ver tablas anteriores) (10 µM cada uno), solución SAM, y perlas BDx.

La secuenciación de la mezcla maestra se preparó en hielo utilizando el volumen de muestra siguiente:

Tampón de dilución	de 1,5 µl
Big Dye v3	1 µl
Agua	5,5 µl
Cebador	1 µl
Total	10 µl (tras añadir 1 µl de plantilla de ADN (~ 40 ng))

Se transfirieron 9 µl de mezcla maestra a tubos individuales de PCR (o a una placa de 96 pocillos con faldón), y se añadió 1 µl de plantilla de ADN a los pocillos apropiados. Los tubos se colocaron en el termociclador y las reacciones se analizaron del modo siguiente:

Desnaturalización inicial	96°C	2 min
PCR 35 ciclos		
Desnaturalización	96 °C	10 seg.
Hibridación	50°C	5 seg.
Extensión	60 °C	4 min
Almacenamiento	4 °C	indefinido

Tras la reacción de PCR, se combinaron 1,1 mL de perlas BDx y 5,1 mL de solución SAM y se agitó periódicamente para mantener las perlas en suspensión. A continuación, se dispensaron 55 µl de mezcla en cada tubo de PCR. La placa se selló y se agitó durante 20 minutos a 4000 RPM. La placa se hizo girar durante 2 minutos a 1000 RPM. Las muestras de secuenciación se analizaron en una máquina ABI utilizando el software GenSeq.

De forma alternativa, las secuencias de la glicoproteína F de las cepas aisladas de VRSh cultivadas se amplificaron mediante RT-PCR, y las muestras se sometieron a purificación de PCR magnética AxyPrep®, preparación de la biblioteca de ADN Nextera y secuenciación de extremos emparejados MiSeq®. El análisis de las lecturas se realizó mediante una línea de secuenciación profunda. La Figura 6A muestra un gráfico de control de calidad para la secuenciación Illumina MiSeq de un asilado de VRSh, donde se muestra que la puntuación Q es superior a 30 en todas las lecturas. La Figura 6B es un gráfico de control de calidad que muestra que más del 99% de las lecturas se corresponden con el genoma de referencia con una distribución uniforme de las longitudes de las lecturas e insertos. Se detectaron variantes menores utilizando umbrales del 3-10%, con datos acompañantes sobre cada codón variante, aminoácido y frecuencia.

La Figura 7A es un diagrama esquemático que muestra las ubicaciones relativas de los cebadores de secuenciación utilizados para secuenciar el ORF F del VRS. La Figura 7B es un árbol según el método *neighbor joining* de las muestras de VRS A y VRS B analizadas en el ensayo de secuenciación de VRS, generado utilizando los datos de la secuencia obtenidos con los métodos de secuenciación anteriores.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar simultáneamente la carga viral y el genotipo de un virus respiratorio sincitial (VRS) en una muestra biológica, que comprende:
 - a) amplificar una secuencia de ácido nucleico que codifica un marco abierto de lectura (ORF) del VRS en una muestra biológica utilizando una serie de cebadores que amplifican específicamente un ORF A del VRS y un ORF B del VRS y al menos dos sondas de ácido nucleico en un ensayo cuantitativo de reacción en cadena de la polimerasa, donde al menos una sonda se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo A del VRS y al menos una sonda se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo B del VRS, y donde al menos dos sondas de ácido nucleico están etiquetadas diferencialmente, donde la amplificación comprende la transcripción inversa y la amplificación cuantitativa por PCR en tiempo real, donde la serie de cebadores comprende una secuencia de ácido nucleico comprendiendo la SEQ ID NO: 1, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO: 1, y una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:2, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:2, y donde la sonda que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo A del VRS comprende la SEQ ID NO:3, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:3, y la sonda que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo B del VRS comprende la SEQ ID NO:4, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:4; y
 - b) determinar la carga viral y el subtipo o subtipos de VRS presentes en la muestra biológica.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la transcripción inversa y la amplificación en tiempo real se producen en un solo paso.
3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, que además comprende una serie de cebadores que amplifica una región MS2 y una sonda de ácido nucleico que se une específicamente a un ácido nucleico M2, opcionalmente donde la serie de cebadores comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:30 y una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:31, y opcionalmente en el que la sonda de ácido nucleico que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico M2 comprende la SEQ ID NO:5, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:5.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde los cebadores y/o las sondas están etiquetados con una fracción fluorescente.
5. Un método para determinar el genotipo o la carga viral de un virus respiratorio sincitial (VRS) en una muestra biológica, que comprende:
 - a) amplificar una secuencia de ácido nucleico que codifica un marco abierto de lectura (ORF) del VRS en una muestra biológica utilizando un cebador que comprende la SEQ ID NO: 1, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:1; un cebador que comprende la SEQ ID NO:2, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:2; y una sonda que comprende la SEQ ID NO:3 o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:3, una sonda que comprende la SEQ ID NO:4 o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:4, o tanto una sonda que comprende la SEQ ID NO:3, como una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:3, y una sonda que comprende la SEQ ID NO:4, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:4, en un ensayo cuantitativo de reacción en cadena de la polimerasa, donde las sondas están etiquetadas diferencialmente; en el que la amplificación comprende la transcripción inversa y la amplificación cuantitativa por PCR en tiempo real; y
 - b) determinar la presencia o ausencia de un producto de amplificación que se une a una de las sondas, o determinar la carga viral, determinando así el genotipo o genotipos del VRS presentes o la carga viral del VRS en la muestra biológica.
6. El método de la reivindicación 5, en el que la transcripción inversa y la amplificación cuantitativa en tiempo real se producen en un solo paso.
7. El método de las reivindicaciones 5 o 6, que además comprende una serie de cebadores que amplifica una región MS2 y una sonda de ácido nucleico que se une específicamente a un ácido nucleico M2, opcionalmente donde la serie de cebadores comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:30 o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:30 y una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:31 o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:31, y opcionalmente donde la sonda de ácido nucleico que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico M2 comprende la SEQ ID NO:5 o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:5.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5-7, donde los cebadores y/o las sondas están etiquetados con una fracción fluorescente.

9. Un método para diagnosticar una infección por VRS en un sujeto que comprende:

a) amplificar una secuencia de ácido nucleico que codifica un ORF del VRS en una muestra biológica de un sujeto utilizando una serie de cebadores que amplifican específicamente un ORF del subtipo A del VRS y un ORF del subtipo B del VRS y al menos dos sondas de ácido nucleico en un ensayo cuantitativo de reacción en cadena de la polimerasa, donde al menos una sonda se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo A del VRS y al menos una sonda se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo B del VRS, y donde al menos dos sondas de ácido nucleico están etiquetadas diferencialmente, en el que la serie de cebadores comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 1, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO: 1, y una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:2, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:2, y donde la sonda que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo A del VRS comprende la SEQ ID NO:3, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:3, y la sonda que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo B del VRS comprende la SEQ ID NO:4, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:4, en el que la amplificación comprende la transcripción inversa y la amplificación cuantitativa por PCR en tiempo real, y opcionalmente donde la transcripción inversa y la amplificación cuantitativa en tiempo real, se producen en un solo paso;

b) determinar la carga viral y el subtipo o subtipos de VRS presentes en la muestra biológica, diagnosticando así al sujeto con una infección por VRS.

10. Un método para determinar la eficacia de una terapia para la infección por VRS en un sujeto, el método comprende:

a) amplificar una secuencia de ácido nucleico que codifica un ORF del VRS en una primera muestra biológica del sujeto utilizando una serie de cebadores que amplifican específicamente un ORF del subtipo A del VRS y un ORF del subtipo B del VRS y al menos dos sondas de ácido nucleico en un ensayo cuantitativo de reacción en cadena de la polimerasa, donde al menos una sonda se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo A del VRS y al menos una sonda se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo B del VRS, y donde al menos dos sondas de ácido nucleico están etiquetadas diferencialmente,

b) determinar la carga viral y el subtipo o subtipos de VRS presentes en la primera muestra biológica;

c) amplificar una secuencia de ácido nucleico que codifica un ORF del VRS en una segunda muestra biológica del sujeto utilizando una serie de cebadores que amplifican específicamente un ORF del subtipo A del VRS y un ORF del subtipo B del VRS y al menos dos sondas de ácido nucleico en un ensayo cuantitativo de reacción en cadena de la polimerasa, donde el sujeto ha recibido al menos un tratamiento con una primera terapia para la infección por VRS, donde al menos una sonda se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo A del VRS y al menos una sonda se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo B del VRS, y donde al menos dos sondas de ácido están etiquetadas diferencialmente;

d) determinar la carga viral y el subtipo o subtipos de VRS presentes en la segunda muestra biológica;

e) comparar la carga viral y/o los subtipos de VRS de la primera muestra biológica con la carga viral y/o los subtipos de VRS de la segunda muestra biológica, donde una disminución en la carga viral y/o un cambio en los subtipos en la segunda muestra biológica en comparación con la carga viral y/o los subtipos en la primera muestra biológica indica que el tratamiento es efectivo y donde un aumento o la ausencia de cambio en la carga viral y/o un aumento o la ausencia de cambio en los subtipos en comparación con la carga viral y/o el subtipo o los subtipos en la primera muestra biológica indica que el tratamiento es ineficaz,

donde la serie de cebadores comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:1, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO: 1, y una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:2, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:2, y donde la sonda que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo A del VRS comprende la SEQ ID NO:3, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:3, y la sonda que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico del subtipo B del VRS comprende la SEQ ID NO:4, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:4, donde la amplificación de la secuencia de ácido nucleico comprende la transcripción inversa y la amplificación cuantitativa por PCR en tiempo real, y opcionalmente donde la transcripción inversa y la amplificación cuantitativa en tiempo real, se producen en un solo paso.

11. El método de la reivindicación 10, que además comprende una serie de cebadores que amplifica una región MS2 y una sonda de ácido nucleico que se une específicamente a un ácido nucleico M2, opcionalmente donde la serie de cebadores comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:30 o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:30 y una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:31 o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:31, y opcionalmente donde la sonda de ácido nucleico que se une específicamente a una secuencia de ácido nucleico M2 comprende la SEQ ID NO:5 o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:5.

12. El método de la reivindicación 10 u 11, donde los cebadores y/o las sondas están etiquetados con una fracción fluorescente.
13. El uso de una sonda de ácido nucleico en los métodos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde la sonda de ácido nucleico comprende la SEQ ID NO:3, una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:36, una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:37, y una fracción detectable.
14. El uso de la reivindicación 13, donde la fracción detectable es una fracción fluorescente.
15. Un kit para la detección de la carga viral y el genotipo de un VRS en una muestra biológica que comprende:
 - a) un cebador de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:1 o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:1;
 - b) un cebador de ácido nucleico que comprende la SEQ ID. NO: 2, o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:2;
 - c) una sonda que comprende la SEQ ID NO:3 o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:3, y
 - d) una sonda que comprende la SEQ ID NO:4 o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:4, y opcionalmente
 - e) un cebador nucleico que comprende la SEQ ID NO:30 o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:30, un cebador nucleico que comprende la SEQ ID NO:31 o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:31, y una sonda de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:5 o una secuencia de ácido nucleico que tiene un 90% o 95% de identidad con la SEQ ID NO:1.

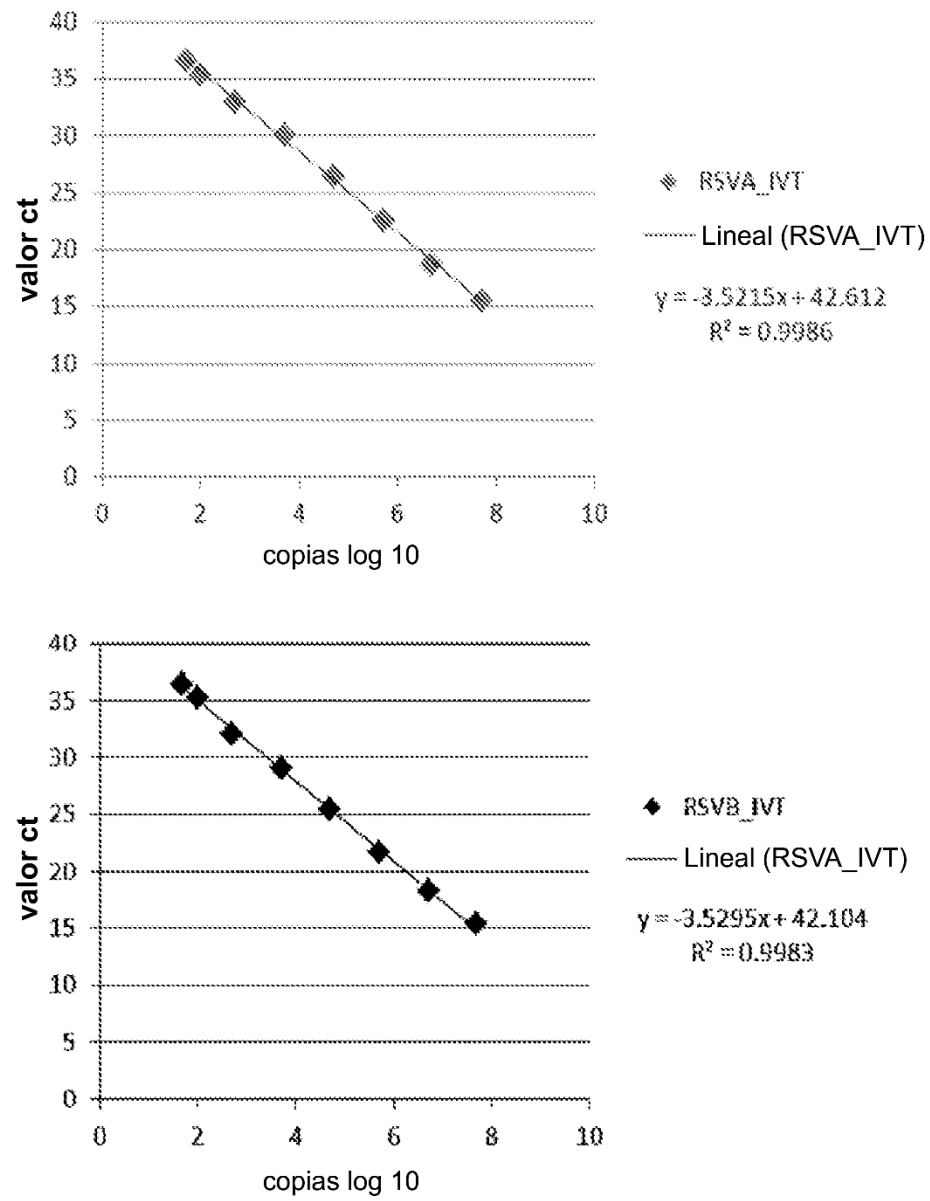


FIGURA 1^a

Entrada		Medido		
copias	copias log 10	RSVA Ct	copias log 10	copias
5.00E+07	7.70	15.54	7.69	48,769,747
5.00E+06	6.70	18.64	6.81	6,421,794
5.00E+05	5.70	22.53	5.70	503,450
5.00E+04	4.70	26.44	4.59	39,169
5.00E+03	3.70	30.03	3.57	3,748
5.00E+02	2.70	32.89	2.76	575
1.00E+02	2.00	35.33	2.07	117
5.00E+01	1.70	36.62	1.70	50

Entrada		Medido		
copias	copias log 10	RSVB Ct	copias log 10	copias
5.00E+07	7.70	15.39	7.57	37,163,632
5.00E+06	6.70	18.24	6.76	5,782,907
5.00E+05	5.70	21.72	5.78	595,884
5.00E+04	4.70	25.48	4.71	51,425
5.00E+03	3.70	29.05	3.70	5,000
5.00E+02	2.70	32.10	2.83	681
1.00E+02	2.00	35.27	1.94	87
5.00E+01	1.70	36.44	1.60	40

Rango = 50-5 X10⁷ copias

FIGURA 1B

Multiplexado qRT-PCR			Multiplexado qRT-PCR			GenMark RVP		Multiplexado qRT-PCR			GenMark RVP	
Controles	RSVA	RSVB	LabCorp_RSV	RSVA	RSVB	RSVA	RSVB	LabCorp_RSV	RSVA	RSVB	RSVA	RSVB
PC1_A	21.92	UND	2015-1	26.12	UND	X		2014-1	UND	25.59		X
PC2_A	21.55	UND	2015-2	27.63	UND	X		2014-2	UND	27.35		X
NTC	UND	UND	2015-3	UND	28.23		X	2014-3	UND	27.28		X
NTC	UND	UND	2015-4	UND	28.10		X	2014-4	UND	28.17		X
PC1_B	UND	20.57	2015-5	29.17	UND	X		2014-5	UND	37.70		X
PC2_B	UND	20.54	2015-6	UND	31.11		X	2014-6	27.48	UND	X	
			2015-7	UND	29.76		X	2014-7	UND	31.78		X
			2015-8	UND	28.94		X	2014-8	UND	29.35		X
			2015-9	UND	29.13		X	2014-9	25.65	UND	X	
			2015-10	UND	26.19		X	2014-10	31.93	UND	X	
								2014-11	UND	23.85		X
								2014-12	UND	27.49		X
								2014-13	30.10	UND	X	
								2014-14	27.48	UND	X	
								2014-15	UND	26.77		X
								2014-16	30.97	UND	X	
								2014-17	26.02	UND	X	
								2014-18	27.23	UND	X	
								2014-19	UND	30.63		X
								2014-20	26.45	UND	no detectado por RVP	

NTC = no template control
 UND = undetermined
 PC = positive control

Todas las reacciones qRT-PCR realizadas en triplexado

FIGURA 2

RSV A	VL conocida		MGB triplexado		VL conocida		MGB triplexado
	1A.1	1,100,000	2,249,378		2A.1	44,000,000	30,513,179
	1A.2	1,300,000	2,172,043		2A.2	24,000,000	21,187,163
	1A.3	1,200,000	2,227,539		2A.3	26,000,000	25,762,193
	1B.1	893,000	256,557		2B.1	2,100,000	3,414,058
	1B.2	136,000	265,169		2B.2	1,400,000	2,360,924
	1B.3	120,000	210,356		2B.3	2,900,000	2,426,159
	1C.1	12,600	27,987		2C.1	134,000	120,437
	1C.2	14,200	36,763		2C.2	67,600	100,514
	1C.3	13,100	27,952		2C.3	229,000	176,436
	1D.1	1,960	3,437		2D.1	12,200	4,886
	1D.2	2,350	3,240		2D.2	45,900	9,821
	1D.3	1,650	4,506		2D.3	5,800	10,809
	1E.1	140	445		2E.1	500	116
	1E.2	ND	2,196		2E.2	800	814
	1E.3	1,530	998		2E.3	700	206

FIGURA 3

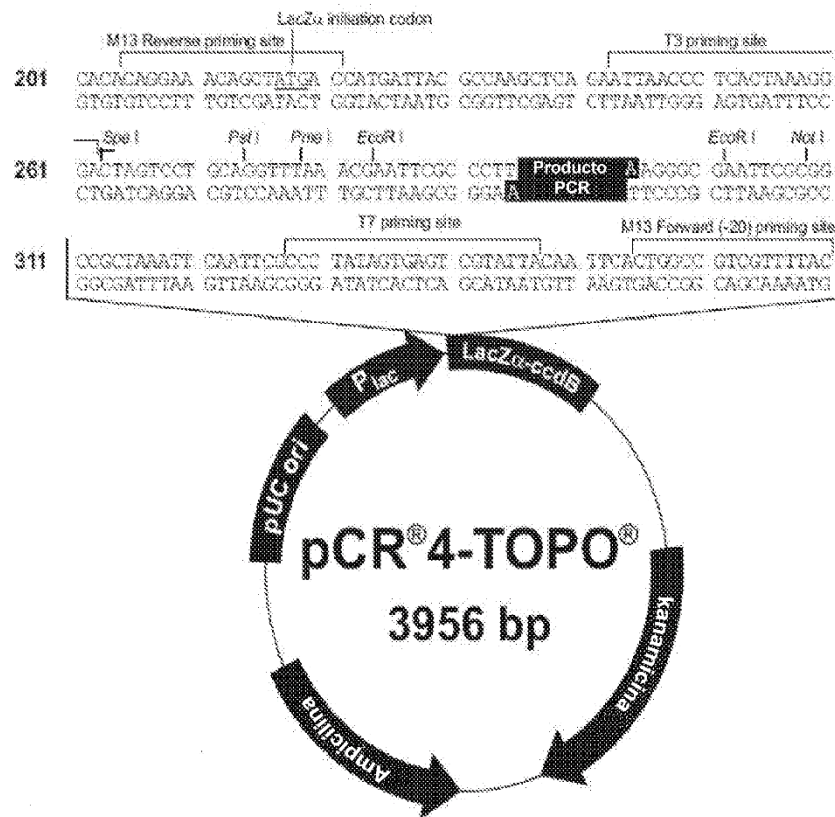


FIGURA 4

Home > Biology >

DNA/RNA Copy Number Calculator

Please Paste the DNA/RNA Sequence (Optional):

Sequence Length:

020

bp

Weight:

486

ng

Mole:

0.000000000000000001

mmol

Copy Number:

420197802970.0

x 1

Home > Biology >

DNA/RNA Copy Number Calculator

Please Paste the DNA/RNA Sequence (Optional):

Sequence Length:

bp

Weight:

ng

Mole:

mmol

Copy Number:

x 1

FIGURA 5

FIGURA 6A

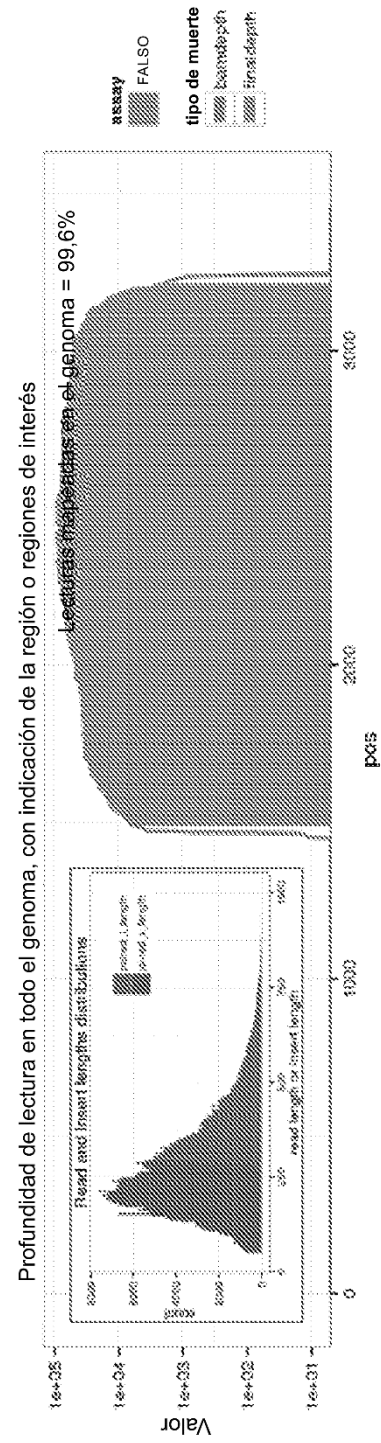
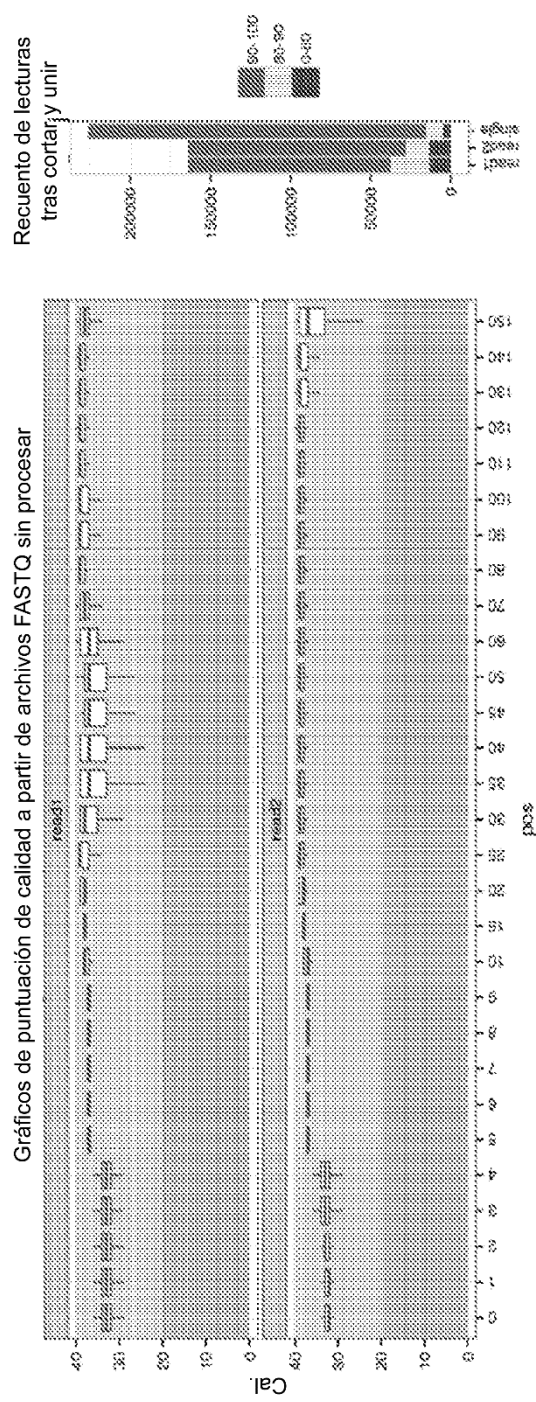


FIGURA 6B



FIGURA 7A

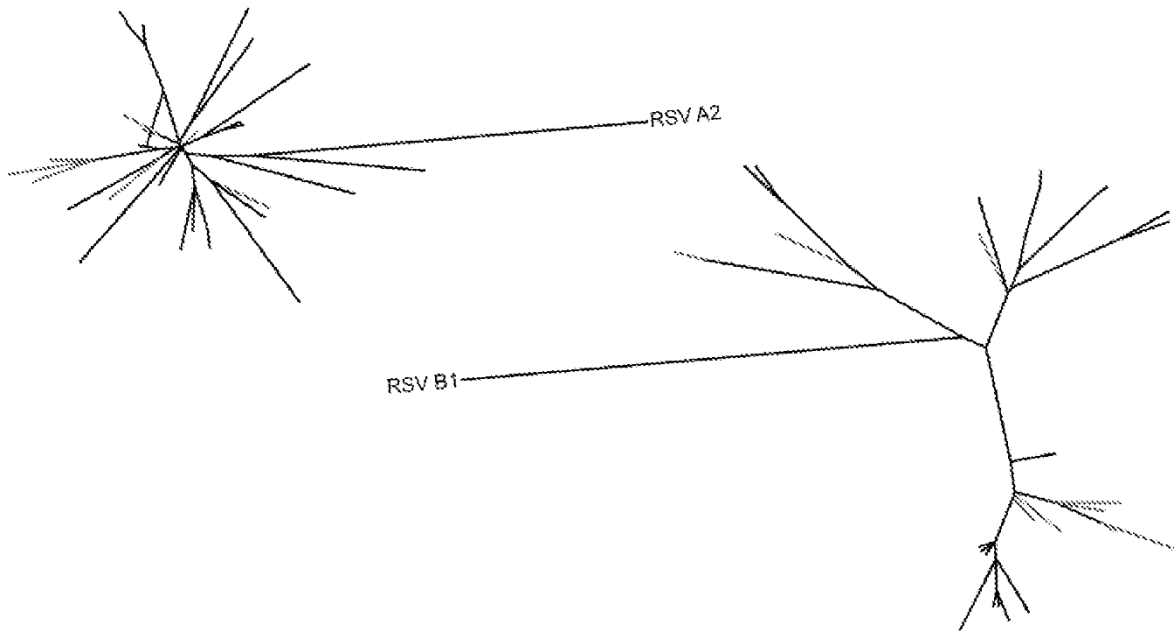


FIGURA 7B