

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 364 833**

21 Número de solicitud: 201030126

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70

(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **29.01.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **15.09.2011**

Fecha de la concesión: **03.09.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **13.09.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
13.09.2012

73 Titular/es:
**INSTITUTO DE SALUD CARLOS III
SINESIO DELGADO 6
28029 MADRID, ES**

72 Inventor/es:
**VÁZQUEZ GONZÁLEZ, ANA;
TENORIO MATANZO, ANTONIO y
NEGREDO ANTÓN, ANA ISABEL**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

54 Título: **MÉTODO DE AMPLIFICACIÓN GENÓMICA DEL VIRUS WEST NILE.**

57 Resumen:

Método de amplificación genómica del virus West Nile. El método se basa en la amplificación de una zona de la región 3 no codificante del virus, preferiblemente mediante PCR en Tiempo Real, gracias al uso de una pareja de cebadores mínimamente degenerados, lo que permite la amplificación de virus West Nile presentes en una muestra de cualquiera de los linajes conocidos. El fragmento amplificado se detecta, preferiblemente, con una sonda específica de la zona, también mínimamente degenerada. La pareja de cebadores degenerados elegidos, así como la sonda preferida, dan lugar a una alta sensibilidad en la detección de todos los linajes y también a una alta especificidad para el virus West Nile.

ES 2 364 833 B1

DESCRIPCIÓN

Método de amplificación genómica del virus West Nile.

5 **Campo técnico**

La invención se refiere al campo de la Biotecnología. Más concretamente, la invención se refiere a un método que permite la amplificación genómica en Tiempo Real de cualquiera de los linajes del virus West Nile presentes en una muestra y que, por tanto, facilita la detección de la presencia del virus en una muestra.

10 **Antecedentes de la invención**

El virus West Nile (WNV) es un virus RNA de polaridad positiva perteneciente al género Flavivirus. Este género comprende numerosos virus patógenos para el ser humano e incluso potencialmente letales, tales como el virus del Dengue, el de la fiebre amarilla o los virus pertenecientes al serogrupo del virus de la encefalitis japonesa, un serogrupo al cual pertenece tanto el virus West Nile como otros virus estrechamente relacionados con él como el propio virus de la encefalitis japonesa (JEV), el virus de la encefalitis de San Luis (SLEV), el virus de la encefalitis de Murray Valley (MVEV) o el virus Usutu (USUV).

Dentro de dicho subgrupo, se conoce como “virus West Nile” (WNV) a un complejo que comprende diferentes linajes evolutivos. Una revisión de la bibliografía lleva a la conclusión de que existen al menos cinco linajes diferentes, varios de ellos con virulencia desconocida, y con una diferencia en nucleótidos del 20% entre cada uno de ellos (Bondre *et al.*, *J Gen Virol* **88**: 875-884 (2007)). Recientes hallazgos, además, sugieren la existencia de más linajes evolutivos: el análisis de la secuencia de un virus cultivado a partir de un mosquito capturado en Malasia, cedido por el Instituto Pasteur al grupo de los inventores, que llevaron a cabo la secuenciación completa del genoma de dicho virus en 2006, permitió la identificación de un sexto linaje evolutivo; más recientemente, en la propia Europa, concretamente en España, pudo detectarse una cepa del virus West Nile que, aunque no pudo ser cultivada, ha sido secuenciada parcialmente, dando resultados que llevan a la conclusión de que se trata de un séptimo linaje evolutivo del virus (datos divulgados en la tesis doctoral de la Dra. Ana Vázquez González, de título “*Búsqueda de flavivirus en mosquitos de humedales españoles. Análisis molecular del virus West Nile y otros flavivirus*”, leída en Diciembre del 2008).

El virus West Nile se mantiene en la naturaleza en un ciclo natural que implica principalmente a aves y a mosquitos, aunque los humanos y los equinos pueden ser infectados también, pudiendo dar lugar en ellos a una enfermedad neurológica mortal. El origen del virus es africano, y tiene una distribución a nivel mundial (África, Asia, Europa, Oriente Medio, India, Australia y América). Desde que se aisló por primera vez, los brotes en humanos han sido poco frecuentes, pero en las últimas décadas ha cobrado gran importancia debido a su emergencia a zonas nuevas, como ha sido su entrada y expansión por el continente americano y por las recientes epidemias que ha producido en Europa, asociadas a altos niveles de enfermedad neuroinvasiva y mortalidad. Hasta el año 1999, WNV se distribuía exclusivamente en el Viejo Mundo, pero en ese año se detectó por primera vez en el continente Americano en la ciudad de Nueva York, y a partir de ahí el virus ha sido capaz de extenderse por todo Norteamérica, sur de Canadá, Centroamérica, islas del Caribe y Sudamérica.

Muchos seres humanos infectados no presentan síntomas clínicos aparentes, aunque pueden acabar desarrollando enfermedades neurológicas graves tales como meningitis o encefalitis. Es más habitual el desarrollo de síntomas más moderados, tales como fiebre, malestar, anorexia, náuseas, vómitos, dolor de cabeza, molestias oculares, mialgia, erupciones cutáneas y linfadenopatía. Sin embargo, en los últimos tiempos parecen estar apareciendo variantes más virulentas, que están convirtiendo al virus en un serio problema para la salud pública y que hacen aconsejable un diagnóstico precoz del mismo, para evitar el desarrollo de enfermedades neurológicas.

El gran brote epidémico que está afectando a América ha llevado a incrementar el interés por el conocimiento del virus, sus vías de transmisión y los medios para su detección. Así, se ha descubierto que, además de la picadura de los mosquitos, la transmisión puede producirse también por otras vías tales como la donación de sangre, el trasplante de órganos y la alimentación con leche materna. Esto ha llevado a las autoridades de EE.UU. a estudiar en todas las donaciones la posible presencia del genoma de WNV. En Europa, donde parecer circular cepas pertenecientes al menos a los linajes 1, 2, 3, 4 y 7, los recientes brotes que han afectado a prácticamente todos los países mediterráneos han llevado a la Unión Europea a debatir los procedimientos de control de infección en trasplantes y donaciones en los países de su área de influencia y a considerar la obligatoriedad del análisis de la posible presencia de WNV en donaciones efectuadas en regiones endémicas europeas.

Dado que no es sencillo intuir la presencia del virus en un individuo, pues muchos portadores del WNV son asintomáticos e incluso, cuando se produce una infección activa, la misma suele dar lugar a síntomas inespecíficos, está adquiriendo una creciente importancia la comprobación sistemática de la posible presencia del virus en muestras de sangre y órganos susceptibles de ser trasplantados. Como, normalmente, los anticuerpos específicos contra el virus pueden ser detectados sólo después de la fase virémica e incluso, pueden persistir durante más de un año, haciendo difícil distinguir entre la situación de infección activa y los efectos de exposiciones acontecidas en el pasado, se está incrementando el interés en el desarrollo de métodos más sensibles para la detección del virus. Por ello, se han descrito numerosos ensayos que describen métodos de amplificación genómica para la detección de los ácidos nucleicos de dicho virus.

Por desgracia, la mayor parte de ellos toman como diana el WNV que circula actualmente en Norteamérica, centrándose en la detección de virus del linaje 1, sin considerar la enorme variabilidad natural existente en otros lugares del mundo, con lo que se encuentran muy pocos métodos que consideren la necesidad de detectar al menos un segundo linaje viral. Es más, la comparación de las secuencias de los cebadores utilizados demuestra que, incluso en los métodos desarrollados para cepas del linaje 1, hay cepas pertenecientes a dicho linaje que no podrían ser detectadas mediante el método propuesto.

Así, por ejemplo, Lanciotti *et al.* (en *J. Clin. Microbiol.* **38**:4066-4071 (2001)) desarrollaron un ensayo de PCR en Tiempo Real basado en sondas TaqMan para la detección del RNA del WNV en diversas muestras (tanto de origen humano como obtenidas de aves o mosquitos) que se basó en la cepa NY99, consiguiendo resultados aceptables para esta cepa, especialmente con los cebadores desarrollados para la zona de 3' No Codificante (3'NC), pero el método no es válido para muchas otras cepas de recientes brotes del linaje 1 ni para los demás linajes. Trabajos posteriores del mismo grupo (Lanciotti and Kerst, *J Clin Microbiol.* **39**:4506-4513 (2001)), consiguieron mejorar la sensibilidad adaptando la metodología a la detección con NASBA, aunque los problemas de falta de capacidad de detección de todos los linajes subsisten. El mismo problema existe con los métodos que han intentado mejorar el método de Lanciotti mejorando el modo de cuantificación (Lo *et al.*, *J Virol* **77**: 10004-10014 (2003)) o las muestras de partida (Vanlandingham *et al.*, *Am J Trop Med Hyg* **71**:120-123 (2004)).

Por otra parte, muchos de los métodos desarrollados no son totalmente específicos para WNV, sino que detectan igualmente la presencia de otros virus del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa. Tal es el caso, por ejemplo, del método de RT-PCR desarrollado por Shirato *et al.* (Shirato *et al.*, *J Virol. Methods* **126**:119-125 (2005)), donde se describe el uso de cebadores específicos diseñados en la zona de la proteína C que permiten amplificar los linajes I y II del WNV y los cinco genotipos del virus de la encefalitis japonesa. Este método, como otros varios de similares características, incluye una sonda, marcada con un fluorocromo, complementaria a secuencias del genoma del WNV y el JEV, que permite la detección de ambos virus.

Una mejora más que se ha introducido en estas técnica de detección de ácidos nucleicos de WNV es la incorporación de controles internos (Eisler *et al.*, *J. Clin. Microbiol* **42**:841-843 (2004)) pero, en general, las sondas diseñadas para su detección están pensadas para virus del linaje 1, no siendo adecuada para el resto de los linajes y existiendo incluso cepas del linaje 1 para las que no serían adecuadas.

Las regiones utilizadas con más frecuencia para el diseño de cebadores para la amplificación de fragmentos del genoma del virus y/o de sondas para su detección son las de la región no codificante de 5', la región no codificante de 3' y las regiones correspondientes a las proteínas estructurales NS1, NS3 y NS5. La solicitud de patente internacional WO 2004/036190, por ejemplo, describe métodos para la detección del virus West Nile en los que se amplifican y detectan secuencias polinucleotídicas del mismo. Aunque, inicialmente, se indica en dicho documento que se puede utilizar para el diseño de los cebadores cualquier secuencia específica para WNV u otro flavivirus, las realizaciones específicas descritas en dicho documento implican el uso de cebadores y sondas dirigidos a la región no codificante de 5' (5'NC), la región no codificante de 3' (3'NC) o la región 3000 (región de NS1/NS2a). Como es conocido, se comenta que el grado de amplificación observado con un juego de cebadores depende de diversos factores, entre los que se pueden citar su longitud, la capacidad de los oligonucleótidos para hibridar con sus secuencias complementarias y la capacidad de la enzima para polimerizar los cebadores, estando determinada la estabilidad del híbrido formado, por lo general, por la longitud del fragmento del mismo en el que se produce un apareamiento perfecto entre los nucleótidos de las cadenas complementarias. Los resultados de amplificación de secuencias de la región 3'NC, por ejemplo, con juegos de cebadores específicos para dicha región, demuestran la dificultad de diseñar ensayos eficaces altamente sensibles, incluso tratando de optimizar los parámetros que se sabe que influyen en el grado de amplificación, tales como la longitud de los cebadores, su especificidad y su temperatura de apareamiento. Así, se propone en principio la amplificación de secuencias utilizando una pareja de cebadores que se elige tomando uno de ellos de una tabla de cebadores directos (diseñados para hibridar con una hebra, complementarios al fragmento de la región 3'NC cuya secuencia está representada por SEQ ID NO:11) y otro de una tabla de cebadores inversos (diseñados para hibridar con fragmentos de secuencia que se encontrarían en la cadena complementaria a la anterior y cuya secuencia está contenida en el fragmento representado por SEQ ID NO: 12, prefiriéndose particularmente que esté contenida en los subfragmentos de la anterior representados por SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14). Las secuencias específicas de cada uno de los cebadores directos se presentan en la Tabla 1, mientras que las secuencias de los cebadores inversos de menos de 24 nucleótidos se presentan en la Tabla 2. Las secuencias se han indicado de manera que puedan apreciarse los nucleótidos en los que existen variaciones entre los diversos linajes; dichas variaciones, así como las que se indican en las Tablas 3 y 4 que se presentan más adelante, se han identificado utilizando como referencia, para cada linaje, las siguientes cepas:

- Linaje 1: NY99eqhs (GenBank: AF260967);
- Linaje 2: B956 (GenBank: AY532665);
- Linaje 3: Rabensburg (GenBank: AY765264);
- Linaje 4: LEIVKrnd88_190 (GeneBank: AY277251);
- Linaje 5: 804994 (GenBank: DQ256376);
- Linaje 6: MP502-66 (Secuencia de la zona 3'NC, representada por SEQ ID NO:57).

TABLA 1

Cebadores directos de la región no traducida de 3' de WO 2004/036190

Nº Secuencia en WO2004/036190	Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO:
>60	TCCGCCACCGGAAGT <u>TGAG</u>	SEQ ID NO:15
>61	ICCGCCACCGGAAGT <u>TGAG</u>	SEQ ID NO:16
>62	TCCGCCACCGGAAGT <u>TGAGT</u>	SEQ ID NO:17
>63	TCCGCCACCGGAAGT <u>TGAGTA</u>	SEQ ID NO:18
>64	CGCCACCGGAAGT <u>TGAGT</u>	SEQ ID NO:19
>65	IGCCACCGGAAGT <u>TGAGT</u>	SEQ ID NO:20
>66	CGCCACCGGAAGT <u>TGAGTA</u>	SEQ ID NO:21
>67	GGAAGT <u>TGAGTAGACGGTGCT</u>	SEQ ID NO:22
>68	GGAAGT <u>TGAGTAGACGGTGCTG</u>	SEQ ID NO:23
>69	GAAGT <u>TGAGTAGACGGTGCT</u>	SEQ ID NO:24
>70	GAAGT <u>TGAGTAGACGGTGCTG</u>	SEQ ID NO:25
>71	AAGT <u>TGAGTAGACGGTGCTG</u>	SEQ ID NO:26

- Nucleótidos en negrita y subrayados: variantes en cepas del linaje 1
- Nucleótidos en negrita y cursiva: variantes en cepas del linaje 2
- Nucleótidos en cursiva: variantes en cepas del linaje 3
- Nucleótidos subrayados: variantes en cepas del linaje 4
- Nucleótidos sobre fondo gris: variantes en más de un linaje

TABLA 2

Cebadores inversos de la región no traducida de 3' de WO 2004/036190

Nº Secuencia en WO2004/036190	Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO:
>75	TCCGAGACGGT <u>TCTGAGGGTTAC</u>	SEQ ID NO:27
>76	TCCGAGACGGT <u>TCTGAGGGTTA</u>	SEQ ID NO:28
>77	TCCGAGACGGT <u>TCTGAGGGTT</u>	SEQ ID NO:29
>78	CCAGTCCTCCTGGGG <u>TGAG</u>	SEQ ID NO:30
>79	ACCCAGTCCTCCTGGGG <u>TGAG</u>	SEQ ID NO:31
>80	ACCCAGTCCTCCTGGGG <u>TGA</u>	SEQ ID NO:32
>81	ACCCAGTCCTCCTGGGG <u>TG</u>	SEQ ID NO:33
>82	GCTACAICAIGTGGGG <u>TCCT</u>	SEQ ID NO:34
>83	GCTACAICAIGTGGGG <u>TCCT</u>	SEQ ID NO:35

- Nucleótidos en cursiva: variantes en cepas del linaje 3
- Nucleótidos subrayados: variantes en cepas del linaje 4
- Nucleótidos sobre fondo gris: variantes en más de un linaje

Los ensayos específicos de amplificación de la cepa NY99 (linaje 1) realizados combinando tres de los cebadores directos con seis de los cebadores inversos, con 10 réplicas del ensayo por cada combinación de cebadores, demostraron que no todas las combinaciones de cebadores eran capaces de dar lugar a resultados positivos en las 10 réplicas del ensayo, obteniendo relaciones 10/10 de resultados positivos frente a réplicas sólo para cuatro de dieciocho combinaciones ensayadas:

- al combinar los cebadores 64 (SEQ ID NO: 19) ó 66 (SEQ ID NO:21) con el cebador 76 (SEQ ID NO:25), o
- al combinar los cebadores 64 (SEQ ID NO: 19) ó 66 (SEQ ID NO:21) con el cebador 77 (SEQ ID NO:26).

Sin embargo, si se usa el cebador inverso 75 (SEQ ID NO:24), que contiene la secuencia de los cebadores 76 y 77 pero incorporando en 3' uno o dos nucleótidos más, respectivamente, la combinación con los cebadores 64 y 66 da lugar a relaciones de sólo 5/10 y 2/10 positivos en el total de réplicas, obteniéndose el máximo de amplificaciones con el cebador 60 (SEQ ID NO:15), que fue sólo de 6/10.

El documento refiere, además, que hubo incluso cebadores inversos que no dieron lugar a ningún resultado positivo. Estos ensayos demuestran que, aunque el porcentaje de homología de secuencia sea igual o equivalente y la longitud y temperatura de apareamiento similares, no todos los cebadores son equivalentes, siendo muy importante la secuencia específica de cada cebador y no siendo obvia la elección de la pareja adecuada para obtener una amplificación eficiente y reproducible de WNV. Es importante señalar, además, que estos resultados se obtienen con una cepa específica del linaje 1, con respecto a la cual la homología de secuencia de los cebadores es casi total. La observación de atenta de las Tablas 1 y 2 de la presente solicitud permite observar que, si se considera la totalidad de los linajes, el número de diferencias que presenta cada cebador se multiplica, por lo que es de esperar que para estos linajes la eficacia sería más baja.

La solicitud WO 2004/036190 considera también el interés de detectar variantes genéticas de WNV sin comprometer la sensibilidad del método. Para facilitarlo, propone que la amplificación se lleve a cabo utilizando tripletes de cebadores: un par de cebadores complementarios a una misma cadena (tomados de la Tabla 1 de la presente solicitud) en combinación con el cebador de la cadena complementaria (de los que serían posibles ejemplos los de la Tabla 2 de la presente solicitud). La repetición del ensayo de amplificación de WNV de la cepa NY99 con 10 réplicas por combinación dio lugar a 10/10 resultados positivos en las combinaciones que incluían dos cebadores de la Tabla 1, aunque el mismo resultado se obtuvo también en el caso en el que se utilizó un único cebador de la Tabla 1. El ensayo incluía un control interno con un molde y cebadores del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1), que no afectó a la amplificación del virus West Nile. Sin embargo, los ensayos descritos en la solicitud WO 2004/036190, realizados para evaluar la capacidad del método para amplificar y detectar una cepa diferente de WNV (concretamente, la cepa de Uganda), se realizaron utilizando una única pareja de cebadores para cada región del virus analizada (región 5'NC, región 3'NC o región 3000), encontrando que las regiones 3000 y 3'NC daban mejores resultados, pudiendo detectarse hasta 7-13 copias virales/ml. Así, la solicitud WO 2004/036190 no considera explícitamente la posibilidad de utilizar más de un cebador de una misma polaridad, complementario a la secuencia polinucleotídica del virus, para poder detectar en un único ensayo virus de distintas cepas (o incluso linajes) presentes en una muestra.

Tampoco las secuencias de polinucleótidos elegidas para el diseño de las sondas descritas en la solicitud WO 2004/036190 son óptimas para la detección de cepas de todos los linajes de WNV. Un análisis de las secuencias elegidas para la región 3'NC, reproducidas en la Tabla 3 que se muestra a continuación, muestra que ninguna de ellas tiene una homología total con las cepas de todos los linajes:

TABLA 3

Secuencias del WNV elegidas para el diseño de sondas de la región no traducida de 3' en el documento WO 2004/036190

Nº Secuencia en WO2004/036190	Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO:
>104	GAGTAGACGGTGCTGCCTGCG	SEQ ID NO:36
>105	GTAGACGGTGCTGCCTGCG	SEQ ID NO:37
>106	TGCGACTCAACCCCAGGAGGAC	SEQ ID NO:38
>107	TGCGACTCAACCCCAGGA	SEQ ID NO:39
>108	CGACTCAACCCCAGGAGGAC	SEQ ID NO:40
>109	GA ^{CT} CAACCCCAGGAGGAC	SEQ ID NO:41
>110	GA ^{CT} CAACCCCAGGAGGA	SEQ ID NO:42
>111	ACTCAACCCCAGGAGGAC	SEQ ID NO:43
>112	CAGGAGGACUGGGUGAACA	SEQ ID NO:44
>113	GAGGACUGGGUGAACAAG	SEQ ID NO:45
>114	GTGAACAAAGCTGCGAAGTG	SEQ ID NO:46
>115	AAGCCGCGAAGTGATCCATG	SEQ ID NO:47
>116	GTAAGCCCTCAGAACCGTC	SEQ ID NO:48

- Nucleótidos en cursiva: variantes en cepas del linaje 3
- Nucleótidos subrayados: variantes en cepas del linaje 4
- Nucleótidos sobre fondo gris: variantes en más de un linaje

Otros métodos similares también muestran preferencia por la región 3'NC para la elección de cebadores de amplificación y/o sondas de detección, pero presentan también el problema de haber sido diseñados específicamente para cepas del linaje 1, como sucede con el método descrito en la solicitud de patente internacional WO 2005/047522, incluso con la pareja de cebadores preferida en dicha solicitud internacional, que se muestran a continuación en la Tabla 4:

TABLA 4

Cebadores preferidos de la solicitud WO 2005/047522

Nº Secuencia en WO2005/047522	Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO:
>52	GCCACCGGA <u>GT</u> 7GAGTAGA	SEQ ID NO:49
>53	GAG <u>CGGTT</u> TGAGGGCTTAC	SEQ ID NO:50

- Nucleótidos en cursiva: variantes en cepas del linaje 3
- Nucleótidos subrayados: variantes en cepas del linaje 4
- Nucleótidos sobre fondo gris: variantes en más de un linaje

En otros casos, los cebadores y sondas se han diseñado de manera que no son específicos para WNV, sino con el propósito de ser capaces de detectar varios miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa. Tal es el caso, por ejemplo, del método para la detección de flavivirus descrito en la solicitud de patente internacional publicada como WO 2004/092412, donde se menciona como una característica deseable la capacidad del método para detectar varios miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa en un único ensayo.

Según esto, ninguno de los métodos de amplificación y detección conocidos permiten la detección de todos los linajes de WNV. Sin embargo, el análisis adecuado de las muestras de los bancos de sangre y el diagnóstico de la enfermedad requieren un método de amplio espectro, que cubra todos los linajes. Preferiblemente, dicho método debería ser no sólo capaz de detectar todos los linajes del virus West Nile, sino específico para dicho virus, permitiendo distinguir entre WNV y otros virus estrechamente relacionados con el mismo, como son los del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa. También sería preferible que el método presentara una alta sensibilidad, que permitiera la detección del virus aunque el número de copias presente en una muestra no fuera elevado.

El método de la presente invención supone una solución a estos problemas.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona un método de amplificación y detección del virus West Nile (WNV), capaz de detectar con sensibilidad y especificidad cualquiera de los siete linajes conocidos del virus. El método tiene como diana la región 3' no codificante (3'NC), que es una región sometida a presiones de conservación por su implicación en la formación de estructuras secundarias requeridas para la replicación viral, y está particularmente indicado para llevarse a cabo mediante PCR en Tiempo Real. Presenta la particularidad de que la sonda utilizada para la detección del fragmento amplificado, así como los oligonucleótidos utilizados como cebadores en la amplificación del genoma viral mediante PCR en Tiempo Real, están mínimamente degenerados, lo que permite cubrir los seis linajes virales para los que se conoce la secuencia del virus, así como el séptimo linaje viral parcialmente secuenciado. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados como cebadores, así como la secuencia de la sonda de detección, se han elegido cuidadosamente para obtener una alta sensibilidad, similar para todos los linajes, manteniendo la condición de ser específicos para el virus West Nile, no detectándose mediante el método de la invención virus estrechamente relacionados con el WNV tales como los de su mismo serogrupo, el serogrupo del virus de la encefalitis japonesa.

Así, un aspecto de la invención se refiere a un método para la detección del virus West Nile presente en una muestra que comprende las etapas de:

a) amplificar los ácidos nucleicos del virus West Nile presentes en dicha muestra mediante PCR utilizando como cebadores los oligonucleótidos con las secuencias:

5'-CGGAAGTYGRGTAKACGGTGCTG-3' (SEQ ID NO:1) (WNVRT-F, directo), y

5'-CGGTWYTGAGGGCTTACRTGG-3' (SEQ ID NO:2) (WNVRT-Re, inverso);

b) detectar el fragmento de ácido nucleico amplificado,

en donde la detección del ácido nucleico amplificado indica la presencia del virus West Nile en dicha muestra.

En una realización preferida de la invención, la detección del ácido nucleico amplificado se realiza utilizando como sonda el oligonucleótido que tiene la secuencia:

5'-WCCCCAGGWGGACTG-3' (SEQ ID NO:3)

opcionalmente unido a un marcador que permite su detección.

En una realización del método de la invención, la etapa a) de amplificación de los ácidos nucleicos del virus West Nile presentes en la muestra comprende las siguientes subetapas:

- i) síntesis del cDNA a partir del RNA del virus West Nile presente en la muestra mediante una transcriptasa inversa;
- ii) amplificación del cDNA mediante PCR en Tiempo Real utilizando como cebadores los oligonucleótidos de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2; y

la etapa b) de detección del fragmento de ácido nucleico amplificado se lleva a cabo mediante el uso de una sonda fluorogénica (capaz de emitir fluorescencia) que consiste en un oligonucleótido monocatenario complementario al fragmento de ácido nucleico amplificado en la reacción de PCR, covalentemente unido a al menos un compuesto fluorocromo. Se prefiere particularmente que el oligonucleótido utilizado como sonda tenga la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:3.

En una realización preferida de la anterior, la reacción de amplificación del cDNA se lleva a cabo en presencia de un fragmento de DNA bicatenario que sirve como control interno. Dicho control interno es un fragmento de DNA que se amplifica con los mismos oligonucleótidos que la región diana del genoma del virus y que, por tanto, debe contener un fragmento de secuencia que comprenda en una de sus hebras tanto la secuencia complementaria a uno de los cebadores de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 y la secuencia del otro cebador de la pareja, estando situadas ambas secuencias (secuencia de SEQ ID NO:1, por ejemplo, y secuencia invertida y complementaria a SEQ ID NO:2) como fragmentos flanqueantes entre las cuales se encuentra un fragmento heterólogo, tal como, por ejemplo, la secuencia exógena de un virus de una familia diferente. Sobre este fragmento heterólogo se diseña su sonda específica de detección.

Una posible realización de dicha variante del método de la invención es aquella en la que el control interno comprende la secuencia representada por

5'-CGGAAGTYGRGTAKACGGTGCTG CCAGCACACATGTGTCTACT
CCAYGTAAGCCCTCARWACCG-3' (SEQ ID NO:6).

En ella, el extremo 5' (nucleótidos subrayados) es la secuencia del cebador de SEQ ID NO:1, el extremo de 3' (nucleótidos subrayados y en cursiva) es la secuencia invertida y complementaria a la del cebador de SEQ ID NO:2 y el fragmento intermedio es una secuencia del virus BK.

Así, en el caso de que se utilice dicho control interno, se prefiere que la sonda utilizada para su detección esté constituida por un oligonucleótido con la secuencia de nucleótidos:

5'-CCAGCACACATGTGTCTACT-3' (SEQ ID NO:7)

a la que esté covalentemente unido al menos un fluorocromo distinto del fluorocromo o fluorocromos unidos a la sonda que permite la detección del fragmento amplificado del virus West Nile.

El método de la invención puede ser utilizado para detectar la posible presencia del virus West Nile en muestras de distinta procedencia, no sólo geográfica, sino en lo que se refiere a la especie de la que se obtenga una muestra biológica. Así, aunque las realizaciones preferidas del método de la invención serán aquellas en las que el método se aplique para la amplificación (etapa a)) y detección (etapa b)) de ácidos nucleicos extraídos de muestras biológicas tomadas de un ser humano (especialmente, las de líquido cefalorraquídeo, muestras de órganos (p.ej., destinados a trasplantes), y sangre o suero obtenido a partir de la misma), el método puede aplicarse también cuando se parte de muestras biológicas obtenidas de otras especies, tales como un artrópodo o un ave.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit especialmente diseñado para llevar a cabo el método de la invención. Así, un aspecto de la invención es un kit que comprende los oligonucleótidos de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2. Se prefiere particularmente que el kit contenga también una sonda con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:3, especialmente si está marcada en 5' con un fluorocromo y en 3' con un *quencher* no fluorescente unido a un resto MGB (*Minor Groove Binder*). Se prefiere también que el kit contenga adicionalmente una sonda con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:7, especialmente si está marcada con un fluorocromo ausente de la sonda de SEQ ID NO:3. En el caso de que esté presente la sonda de SEQ ID NO:7, el kit puede contener también los oligonucleótidos de SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5 o una molécula de DNA que comprenda la secuencia de SEQ ID NO:6, molécula de DNA que puede ser, por ejemplo, un plásmido, linearizado o no.

La invención se explicará ahora con más detalle con ayuda de las Figuras y Ejemplos que aparecen a continuación.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra un gráfico en el que se representa la sensibilidad en la detección del control interno mediante la PCR en tiempo real. Los números sobre las curvas indican el número de copias del control interno por reacción. La línea horizontal marca el límite de detección.

La Fig. 2 muestra un gráfico en el que se representa la sensibilidad en la detección de la cepa Eg101, del linaje 1 de WNV. De nuevo, los números sobre las curvas indican el número de copias del plásmido que contenía el fragmento del genoma del virus comprendido entre los cebadores de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2.

La Fig. 3 muestra un gráfico en el que se representa la sensibilidad en la detección de la cepa HU2925/06 con el ensayo de PCR en Tiempo Real de la invención.

La Fig. 4 se refiere a la posición en el genoma de los cebadores y sondas de la invención y su homología de secuencia con genomas relacionados:

- La Fig. 4A muestra fragmentos de secuencia de la región no codificante de 3' (3' NC) de diversas cepas del virus West Nile, cuyo nombre se indica a la izquierda, apareciendo sombreadas las zonas correspondientes a los cebadores directo (sombreados de la izquierda) e inverso (sombreado de la derecha). Entre ellos queda el fragmento amplificado en la PCR en Tiempo Real. La secuencia indicada como "wntrSONDA" corresponde a la secuencia utilizada como sonda de detección (SEQ ID NO:3), que aparece situada en la zona del fragmento amplificado a la que se une.

- La Fig. 4B muestra fragmentos de secuencia de la región no codificante de 3' (3' NC) de diversas cepas de virus del serogrupo de la encefalitis japonesa, cepas cuyo nombre se indica a la izquierda, encabezadas por la abreviatura del virus: SLEV (virus de la encefalitis de San Luis), JEV (virus de la encefalitis japonesa), USUV (virus Usutu) y MVEV (virus de la encefalitis de Murria Valley), y que se muestran junto con las secuencias de los cebadores inversos, tanto el inicialmente elegido ("Primer Re Real Time WN") como el cebador inverso del método de la invención ("REWNnuevo"), apareciendo recuadradas las zonas correspondientes a la posición de apareamiento de dicho cebador con respecto al resto de los virus del serogrupo al cual pertenece WNV.

Descripción detallada de la invención

Tal como se ha comentado, la presente invención se refiere a un método de amplificación y detección del virus West Nile (WNV) presente en una muestra que, concretamente, comprende las etapas de:

a) amplificar los ácidos nucleicos del virus West Nile presentes en dicha muestra mediante PCR utilizando como cebadores los oligonucleótidos con las secuencias:

5'-CGGAAGTYGRGTAKACGGTGCTG-3' (SEQ ID NO:1) (WNVRT-F, directo), y

5'-CGGTWYTGAGGGCTTACRTGG-3' (SEQ ID NO:2) (WNVRT-Re, inverso);

b) detectar el fragmento de ácido nucleico amplificado,

en donde la detección del ácido nucleico amplificado indica la presencia del virus West Nile en dicha muestra.

Así, de manera similar a otros métodos previos, diseñados para la amplificación de los ácidos nucleicos del virus y posterior detección del material amplificado, el método de la presente invención se ha diseñado para amplificar las moléculas de RNA del virus presentes en una muestra, incluyendo para ello en el método una etapa en el que se realiza una reacción de PCR. Para ello, se ha desarrollado una pareja de cebadores, (los oligonucleótidos cuya secuencia está representada por SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2), que tienen como diana la región 3'NC del genoma del virus, una región considerada de interés también en otros métodos de amplificación y detección de WNV previamente descritos. Sin embargo, a diferencia de otros métodos descritos hasta ahora, que sólo cubren 1 ó 2 linajes evolutivos, sin considerar la gran variabilidad natural existente en el mundo, el método de la invención ha sido diseñado para permitir la detección de los 7 linajes evolutivos del virus West Nile conocidos hasta el momento. Para ello, se han analizado todas las cepas del virus para las que hay depositadas secuencias genómicas en bases de datos públicas, concretamente, las 79 secuencias que tienen los siguientes números de acceso a la base de GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/): AY712948, AY712947, AY490240, AY278442, AY278441, AY277252, AF404757, AF404756, AF404755, AF404754, AF404753, AF481864, AY603654, AY646354, AY289214, AY795965, AY842931, AY660002, AF196835, DQ164206, DQ164202, DQ164197, AF260969, AF260968, AF260967, DQ211652, DQ164204, DQ164200, DQ164201, AF533540, DQ005530, DQ118127, DQ164205, DQ164203, DQ164199, D00246, DQ164196, DQ080058, DQ080054, DQ080055, DQ080056, DQ164193, DQ164186, DQ164195, DQ164191, DQ164205, DQ080053, AY848696, AB185917, DQ080052, AB185914, DQ080051, DQ164189, AF404756, DQ164190, AY712945, AY712946, DQ080059, DQ164188, DQ164187, DQ164192, AF404757, AY277252, AY274505, DQ116961, DQ318019, M12294, EF429200, AY532665, EF429198,

EF429199, EF429197, NC001563, AY688948, DQ 176636, DQ318020, AY765264, AY277251, DQ256376. Además, se ha considerado además un sexto linaje evolutivo, identificado recientemente a partir de un aislado de un mosquito de Malasia, el de la cepa MP502-66 (cepa cuya región 3'NC está representada por SEQ ID NO:57 y cuyo gen de la envuelta tiene el número de acceso en GenBank AF196534), así como un séptimo linaje evolutivo, descubierto recientemente en España (aislado HU2925/06), que ha podido ser parcialmente secuenciado, considerándose también los fragmentos de secuencia que hasta ahora se conocen del mismo para que el método de la invención permitiera también su amplificación y detección en el caso de estar presente en una muestra.

Así, la PCR llevada a cabo con estos cebadores permite la amplificación, en todos los linajes conocidos, de un fragmento de la región 3'NC del genoma del virus, representado por SEQ ID NO:8, que corresponde concretamente al fragmento de cDNA de 93 nucleótidos comprendido entre las posiciones 10530 y 10622 en el genoma de la cepa Eg101 (número de acceso en GenBank AF260968, cuya secuencia completa se reproduce como SEQ ID NO:56). A su vez, las secuencias SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO. 10 presentan el fragmento amplificado, respectivamente, en virus de los linajes 6 (aislado MP502-66) y 7 (aislado HU2925/06).

El método tiene la particularidad de que los cebadores utilizados contienen secuencias degeneradas, con el objeto de cubrir con eficacia la amplificación de todas las variantes virales conocidas. En los métodos hasta ahora conocidos, por el contrario, se había considerado sólo la realización de la amplificación utilizando parejas de cebadores (o, como mucho, tripletes), cada uno de ellos con una secuencia fija específica. Por lo general, como se comenta en el apartado de "Antecedentes de la invención", la descripción de dichos métodos presentaba listas de oligonucleótidos, entre las cuales elegir el cebador directo y el cebador inverso. En la mayor parte de los casos, las secuencias de los cebadores se habían elegido considerando una única cepa, generalmente perteneciente al linaje más habitual en Norteamérica, el linaje 1, no siendo adecuados para el resto de los linajes o, incluso, no quedando cubiertas todas las cepas conocidas del linaje 1. Ello dificultaba la detección de cepas de WNV circulantes en Europa, África, Asia y Oceanía, que pertenecen a diferentes linajes del virus.

Tal como se ha comentado previamente, además, los ensayos descritos para ilustrar la aplicación de dichos métodos, como sucede con el método descrito en la solicitud de patente internacional WO 2004/036190, demuestran que, a pesar de que el diseño de los cebadores se realiza intentando optimizar parámetros tales como la homología de secuencia con la diana, la longitud o la temperatura de apareamiento, no todos los cebadores son equivalentes, observándose mucha disparidad en la eficacia de amplificación entre parejas de cebadores de secuencias muy similares. Ello demuestra la importancia de la secuencia específica de los cebadores elegidos y las dificultades que supone la elección de la pareja adecuada de cebadores para obtener una amplificación eficiente y reproducible de una cepa específica de WNV, a pesar de las técnicas de diseño de cebadores actualmente disponibles.

Sorprendentemente, a pesar de la homología de secuencia de los cebadores de la presente invención (representados por SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2) con algunos oligonucleótidos descritos en documentos previos relativos a la amplificación de WNV, en los que se observaban dificultades para obtener resultados de amplificación positiva con diversas parejas de cebadores dirigidos a la misma región del genoma del virus, los cebadores de la presente invención permiten la amplificación todos los linajes secuenciados hasta ahora de virus WNV, en todos los casos con alta sensibilidad, similar entre los distintos linajes (habiéndose observado valores de entre 2 y 20 moléculas de micro lito en los ensayos que se describen más adelante en los Ejemplos de la presente solicitud). Esto se ha conseguido eligiendo cuidadosamente la secuencia de los cebadores, introduciendo en ellos degeneraciones para que fueran capaces de cubrir todos los linajes conocidos pero, al mismo tiempo, procurando elegir cuidadosamente su secuencia para que el número de degeneraciones fuera mínimo y mantuvieran la condición de ser específicos para WNV. Así, tal como se demuestra en los ensayos descritos posteriormente en los Ejemplos de la presente solicitud, el método de la invención, a pesar de llevarse a cabo con cebadores degenerados (particularidad que no se había sugerido hasta ahora en los métodos relacionados conocidos), no da lugar a la amplificación de virus filogenéticamente muy próximos a WNV, como son los JEV, MVEV, SLEV o USUV. Esto demuestra que, a pesar de las dificultades que indicaban los ensayos y enseñanzas de documentos relacionados del estado de la técnica, se ha encontrado una pareja de cebadores con la secuencia adecuada para amplificar eficazmente todos los linajes conocidos de WNV y, al mismo tiempo, para permitir la realización de ensayos específicos que determinen la presencia o ausencia del virus en una muestra y no de otros virus filogenéticamente relacionados. Así, el método de la invención es particularmente adecuado para el análisis de muestras de seres humanos de cualquier procedencia, pudiendo determinar la presencia del virus en las mismas independientemente del linaje al que pertenezca, y permitiendo al mismo tiempo distinguir si el virus detectado es realmente WNV y no otro flavivirus. Esto facilita no sólo el análisis de las donaciones de órganos y sangre, en los cuales el estudio de la presencia del WNV es obligatorio en los Estados Unidos y está siendo discutido en Europa, sino también el diagnóstico de la presencia del virus en cualquier individuo, facilitando un tratamiento temprano, que impida el desarrollo de enfermedades neurológicas graves como la encefalitis.

En una realización preferida de la invención, la determinación de la presencia del virus en la muestra de partida se realiza a partir de la detección del fragmento amplificado en la reacción de PCR mediante el uso de una sonda complementaria a dicho fragmento y, por tanto, capaz de hibridar con el mismo. Para ello se utiliza el oligonucleótido que tiene como secuencia

5'-WCCCCAGGWGGACTG-3'

(SEQ ID NO:3)

opcionalmente unido a un marcador que permite su detección.

Al igual que los oligonucleótidos utilizados como cebadores, el oligonucleótido que forma parte de la sonda está también mínimamente degenerado, para cubrir los seis linajes virales para los que se conoce la secuencia del virus, así como el séptimo linaje viral parcialmente secuenciado.

La utilización de una sonda complementaria a la secuencia del fragmento amplificado ofrece distintas posibilidades para el diseño del método de detección utilizado. Así, por ejemplo, la complementariedad entre secuencias puede utilizarse, por ejemplo, en métodos cromatográficos, en los que la muestra en la que se encuentre el fragmento amplificado por PCR se ponga en contacto con la sonda inmovilizada (por ejemplo, por estar unida a las partículas de una resina empaquetada en una columna), con lo que la hebra complementaria a la sonda quedará unida a la misma y retenida, pudiendo ser posteriormente eluida. Para su detección puede utilizarse, por ejemplo, otra sonda marcada con oro coloidal.

Se prefiere particularmente que la amplificación del fragmento de secuencia genómica comprendido entre los cebadores se lleve a cabo mediante lo que se conoce como PCR en Tiempo Real, que es básicamente una PCR convencional que se realiza en presencia de moléculas que presentan al menos un resto con capacidad de emisión de fluorescencia (fluorocromos) y moléculas (puede ser la misma) con capacidad de aceptar la energía emitida por el fluorocromo (lo que habitualmente se conoce con el término *quencher*, que puede ser un fluorocromo también) de manera que, cuando las condiciones permiten que el *quencher* acepte la energía emitida por el primer fluorocromo, no puede detectarse emisión de fluorescencia (salvo que el *quencher* sea un fluorocromo a su vez); generalmente, como ocurre en el sistema conocido como TaqMan, el diseño de las moléculas es tal que sólo cuando la DNA polimerasa da lugar a que el fluorocromo se libere de la acción del *quencher* se emite fluorescencia, por lo que la fluorescencia emitida durante cada ciclo de PCR es proporcional a la cantidad de DNA que se está amplificando. La PCR en Tiempo Real se realiza en termocicladores que llevan incorporados un sistema de detección de fluorescencia que permite monitorizar, en tiempo real, lo que está ocurriendo dentro de cada tubo en cada ciclo de amplificación y sustituyendo los pasos de amplificación, electroforesis y análisis de imagen de una PCR tradicional. Además de la sencillez del proceso, la PCR en Tiempo Real se prefiere por su mayor sensibilidad y el hecho de que los resultados de cuantificación obtenidos en la misma son más reproducibles y precisos, porque la cuantificación se realiza en función del valor ciclo umbral (Ct), que se define como el ciclo a partir del cual la fluorescencia es estadísticamente significativa por encima del ruido de fondo.

Para el diseño de la PCR en Tiempo Real del método de la invención, se ha tenido en cuenta, como se ha comentado previamente, que WNV es un virus RNA de polaridad positiva. Por tanto, los ácidos nucleicos del virus presentes en la muestra a analizar serán moléculas de RNA. Así, es conveniente realizar la transcripción inversa de dicho RNA, para obtener las correspondientes moléculas de cDNA y poder utilizar dicho cDNA como molde para la amplificación por PCR. Por tanto, la etapa de amplificación de los ácidos nucleicos de WNV presentes en la muestra implica a su vez dos subetapas, la síntesis del cDNA a partir del RNA del virus presente en la muestra de partida, mediante una transcriptasa inversa; y la amplificación del cDNA mediante PCR en tiempo real utilizando como cebadores los oligonucleótidos de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2. Aunque la amplificación del RNA por PCR en tiempo real requiere realmente dos subetapas diferentes, el método puede diseñarse para que la reacción de transcripción inversa y la amplificación mediante PCR tengan lugar en un único paso, mezclando todos los reactivos necesarios (incluida la transcriptasa inversa) en el mismo tubo en el que tiene lugar la reacción de amplificación, lo que simplifica el proceso y minimiza las posibilidades de contaminación.

En cualquiera de los casos, la PCR en Tiempo Real implica la presencia de, al menos, una molécula/resto con capacidad para emitir fluorescencia. Se prefiere que la molécula a la que vaya asociada la capacidad de emitir fluorescencia y que, por tanto, permite la detección del fragmento de ácido nucleico amplificado, sea una sonda fluorogénica (capaz de emitir fluorescencia) que consiste en un oligonucleótido monocatenario complementario al fragmento de ácido nucleico amplificado en la reacción de PCR. La sonda, por tanto, debe tener una secuencia complementaria al fragmento de secuencia comprendido entre las posiciones a las que se unen los cebadores. Se prefiere particularmente que el oligonucleótido utilizado como sonda tenga la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:3, específicamente diseñada, como se ha comentado, para detectar con especificidad todos los linajes conocidos de WNV.

Se prefiere que el oligonucleótido utilizado como sonda esté marcado en 5' con un fluorocromo y que sea el extremo 3' el que lleve unido un compuesto capaz de aceptar la energía emitida por el fluorocromo, el llamado "*quencher*", siendo común entre los expertos en la técnica referirse a las sondas marcadas de esta manera como sondas TaqMan.

Un posible diseño de este tipo de sondas, como se ha comentado, consiste en que el *quencher* sea también un compuesto fluorocromo, que disipe la energía recibida del primer fluorocromo en forma de fluorescencia de mayor longitud de onda que la emitida por el primer fluorocromo, dependiendo la eficiencia del proceso de la distancia entre el primer fluorocromo y el *quencher*, de tal manera que, cuando la DNA polimerasa (Taq polimerasa por lo general) empieza a amplificar el cebador unido al DNA molde, desplaza el extremo 5' de la sonda, que es degradado por la actividad exonucleasa 5' -> 3' de la Taq polimerasa, liberando el fluorocromo al medio y separándolo del *quencher*, lo que ocasiona un aumento irreversible de la fluorescencia detectada.

Una alternativa a la anterior, que se prefiere particularmente para el método de la presente invención, es la de la configuración de las sondas comerciales conocidas como TaqMan® MGB™, en las que el *quencher* unido en 3' a la sonda es una molécula no fluorescente (NFQ: *Non Fluorescent Quencher*), que contiene un resto capaz de unirse al surco menor del DNA (lo que se conoce por la abreviatura MGB), pues este diseño de la sonda ofrece la ventaja de que la señal de fondo es menor, aumentando la precisión de la cuantificación, y de que el MGB estabiliza la sonda hibridada y eleva la temperatura de fusión (Tm: *melting temperature*), lo que facilita el uso como sonda de un oligonucleótido corto como el de SEQ ID NO:3, disminuyendo el riesgo de que alguno de los nucleótidos de la sonda no den lugar a apareamientos perfectos (riesgo de *mismatches*) con la secuencia diana. La sonda utilizada en los ensayos descritos en los ejemplos de la presente solicitud es una sonda del tipo TaqMan® MGB™, cuya secuencia de nucleótidos es la representada por SEQ ID NO:3 y que lleva unido en 5' el fluorocromo conocido como FAM (6-carboxifluoresceína).

En cuanto al paso previo de extracción del RNA presente en la muestra de partida, el mismo puede llevarse a cabo mediante cualquiera de las técnicas conocidas por los expertos en técnica.

En otra realización preferida del método de la invención, compatible con la anterior, el método incluye un control interno de reacción, que permite identificar los potenciales resultados falsos negativos debidos a problemas en la extracción o en la amplificación de las muestras.

Para llevar a cabo el método de la invención según esta realización preferida, se diseñó un control interno utilizando una estrategia similar a la descrita por Fedele y colaboradores (Fedele *et al.*, *J Clin Microbiol* 44:4464-4470 (2006)), adaptándola al método de la presente invención: se diseñó una pareja de oligonucleótidos, en cuyos extremos 5' se encuentran las secuencias de los cebadores directo e inverso utilizados para la detección de WNV, mientras que las secuencias de 3' son secuencias complementarias entre sí, que definen la secuencia de la sonda específica diseñada para la detección del control interno y que, tras aparearse, permiten la síntesis *in vitro* del control interno, por replicación del fragmento de secuencia no apareado.

En el caso específico del control interno utilizado en los Ejemplos de la presente solicitud, el control interno se sintetizó a partir de los siguientes oligonucleótidos:

5'-CGGAAGTYGRGTAKACGGTGCTGCCAGCACACATGTGTCTACT-3' (SEQ ID NO:4) (cebador CIWNF)

5'-CGGTWYTGAGGGCTTACRTGGAGTAGACACATGTGTGCTGG-3' (SEQ ID NO:5) (cebador CIWNRe)

en cuyos extremos 5' (nucleótidos subrayados) están las secuencias de los cebadores directo e inverso utilizados para la detección de WNV y que, por tanto, permiten la amplificación simultánea del control interno y del cDNA correspondiente a WNV, dando lugar a que la reacción de amplificación del WNV se convierta en una PCR competitiva en la que cDNA y control interno se amplifican a partir de los mismos cebadores.

De acuerdo con este diseño, el producto de la reacción de amplificación de los cebadores de SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5 (que, a su vez, actúan también como DNA molde) deberá contener en una de sus hebras la secuencia representada por:

5'-CGGAAGTYGRGTAKACGGTGCTG CCAGCACACATGTGTCTACT
CCAYGTAAGCCCTCARWACCG-3' (SEQ ID NO:6)

en donde el fragmento subrayado y en cursiva es la secuencia complementaria e invertida a la del cebador inverso diseñado para la amplificación de los ácidos nucleicos de WNV, el cebador de SEQ ID NO:2, mientras que el fragmento subrayado de 5' es la secuencia del cebador de SEQ ID NO:1.

En la reacción específica descrita en los Ejemplos de la presente memoria, el producto de amplificación representado por SEQ ID NO:6 se clonó en un plásmido bacteriano, utilizando el plásmido obtenido, una vez linearizado, como control de reacción. La clonación en un plásmido posibilita tener disponibles múltiples copias del fragmento de interés como control interno, tras el cultivo de bacterias previamente transformadas con dicho plásmido y el aislamiento de las copias del plásmido generadas. Alternativamente, el método de la presente invención puede incluir una etapa previa para obtener el control interno de reacción, en la que se sintetiza dicho control interno en una reacción en la que se amplifican los cebadores de SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5.

El fragmento heterólogo flanqueado por las secuencias correspondientes a los cebadores diseñados para la amplificación de WNV determina la secuencia de la sonda a utilizar para detectar la amplificación del control interno. Esta sonda hibridará con el producto de amplificación del control interno sólo si la reacción de amplificación no ha sido inhibida; la ausencia de señal para la misma indicará problemas en la reacción de amplificación y, por tanto, será un indicio de que la posible ausencia de señal para la sonda que detecta la amplificación de WNV no demuestra la ausencia del virus en la muestra de partida. Por todo ello, cuando se utiliza como control interno una molécula de

DNA que comprende la secuencia representada por SEQ ID NO:6, se prefiere que la sonda utilizada para su detección comprenda la secuencia de nucleótidos:

5'-CCAGCACACATGTGTCTACT-3'

(SEQ ID NO:7)

a la que esté covalentemente unido al menos un fluorocromo distinto del fluorocromo o fluorocromos unidos a la sonda que permite la detección del fragmento amplificado de WNV.

Con esta condición, un posible diseño para el método de la presente invención, tal como se presenta en los Ejemplos que aparecen más adelante en la presente solicitud, es que la sonda diseñada para la detección del control interno consista en la secuencia de SEQ ID NO:7, a la que esté covalentemente unido, en 5', el fluorocromo NED. Ello es compatible con la utilización de la secuencia representada por SEQ ID NO:3, marcada con 5' con FAM y covalentemente unida al complejo NFQ-MGB en 3', como sonda para la detección del fragmento amplificado de WNV.

La presencia de un control interno en la reacción de amplificación permite no sólo detectar problemas en la reacción de amplificación sino también, si se desea, en la fase de extracción. Para ello, en una posible realización alternativa del método de la invención, la molécula de DNA a utilizar como control interno puede añadirse a la muestra en la que se desea analizar la presencia de WNV previamente a la extracción del RNA, de manera que el método incluye la copurificación del virus y del control interno. Esta realización permite la detección de problemas debidos a una extracción deficiente de los ácidos nucleicos presentes en la muestra de partida.

Según se ha descrito, la puesta en práctica del método de la presente invención requiere la utilización de la pareja de cebadores específicamente diseñada para dicho método, los cebadores de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, que permiten la amplificación específica de todos los linajes conocidos de WNV, con una sensibilidad similar para los seis linajes de los que se dispone la secuencia del genoma, permitiendo también la amplificación del séptimo linaje recientemente identificado. Preferiblemente, la utilización de esos cebadores se lleva a cabo en conjunción con la sonda de SEQ ID NO:3, en especial si está marcada con algún marcador que permite su detección, tal como un fluorocromo. En el caso de optarse por utilizar un control interno, son complementos interesantes también la sonda que permite la detección de dicho control interno (SEQ ID NO:7), especialmente si está marcada con otro fluorocromo, así como los cebadores que permiten la síntesis del fragmento de interés como control interno (SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6) o bien el propio control interno ya sintetizado, bien en forma de molécula de DNA que comprenda de manera independiente el fragmento de interés (SEQ ID NO:6) o bien con dicho fragmento incluido en una molécula mayor, tal como un plásmido.

Por todo ello, es un aspecto adicional de la invención un kit que comprende los elementos que permiten llevar a cabo el método de la invención. Dicho kit comprenderá, al menos, los oligonucleótidos de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2.

Preferiblemente, el kit comprenderá también la sonda con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:3. Se preferirá especialmente que la sonda tenga el diseño de la sonda utilizada en los Ejemplos de la presente solicitud, con un fluorocromo unido covalentemente en 5' y un *quencher* no fluorescente unido a un resto MGB en 3'.

Se prefiere especialmente que el kit comprenda también los elementos para la utilización de un control interno. Así, se prefiere que el kit comprenda la sonda de SEQ ID NO:7, marcada con un fluorocromo distinto del de la sonda de SEQ ID NO:3. Opcionalmente, el kit puede comprender los oligonucleótidos de SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5, que permitirán la síntesis del fragmento de interés como control interno o, como alternativa, una molécula de DNA que comprenda la secuencia representada por SEQ ID NO:6, molécula de DNA que puede ser un plásmido. En ese caso, incluso, el kit podría comprender también bacterias susceptibles de ser transformadas con dicho plásmido u, opcionalmente, bacterias ya transformadas con el plásmido, cuyo cultivo permitiría la replicación del plásmido y la obtención de múltiples copias del mismo y, *por ende*, del fragmento de interés como control interno de amplificación, que puede ser utilizado también como control interno de apropiada extracción de ácidos nucleicos a partir de la muestra de partida.

Así, una posible realización del kit es la que comprende los elementos utilizados en los Ejemplos de la presente solicitud:

- los oligonucleótidos de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2;
- el oligonucleótido de SEQ ID NO:3, marcado en 5' con FAM y en 3' con un *quencher* no fluorescente que incluye un MGB;
- el oligonucleótido de SEQ ID NO:7, marcado en 5' con NED; y
- los oligonucleótidos de SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5, o bien
- un plásmido que comprende la secuencia representada por SEQ ID NO:6.

La invención se explicará ahora con más detalle por medio de los Ejemplos y Figuras que aparecen a continuación, que sirven para ilustrar posibles realizaciones de dicha invención.

5 Ejemplos

Ejemplo 1

Obtención de los plásmidos de interés

Se obtuvieron plásmidos para ser utilizados como control interno de amplificación y, para cada linaje, con el fin de obtener un molde cuantificable para ser usado en la optimización de algunas técnicas. Dichos plásmidos se utilizaron para calcular la sensibilidad de la técnica.

Los plásmidos de los linajes 1, 2, 3 y 6, los plásmidos se obtuvieron insertando fragmentos amplificados a partir de cepas virales previamente cultivadas.

Para los linajes 4 y 5, se recurrió a DNAs sintéticos que contienen las mismas secuencias que las cepas originales.

El método incorpora además un control interno de reacción en cada tubo de reacción para identificar los potenciales resultados falsos negativos debidos a problemas en la extracción o en la amplificación de las muestras. El control interno se amplifica con los mismos oligonucleótidos que amplifican la región diana viral, pero tiene un fragmento heterólogo sobre el que se diseña la sonda de detección. El fragmento de interés como control interno se clonó también en un plásmido, el cual, una vez linearizado, fue utilizado como control interno.

1.1. Obtención de los productos de amplificación

Tal como se ha comentado, para los linajes 1, 2, 3 y 6, se obtuvo un fragmento de amplificación a partir de virus aislados tras un cultivo previo de las correspondientes cepas virales. Las cepas utilizadas fueron:

- Linaje 1: WNEg101 (GenBank: AF260968)
- Linaje 2: WNArB3573/82 (GenBank: DQ318020)
- Linaje 3: WNRabensburg (GenBank: AY765264)
- Linaje 6: MP502-66 (región 3'NC, representada por SEQ ID NO:57).

Para la realización del aislamiento de los distintos virus se emplearon cultivos celulares de células Vero E6 (adquiridas a la (para cultivar las cepas del linaje 1, 2 y 6) y células C6/36 (para cultivar la cepa correspondiente al linaje 3). Los detalles relativos a cada una de estas líneas celulares y su cultivo fueron los siguientes:

- *Células Vero E6*: Es un linaje continuo de células epiteliales de riñón de mono verde africano. La línea Vero E6 deriva del clon de Vero 76 que presenta mayor susceptibilidad a la infección por algunos arbovirus. Las células fueron adquiridas de la *American Type Culture Collection* (ATCC - <http://www.lgcpromochem-atcc.com>). Para su cultivo, las células fueron mantenidas en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM, Sigma) suplementado con suero fetal bovino al 10% (SFB, Gibco-Invitrogen) al que previamente se le había añadido penicilina y estreptomina (20.000 U/mL, Biowhitaker) y L-Glutamina (200 mM, Biowhitaker). El crecimiento celular se realizó en una estufa a 37°C y en un ambiente sin atmósfera de CO₂. Para el mantenimiento de la línea celular se realizaron pases seriados mediante desprendimiento del tapiz confluyente con tripsina-verseno, constituida por 100 ml de tripsina al 2,5% en 1 litro de verseno. Una vez desprendido, se diluyó la tripsina-verseno añadiendo la cantidad de medio de crecimiento adecuado para la realización de la dilución necesaria para hacer el pase en base a la superficie del recipiente a utilizar.

Para llevar a cabo las infecciones se utilizaron cultivos aproximadamente al 80% de confluencia de la monocapa celular, en frascos de 25 cm² de superficie. Para ello se retiró el medio de los frascos y se añadieron 1 ml de EMEM al 2% de SFB, tras lo cual se agregaron 100 ó 50 µl dependiendo de la muestra. Se dejó un frasco sin infectar como control de células. El inóculo viral se dejó adsorber 1 hora a 37°C en agitación, y una vez transcurrido este tiempo se añadieron 7 ml de medio EMEM al 2% de SFB y se incubaron en estufa a 37°C en ausencia de CO₂, observándose diariamente al microscopio para detectar algún posible ECP (efecto citopático).

- *Células C6/36/HT*: Es una línea celular obtenida a partir de *Aedes albopictus* donada por el Laboratorio Central de Veterinaria, Algete, Madrid. Es un clon de las C6/36 que se ha adaptado a crecer a 33°C en vez de a 28°C, mejorando así la capacidad de replicación viral. Fueron cultivadas en EMEM al 2% de SFB y suplementado al 1% de aminoácidos no esenciales (aa-NE), penicilina, estreptomina y glutamina, y al 0,1% de vitaminas. El crecimiento celular se realizó en

una estufa a 33°C y en un ambiente sin atmósfera de CO₂. La infección se llevó a cabo empleando el mismo protocolo que el descrito para las células Vero E6, con las diferencias necesarias para adecuarlo a las C6/36 como son: el medio de cultivo, la temperatura de incubación y la ausencia de CO₂.

5 Tanto en el caso de las células Vero E6 como en el de las C6/36/HT, las infecciones se mantuvieron hasta que se observó un ECP de aproximadamente el 80% de la monocapa celular, procediéndose entonces a la recogida viral.

10 Todos los procedimientos que implicaron la presencia o uso de virus cultivado no inactivado se realizaron en las instalaciones de seguridad biológica de nivel 3 (NSB-3) disponibles en el Centro Nacional de Microbiología (Majadahonda, Madrid, España).

15 - *Extracción del RNA viral:* Para llevar a cabo la extracción se utilizó el equipo comercial QIAamp Viral RNA (Qiagen, Izasa, España), siguiendo las recomendaciones del fabricante, que fueron las siguientes:

140 µl del sobrenadante de la muestra se añadió a un tubo con 560 µl del tampón de lisis viral AVL (que inactiva el virus y sirve para la extracción del RNA viral), presente en el kit QIamp viral RNA. La muestra se sometió a agitación con un vórtex durante 5 segundos y se centrifugó durante 10 minutos a 13.000 rpm para limpiarla de restos celulares. A esta mezcla se añadieron 500 µl de etanol absoluto, se agitó volteando el tubo de arriba a abajo y se dio un pulso de centrifugación. Posteriormente se transfirió la muestra a una columna QIAamp (para la unión del ARN) y se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto en una microcentrífuga a 4°C. Todas las centrifugaciones a partir de aquí se realizaron a una temperatura de 22°C. Se eliminó el filtrado y se realizaron dos lavados consecutivos con 500 µl de los tampones AW1 y AW2 respectivamente, añadiendo el tampón a la columna y centrifugando en cada paso a 13.000 rpm durante 1 minuto en el primero y 5 minutos en el segundo. Para secar la membrana y eliminar restos de etanol, se retiró nuevamente el filtrado y se centrifugó a 13.000 rpm durante 2 minutos. Finalmente, los ácidos nucleicos se eluyeron en 60 µl de tampón AVE (agua libre de RNasas), que se añadió a la columna y se incubó durante 2 minutos antes de centrifugar el tubo a 13.000 rpm durante 2 minutos. El eluido obtenido, que contenía el ARN extraído de la muestra, se almacenó a -80°C hasta su posterior utilización.

30 En los casos en los que se desea que se produzca copurificación del virus y control interno, la molécula de DNA a utilizar como control interno se añade a la muestra en la que se desea analizar la presencia de WNV previamente a la extracción del RNA. Para ello, se añaden al tampón AVL 400 copias del control interno (CI).

Una vez extraído el RNA viral, se procedió a su amplificación.

35 - *Amplificación:* Una vez obtenido el RNA de cada cepa viral, lo primero que se hizo fue comprobar que realmente se había obtenido el RNA viral. Para ello se llevó a cabo una RT-Nested-PCR genérica para flavivirus (Sánchez-Seco *et al.*, *Tropical Medicine & International Health* **11**: 1432-1441 (2006)). Una vez comprobado el tamaño de banda correspondiente, se llevó a cabo la obtención del cDNA de las cepas virales, para lo cual, se añadieron 5 µl del RNA extraído y 1 µl de hexámeros *random* (280 pmol/µl) y se incubaron 5 minutos a 70°C en el termociclador. Una vez llevada a cabo esta reacción, se añadieron a cada muestra 14 µl de la siguiente mezcla:

	<u>Reactivo</u>	<u>Volumen</u>
45	Agua	6,4 µl
	Tampón 5x ()	4 µl
50	dNTPs (25 mM)	0,4 µl
	DTT (0,1Ml)	2 µl
55	RNAsina (Applied-Biosystem)	0,2 µl
	RT Super Script III (Invitrogen)	1 µl

60 y se incubaron 45 minutos a 48°C, seguido de 5 minutos a 70°C, con 4°C para el mantenimiento del producto obtenido hasta el momento de su uso.

65

Una vez obtenido el cDNA, se amplificó el fragmento elegido para la invención empleando los cebadores de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 en una PCR convencional, y posteriormente se clonó. Para la amplificación del fragmento se añadió 1 μ l de cDNA a 49 μ l de la siguiente mezcla de reacción:

5

	<u>Reactivo</u>	<u>Volumen</u>
	Agua estéril	36,5 μ l
10	Tampón 10x II (Applied-Biosystem)	5 μ l
	Cl ₂ Mg (25 mM) (Applied-Biosystem)	5 μ l
	dNTPs (25 mM)	1 μ l
15	Cebador WNRT-F (100 pmol) (SEQ ID NO:1)	0,5 μ l
	Cebador WNRT-Re (100 pmol) (SEQ ID NO:2)	0,5 μ l
20	Taq Polimerasa (Applied-Biosystem)	0,5 μ l

25

La reacción se inició con una desnaturalización inicial del cDNA y activación de la polimerasa de 5 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C de hibridación y 1 minuto a 72°C de elongación, seguida de una elongación final de 5 minutos a 72°C con 4°C para el mantenimiento del producto.

30

- *Visualización y purificación de la banda:* Una vez finalizada la reacción de amplificación, la visualización de los productos resultantes se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa. Para ello se prepararon geles de agarosa (MS8, Hispanlab, España) al 2%, en tampón tris-borato-EDTA (TBE), teñidos con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 μ g/ml. De cada muestra se cargaron 10 μ l en los geles tras añadirle un tampón de carga que contenía un 30% de glicerol en agua, 0,25% de azul de bromofenol y 0,25% de xileno-cianol. El marcador de peso molecular empleado fue un patrón de ADN comercial de 1 Kb (Invitrogen) a una concentración de 100 ng/ μ l. La electroforesis se desarrolló en TBE a una intensidad de corriente eléctrica de 100 voltios durante aproximadamente 30 minutos, visualizándose los productos de amplificación bajo luz UV. Los productos de amplificación detectados en el gel de agarosa y con un tamaño similar al esperado, fueron purificados para su posterior secuenciación e identificación. Este proceso se realizó con dos técnicas diferentes:

35

40

- Si en el gel se observaba una única banda y del tamaño esperado, la purificación se hizo con el equipo QIAquick PCR Purification (Qiagen). La muestra se transfirió a un tubo eppendorf de 1,5 ml con 200 μ l de tampón PB, se mezcló y se añadió a una columna de purificación. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente. Tras eliminar el eluido, se lavó la columna con 750 μ l de tampón PE, centrifugando a 13.000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente. Para secar la membrana de la columna se realizó otra centrifugación a la misma velocidad y la misma duración. La columna se colocó en un tubo eppendorf de 1,5 ml, se le añadieron 30 μ l de agua destilada, y tras dejar que la columna se empapase durante 1 minuto, se centrifugó durante otro minuto a 13.000 rpm para la obtención del purificado, el cual se conservó a - 20°C hasta su secuenciación.

45

50

- Si en el gel de agarosa se observaban varias bandas de diferentes tamaños, el producto de amplificación se volvió a visualizar, pero esta vez en geles de agarosa de bajo punto de fusión (Sigma) al 1%. La banda del tamaño esperado se cortó del gel con un bisturí y se purificó con el equipo QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Se pesó el tubo eppendorf que contenía la agarosa cortada y se le añadieron 300 μ l de tampón QC por cada mg de agarosa. A continuación se realizó una incubación a 50°C en un termobloque durante 10 minutos, hasta la total disolución de la agarosa. Seguidamente se añadieron 100 μ l de isopropanol frío por cada mg de agarosa. La mezcla resultante se hizo pasar por una columna de purificación centrifugando a 13.000 rpm durante 1 minuto y a temperatura ambiente. Se eliminó el eluido y se lavó la columna con 750 μ l de tampón PE, centrifugando a 13.000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente. Para secar la membrana de la columna se realizó otra centrifugación a la misma velocidad y con la misma duración. La columna se colocó entonces en un tubo eppendorf de 1,5 ml y se le añadieron 30 μ l de agua destilada, tras 1 minuto de incubación se centrifugó durante 1 minuto y a 13.000 rpm para la obtención del purificado, que se conservó a - 20°C hasta su secuenciación.

55

60

Una vez obtenido el DNA puro, se llevó a cabo la construcción de los plásmidos de interés que incluían los productos amplificados, para su posterior cuantificación.

65

1.2. Clonación de los productos amplificados

Se utilizó el equipo comercial de clonación TOPO TA Cloning® (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema fue elegido por la eficacia con la que se obtienen transformantes que han incorporado el

plásmido y porque todos los requerimientos del proceso de ligación están incluidos en el equipo comercial. La técnica consiste en la inserción del producto amplificado (previamente purificado) en el vector pCR® 4-TOPO (TopoTA). Para ello, lo primero es ligar el producto amplificado al plásmido mediante la siguiente reacción:

5	<u>Reactivo</u>	<u>Volumen</u>
	Agua	2 µl
	Solución salina	1 µl
10	Inserto (amplificado purificado)	2 µl
	Vector pCR® 4-TOPO	1 µl

15 Se dejan atemperar los reactivos antes a Tª ambiente, se agita la mezcla con los dedos y se incuba 30 minutos a Tª ambiente.

1.3. Transformación en bacterias

20 Los productos obtenidos se emplearon para transformar un cultivo de células competentes de *E. coli* para obtener una mayor cantidad del plásmido recombinante. Para ello se usaron células bacterianas, químicamente competentes, de *E. coli* (One Shot® TOP10 Competent Cells, de Invitrogen). El plásmido contiene el gen de resistencia a la Ampicilina, que sirve para seleccionar las bacterias transformadas, al ser las únicas con capacidad de crecer en presencia de dicho antibiótico. Para ello se mezclaron 5 µl de plásmido ligado al vector con 50 µl de células competentes, y se incubaron en hielo durante 30 minutos, transcurridos los cuales se dio un choque de temperatura a la mezcla (30 segundos a 42°C) para facilitar la entrada del DNA a las células, y se volvió a incubar en hielo durante 5 minutos. Tras este tiempo, se añadieron al tubo que contenía esta mezcla 250 µl de medio SOC, que es un medio enriquecido para favorecer la recuperación de las bacterias. Se incubó durante 1 hora en agitación y se sembró todo el producto de la transformación en una placa Petri que contenía medio sólido LB con Ampicilina, extendiéndolo por toda la placa con un asa de siembra. Tras invertir la placa, se incubó durante toda la noche a 37°C.

35 Las colonias que crecieron en el medio sólido selectivo, se cultivaron individualmente en un tubo con medio líquido de LB con Ampicilina, incubándolo en agitación a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, se comprobó la presencia del plásmido esperado en las células del cultivo mediante una PCR, para ello se añadieron 5 µl del cultivo bacteriano en una mezcla de reacción que contenía los cebadores adecuados para amplificar el inserto clonado y se comprobó en un gel de agarosa al 2% el tamaño del fragmento amplificado.

40 Una vez comprobada la presencia del plásmido de interés en cada caldo se procede a la purificación del mismo. Posteriormente se comprueba la ausencia de mutaciones en la zona de interés mediante secuenciación del inserto a partir del plásmido.

1.4. Purificación del DNA plasmídico

45 Se extrajo el DNA plasmídico de aquellos caldos en los que crecieron bacterias con el plásmido esperado y se llevó a cabo con el equipo comercial QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Para ello se centrifugó el caldo y el pellet celular se resuspendió en 250 µl de buffer P1 y se transfirieron a un eppendorf de 1,5 ml. Se añadieron 250 µl de buffer P2 y se mezcló invirtiendo el tubo 3-4 veces. A continuación se añadieron 350 µl de buffer N3 y se mezcló invirtiendo el tubo 3-4 veces. Se centrifugó durante 10 minutos a 13.000 rpm. El sobrenadante se pasó por una columna del kit y se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto. A continuación se lavó la columna con 750 µl de buffer PE centrifugando durante 1 minuto a 13.000 rpm. Se tiró el eluido y se volvió a centrifugar para secar la membrana de la columna. Por último se añadieron 50 µl de buffer EB para eluir el plásmido purificado.

1.5. Secuenciación del inserto clonado

55 Para comprobar la ausencia de mutaciones en la zona donde hibridan los cebadores y la sonda en el inserto clonado se procedió a su secuenciación. Para ello se utilizó el equipo comercial ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing v2.0 Ready Reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA), empleando un cebador en cada reacción con el fin de sintetizar de forma individual fragmentos de cada hebra de DNA, según la siguiente reacción:

65	<u>Reactivo</u>	<u>Volumen</u>
	Agua	4,2 µl
	Big Dye	3 µl
	Plásmido	2 µl
	Cebador M13 (Forward o Reverse) [20µM]	0,8 µl

La reacción se inició con una fase de desnaturalización inicial del DNA y activación de la polimerasa de 5 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C de hibridación y 1 minuto a 72°C de elongación, seguida de una elongación final de 5 minutos a 72°C con 4°C siempre.

- 5 Los fragmentos de DNA sintetizados se secuencian empleando un secuenciador automático ABI model 377 automated sequencer (Applied Biosystems).

1.6. Linearización del DNA plasmídico

- 10 Una vez purificado el plásmido de interés, se procedió a cuantificar el DNA en un espectro fotómetro (NanoDrop® LCR) y posteriormente se linearizó. Para ello se eligió una enzima de restricción que cortara una sola vez en el plásmido pero que no tuviera dominio de reconocimiento en la secuencia de interés clonada. Las enzimas elegidas fueron SnaBI (Promega) para los plásmidos de los linajes 1, 2, 3, 4, 6, y para el control interno, mientras que se usó
- 15 AlfIII (BioLabs) para el linaje 5. La reacción se incubó toda la noche en baño a 37°C y fue la siguiente:

<u>Reactivo</u>	<u>Volumen</u>
Agua	variable µl
Tampón 10x	5 µl
Plásmido	5-10 µl
BSA	1 µl

- 25 La cantidad de DNA a cortar depende de la concentración. El cálculo en moléculas se lleva a cabo utilizando la fórmula de Avogadro, ya que el equipo de espectrometría NanoDrop® da la concentración en nanogramos/microlitro.

30 1.7. Obtención de quimeras virales

- Debido a la no disponibilidad de genoma viral perteneciente a los linajes 4 y 5 en el laboratorio de los inventores, se construyeron quimeras de DNA (DNAs sintéticos) que contenían las secuencias, en la región seleccionada para el diseño de la PCR en Tiempo Real, de los virus pertenecientes a cada uno de estos linajes, en concreto se trata de
- 35 las secuencias correspondientes a los siguientes números de acceso a la base de GenBank AY277251 (aislado LEIV-Krnd88-190) y DQ256376 (cepa 804994), respectivamente.

Para ello se diseñaron dos cebadores, de un tamaño aproximado para ambos de 60 nucleótidos, con un fragmento solapante de aproximadamente 20 nucleótidos para que pudiese iniciarse la reacción de amplificación.

- 40 Para el aislado LEIV-Krnd88-190 (GenBank: AY277251), los cebadores fueron:

5'GCCGCCACCGGAAGTTGGGTATACGGTGCCTGTGACCCAACCCAGGAGGACTGGGAT - 3'
(SEQ ID NO:52) (cebador directo 4WNQF, nucleótidos 10470-10530 del aislado LEIV-Krnd88-190).

- 45 5'TTCCGAAACGGTATTGAGGGCTTACGTGGATCGCTCCATGGCTTTGATATCCCAGTCCTCCTGGG
GT-3' (SEQ ID NO:53) (cebador inverso 4WNQRe, nucleótidos 10512-10578 del aislado LEIV-Krnd88-190)

- 50 Para la cepa 804994 (GenBank: DQ256376), los cebadores fueron:

5'TCCGCCACCGGATGTTGAGTAGACGGTGCCTGCGTCTCAACCCAGGAGGACTGGGTG - 3'
(SEQ ID NO:54) (cebador directo 5WNQF, nucleótidos 10509-10570 de la cepa 804994)

- 55 5'CTTCCGAGGCGGTTCTGAGGGCTTACATGGATCGCTCCGCAGCTTTGTTACCCAGTCCTCCTGG
GGTT-3' (SEQ ID NO:55) (cebador inverso 5WNQRe, nucleótidos 10551-10619 de la cepa 804994).

- 60 En las secuencias de estos cebadores, los fragmentos subrayados corresponden a las zonas en las que hibridarían los cebadores de la PCR en Tiempo Real, WNRT-F (SEQ ID NO:1) en el caso de los cebadores directos y WNRT-Re (SEQ ID NO:2) en el caso de los cebadores inversos.

- Así, para ambas quimeras se consiguieron fragmentos de unos 140 pb. Dichos fragmentos de amplificación se obtuvieron llevando a cabo una PCR convencional, utilizando como parejas de cebadores SEQ ID NO:52 y SEQ ID NO:53 para la quimera del linaje 4 y SEQ ID NO:54 y SEQ ID NO:55 para la del linaje 5. La reacción se inició con una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de 30 segundos a 95°C y 1 minuto a 72°C, con una elongación final de 10 minutos a 72°C.

Una vez obtenida esta banda, se purificó con el kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se clonó en plásmidos tal como se indica en la sección 1.2. El plásmido obtenido fue cuantificado (medida de la cantidad de DNA en un espectrofotómetro) y posteriormente fue empleado en los ensayos de la PCR en Tiempo Real.

1.8. Obtención y optimización del control interno

Tal como se ha mencionado previamente, el método incorpora además un control interno de reacción en cada tubo de reacción para identificar los potenciales resultados falsos negativos debidos a problemas en la amplificación de las muestras. El control interno se amplifica con los mismos oligonucleótidos que la región diana viral, pero tiene un fragmento heterólogo sobre el que se diseña la sonda de detección. El fragmento de interés como control interno se clonó también en un plásmido, el cual, una vez linearizado, fue utilizado como control interno.

Como control interno (CI) se usó un abordaje similar al descrito por Fedele y colaboradores antes mencionado, adaptado a este caso en concreto, para lo que se siguió el mismo proceso que para la obtención de las quimeras de los linajes 4 y 5. Es decir, se diseñaron cebadores solapantes que en los extremos contuviese las secuencias de los cebadores de la PCR en Tiempo Real y en el interior una secuencia exógena de un virus, en este caso el virus BK, que determina la secuencia que se utilizará como sonda para detectar el control interno. Se trata de una sonda TaqMan, pero marcada con otro fluorocromo, NED, evitando así interferencias con la diseñada para WNV. Los cebadores para amplificar el CI y para amplificar WNV son los mismos, por lo que se trata de una PCR competitiva.

Como se ha comentado previamente, en este caso el control interno se sintetizó a partir de los siguientes oligonucleótidos:

5'-CGGAAGTYGRGTAKACGGTGCTGCCAGCACACATGTGTCTACT-3' (SEQ ID NO:4) (cebador CIWNF)

5'-CGGTWYTGAGGGCTTACRTGGAGTAGACACATGTGTGCTGG-3' (SEQ ID NO:5) (cebador CIWNRe)

en cuyos extremos 5' (nucleótidos subrayados) están las secuencias de los cebadores directo e inverso utilizados para la detección del WNV y cuya amplificación da lugar a un fragmento de DNA que deberá contener en una de sus hebras la secuencia representada por:

5'-CGGAAGTYGRGTAKACGGTGCTG CCAGCACACATGTGTCTACT
CCAYGTAAGCCCTCARWACCG-3' (SEQ ID NO:6)

en donde el fragmento subrayado y en cursiva es la secuencia complementaria e invertida a la del cebador inverso diseñado para la amplificación de los ácidos nucleicos de WNV, el cebador de SEQ ID NO:2, mientras que el fragmento subrayado de 5' es la secuencia del cebador de SEQ ID NO:1. El fragmento situado entre ambos determina la secuencia a utilizar como sonda.

Concretamente, la sonda utilizada para la detección del control interno fue la siguiente:

5'-NED-CCAGCACACATGTGTCTACT-MGB-NFQ (SEQ ID NO:7)

El producto de amplificación representado por SEQ ID NO:6 se clonó en un plásmido bacteriano, utilizando el plásmido de interés obtenido, una vez linearizado, como control de reacción, de forma análoga a la descrita en los apartados previos 1.2 - 1.5. Una vez obtenido el plásmido, se procedió a optimizar las condiciones para su utilización. Al plásmido linearizado se alude posteriormente en otros ejemplos como "CI" (Control Interno).

Para llevar a cabo la optimización se partió de diluciones seriadas en base 10 desde 10.000 a 1 copias/reacción y se utilizó agua estéril como control negativo, ensayándose todos ellos por duplicado. Para ello, se preparó la siguiente mezcla de reacción:

<u>Reactivo</u>	<u>Volumen</u>
Agua estéril	17.2 µl
Tampón 2x (Applied-Biosystem)	25 µl
Cebador WNVRT-F (100 pmol)	0.4 µl
Cebador WNVRT-Re (100 pmol)	0.4 µl
Sonda CI (5 µM)	2 µl

Se añadieron a cada tubo 45 μ l de dicha mezcla y 5 μ l de la dilución a ensayar del CI. La reacción se inició con una desnaturalización inicial y activación de la polimerasa de 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

Los resultados se representan en la Fig. 1, en la que se puede observar que se llegó a una detección límite de 10 copias/reacción.

Por analogía con métodos análogos previamente diseñados en el laboratorio del grupo de los inventores, se decidió usar como control interno para las reacciones de amplificación viral una cantidad equivalente a 20 veces el límite de detección, es decir 200 copias/reacción.

Ejemplo 2

Desarrollo de la PCR en Tiempo Real

2.1. Elección de los cebadores

Para hacer la elección de los cebadores y la sonda, se analizaron en el programa Primer Express (Primer Express® Software v2.0, Applied Biosystems) secuencias representativas de cada linaje (linaje 1: NY99eqhs (GenBank: AF260967); linaje 2: B956 (GenBank: AY532665); linaje 3: Rabensburg (GenBank: AY765264); linaje 4: LEIVKrnd88190 (GenBank: AY277251); linaje 5: 804994 (GenBank: DQ256376), linaje 6: MP502-66 (SEQ ID NO:57)). Se eligió en la región 3'NC una propuesta de cebadores y sondas que, tras ser modificados con introducción de posiciones degeneradas, fuesen teóricamente capaces de amplificar y detectar todos los posibles linajes de WNV.

Inicialmente, tal como se detalla en el Ejemplo 3, se eligieron como parejas de cebadores los siguientes:

WNVRT-F: 5'-CGGAAGTYGRGTAKACGGTGCTG-3' (SEQ ID NO:1)

WNVRT-R1: 5'-CGAGACGGTWYTGAGGGCTTAC-3' (SEQ ID NO:51)

y como sonda, una sonda con la configuración de las sondas TaqMan MGB (sonda doblemente marcada, con la estructura donador-FAM-oligonucleótido-MGB-aceptor), con la siguiente secuencia:

5' FAM-WCCCCAGGWGGACTG-3' (SEQ ID NO:3),

marcada en 5' con el fluorocromo FAM.

Sin embargo, tal como se comenta posteriormente en el Ejemplo 3, los ensayos de especificidad realizados con JEV, MVEV, SLEV y USUV, dieron lugar a detección para de todos ellos excepto para SLEV. Por ello, se revisaron los cebadores y la sonda y se realizó un cambio en el cebador inverso, desplazándolo 4 posiciones en el genoma (se añadieron 4 nucleótidos en su extremo 3'), incorporándole una nueva degeneración y acortándolo en su extremo 5'. La sonda no se modificó. De esta manera, la pareja de cebadores finalmente elegida fue la siguiente:

WNVRT-F: 5'-CGGAAGTYGRGTAKACGGTGCTG-3' (SEQ ID NO:1)

WNVRT-Re: 5'-CGGTWYTGAGGGCTTACRTGG-3' (SEQ ID NO:2)

que determinan el fragmento de secuencia genómica del virus comprendido entre los nucleótidos 10530 y 10622 en el genoma del aislado WNV Eg101 (número de acceso en GenBank AF260968, cuya secuencia completa se reproduce como SEQ ID NO:56).

El proceso para el que se necesitan estos cebadores y sonda, como se ha comentado, es una PCR en Tiempo Real en dos pasos, consistiendo el primero en la obtención de cDNA de las muestras a analizar (SuperScript™ III Reverse Transcriptase, Invitrogen) y posteriormente amplificación por PCR (TaqMan® Universal PCR Master Mix, No Amperase® UNG, Applied Biosystem). Por ello, se procedió a optimizar las condiciones de reacción para los reactivos elegidos.

El parámetro a tener en cuenta en la optimización de la reacción es el denominado ciclo umbral (Ct o *Threshold Cycle*), que es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas de molde.

2.2. Optimización y validación de la PCR en Tiempo Real

La cepa utilizada como molde fue la cepa de referencia Eg101 del linaje 1 de WNV. Se amplificó este fragmento primero en una PCR convencional, utilizando los cebadores diseñados para la PCR en Tiempo Real.

El fragmento amplificado se purificó y clonó en un plásmido, siguiendo el procedimiento especificado en el Ejemplo 1. El plásmido resultante fue purificado, cuantificado y linearizado, tras lo cual se obtuvieron diluciones con concentraciones finales conocidas en número de copias/ μ l para poder llevar a cabo la optimización. Todos estos pasos se siguieron de forma análoga a la descrita en los ensayos previos.

Para encontrar las condiciones óptimas, se fueron variando en primer lugar la concentración de los cebadores (desde 10 a 40 pmol) y después la concentración de la sonda (desde 50 a 400 pmol).

Las condiciones finales de reacción fueron las siguientes:

TABLA 5

Mezcla de reacción de PCR en Tiempo Real

Reactivo	Volumen
Agua estéril	17.2 μ l
Tampón 2x (Applied-Biosystem)	25 μ l
Cebador WNVRT-F (100 pmol)	0.4 μ l
Cebador WNVRT-Re (100 pmol)	0.4 μ l
Sonda WN (5 μ M)	4 μ l
Sonda CI (5 μ M)	2 μ l
CI 10^4	1 μ l

Se añadieron a cada tubo 45 μ l de la mezcla y se cargaron con 5 μ l de la muestra. La reacción se inició con una desnaturalización inicial y activación de la polimerasa de 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.

Los resultados obtenidos para el linaje (cepa Eg101) se representan en la Fig. 2. Una vez obtenidos, se hizo una prueba con los plásmidos linealizados correspondientes a los linajes del 1 al 5 cuya obtención se describe en el Ejemplo 1, y con la cepa MP502-66. Para calcular la sensibilidad de cada uno de los diferentes linajes, se utilizaron concentraciones para cada muestra que variaron desde 10^4 a 0,1 copias/reacción, ensayando por duplicado cada dilución. Para cada una de las seis muestras (linajes 1 a 5 y MP502-66) se llegó a un límite de detección aproximado de 5 a 20 copias/ μ l.

En este mismo ensayo se probó la detección de la muestra correspondiente al aislado HU2925/06, que se considera perteneciente a un séptimo linaje. Para ello se obtuvo cDNA a partir del RNA de la muestra, de manera análoga a la descrita previamente para otros linajes, y se ensayaron por duplicado las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} del cDNA obtenido. Tal como se representa en la Fig. 3, la dilución 10^{-3} no se detectó en ninguno de los dos tubos. Se consiguió sólo un resultado positivo para la dilución 10^{-2} , y hubo señal en ambos tubos al utilizar la 10^{-1} .

2.3. Especificidad viral

Se comprobó la especificidad de la reacción al obtener resultados negativos en la amplificación de genomas de otros flavivirus del serocomplejo de la encefalitis japonesa, al cual pertenece WNV, para lo cual se amplificaron RNAs de cepas disponibles en el laboratorio del grupo de los inventores. Concretamente, se comprobó la capacidad de detección de muestras de los virus JEV, MVEV, SLEV y USUV.

Para ello, se obtuvo cDNA de las cepas de forma análoga a la descrita en el Ejemplo 1 para cepas de WNV, y con ese cDNA, y por duplicado, se llevó a cabo la PCR en Tiempo Real diseñada tal y como se ha descrito en los puntos 2.1. y 2.2. Los resultados obtenidos se resumen a continuación en la Tabla 6:

TABLA 6

Resultados obtenidos en el ensayo de especificidad viral

Pocillo	Muestra	Nº acceso Genbank	Detector	Ct	Desv. St. Ct
A1	JEV 1/10, cepa Nakayama	EF571853	WN (SEQ ID NO:3)	N.D.	
			CI (SEQ ID NO:7)	28,01	0,132
A2	JEV 1/10, cepa Nakayama	EF571853	WN (SEQ ID NO:3)	N.D.	
			CI (SEQ ID NO:7)	28,20	0,132
A3	MVEV –1 cepa MVEV/1/51	AF161266	WN (SEQ ID NO:3)	N.D.	
			CI (SEQ ID NO:7)	28,02	0,006
A4	MVEV –1 cepa MVEV/1/51	AF161266	WN (SEQ ID NO:3)	N.D.	
			CI (SEQ ID NO:7)	28,03	0,006
A5	SLEV cepa 78v6507	AF205481	WN (SEQ ID NO:3)	N.D.	
			CI (SEQ ID NO:7)	28,02	0,051
A6	SLEV cepa 78v6507	AF205481	WN (SEQ ID NO:3)	N.D.	
			CI (SEQ ID NO:7)	28,10	0,051
A7	USUV cepa SAAR	AY453412	WN (SEQ ID NO:3)	N.D.	
			CI (SEQ ID NO:7)	28,02	0,111
A8	USUV cepa SAAR8	AY453412	WN (SEQ ID NO:3)	N.D.	
			CI (SEQ ID NO:7)	27,86	0,111

N.D.: No detectado

Desv. St. Ct: Desviación estándar del Ct

No se dispuso de muestras clínicas positivas, pero se utilizaron sueros y/o líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con cuadro clínico compatible con infección por WNV, en las que no hubo detección en la PCR en Tiempo Real y en las que con otras técnicas diagnósticas se comprobó la no presencia del virus.

Ejemplo 3

Ensayos con otras parejas de cebadores (Ejemplo de referencia)

Tal como se comenta en el Ejemplo 2, inicialmente, se eligieron como parejas de cebadores los siguientes:

WNVRT-F: 5'-CGGAAGTYGRGTAKACGGTGCTG-3' (SEQ ID NO:1)

WNVRT-R1: 5'-CGAGACGGTWYTGAGGGCTTAC-3' (SEQ ID NO:51)

y como sonda, una sonda con la configuración de las sondas TaqMan MGB (sonda doblemente marcada, con la estructura donador-FAM-oligonucleótido-MGB-aceptor), con la siguiente secuencia:

5'-WCCCCAGGWGGACTG-3' (SEQ ID NO:3),

marcada en 5' con el fluorocromo FAM.

Con esta pareja de cebadores, una vez optimizadas las condiciones de la PCR en Tiempo Real (punto 2.2. del Ejemplo 2 anterior), se llevaron a cabo las mismas pruebas descritas en dicho Ejemplo para calcular la sensibilidad de la reacción con cepas de los linajes 1 a 6, la cual fue la misma que en la técnica definitiva, con una detección media para los 6 linajes de 5 a 20 copias/ μ l.

Sin embargo, al realizar los ensayos de especificidad de detección con JEV, MVEV, SLEV y USUV, se observó que esta pareja de cebadores amplificaba JEV, MVEV y USUV, detectándose los fragmentos amplificados con la sonda elegida. Los resultados obtenidos se resumen a continuación en la Tabla 7:

TABLA 7

Resultados del ensayo de especificidad viral inicial

Pocillo	Muestra	Nº acceso Genbank	Detector	Ct
A1	JEV -1	EF571853	WN (SEQ ID NO:3)	22,28
			CI (SEQ ID NO:7)	38,86
A2	MVEV -1 140301	AF161266	WN (SEQ ID NO:3)	32,49
			CI (SEQ ID NO:7)	34,92
A3	MVEV -2 26/06/06	AF161266	WN (SEQ ID NO:3)	N.D.
			CI (SEQ ID NO:7)	35,15
A4	SLEV cepa 78v6507	AF205481	WN (SEQ ID NO:3)	37,74
			CI (SEQ ID NO:7)	34,98
A5	SLEV cepa 78v6507	AF205481	WN (SEQ ID NO:3)	N.D.
			CI (SEQ ID NO:7)	35,21
A6	USUV cepa SAAR	AY453412	WN (SEQ ID NO:3)	32,60
			CI (SEQ ID NO:7)	34,60

N.D: No detectado

Por esta razón, se revisaron los cebadores y la sonda y se realizó un cambio en el cebador inverso, desplazándolo 4 posiciones en el genoma (añadiendo 4 nucleótidos en el extremo 3' el cebador), incorporándole una nueva degeneración y acortándolo en su extremo 5'.

Tal como se demuestra en el Ejemplo 2, con estas modificaciones la sensibilidad fue parecida, pero se consiguió que el ensayo fuera específico para WNV.

La homología de secuencia de los cebadores y sonda definitivamente elegidos con cepas de WNV pueden observarse en la Fig. 4A, mientras que las posiciones relativas en el genoma de los cebadores inversos WNRT-R1 y WNRT-Re, así como la homología de secuencia con cepas de WNV y virus de su mismo serogrupo puede comprobarse en la Fig. 4B.

Este Ejemplo, junto con los Ejemplos de documentos de la técnica anterior previamente discutidos, ilustra las dificultades para conseguir encontrar un juego de secuencias que permita la amplificación y detección de cepas de todos los linajes conocidos de WNV con sensibilidad, eficacia y especificidad. Por ello, la pareja de cebadores finalmente elegida, especialmente en combinación con la sonda diseñada para la detección del fragmento amplificado por los mismos, representa una ventaja con respecto a las parejas de cebadores y sondas hasta ahora conocidos, que no parecía evidente poder alcanzar.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección del virus West Nile presente en una muestra que comprende las etapas de:

a) amplificar los ácidos nucleicos del virus West Nile presentes en dicha muestra utilizando como cebadores los oligonucleótidos con las secuencias:

5'-CGGAAGTYGRGTAKACGGTGCTG-3' (SEQ ID NO:1) (directo), y

5'-CGGTWYTGAGGGCTTACRTGG-3' (SEQ ID NO:2) (inverso);

b) detectar el fragmento de ácido nucleico amplificado,

en donde la detección del ácido nucleico amplificado indica la presencia del virus West Nile en dicha muestra.

2. Método según la reivindicación 1, en el que la detección del ácido nucleico amplificado se realiza utilizando como sonda la secuencia representada por SEQ ID NO:3.

3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la etapa a) de amplificación de los ácidos nucleicos del virus West Nile presentes en la muestra comprende las siguientes subetapas:

i) síntesis del cDNA a partir del RNA del virus West Nile presente en la muestra mediante una transcriptasa inversa;

ii) amplificación del cDNA mediante PCR en Tiempo Real utilizando como cebadores los oligonucleótidos de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2; y

la etapa b) de detección del fragmento de ácido nucleico amplificado se lleva a cabo mediante el uso de una sonda fluorogénica que consiste en un oligonucleótido monocatenario, complementario al fragmento de ácido nucleico amplificado en la reacción de PCR, covalentemente unido a al menos un compuesto fluorocromo.

4. Método según la reivindicación 3, en el que el oligonucleótido utilizado como sonda tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:3.

5. Método según la reivindicación 4, en el que el oligonucleótido utilizado como sonda está covalentemente unido en 5' a un primer compuesto fluorocromo y en 3' a un segundo compuesto fluorocromo *quencher* capaz de aceptar la energía emitida por el primer fluorocromo cuando ambos están unidos al oligonucleótido de SEQ ID NO:3 y de disiparla en forma de fluorescencia de mayor longitud de onda que la emitida por el primer fluorocromo.

6. Método según la reivindicación 4, en el que el oligonucleótido utilizado como sonda está covalentemente unido en 5' a un compuesto fluorocromo y en 3' a un compuesto *quencher* no fluorescente, capaz de aceptar la energía emitida por el compuesto fluorocromo cuando ambos están unidos al oligonucleótido de SEQ ID NO:3 y que contiene un resto MGB capaz de unirse al surco menor del DNA.

7. Método según la reivindicación 6, en el que compuesto fluorocromo unido en 5' es 6-carboxifluoresceína (FAM).

8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la amplificación de los ácidos nucleicos del Virus West Nile se lleva a cabo en presencia de una molécula de DNA útil como control interno que comprende un fragmento que puede ser amplificado mediante PCR con los cebadores de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 por comprender secuencias complementarias a ambos cebadores, situadas de manera que cada cadena de la molécula de DNA contiene la secuencia de uno de dichos cebadores y la secuencia complementaria al otro cebador, estando dichas secuencias correspondientes a los cebadores separadas por un fragmento heterólogo, exógeno tanto con respecto al genoma del virus West Nile como al genoma de la especie de la que se ha extraído la muestra en la que se desea comprobar la presencia del virus West Nile.

9. Método según la reivindicación 8, en el que la molécula de DNA útil como control interno comprende la secuencia representada por SEQ ID NO:6.

10. Método según la reivindicación 9, en el que se detecta la amplificación del DNA útil como control interno mediante el uso de una sonda con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:7.

11. Método según la reivindicación 10, en el que la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:7 lleva covalentemente unido un compuesto fluorocromo distinto de cualquier fluorocromo presente en la sonda de SEQ ID NO:3.

12. Método según la reivindicación 11, en el que el compuesto fluorocromo es NED.

13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, que comprende una etapa previa en la que se lleva a cabo una reacción de amplificación por PCR de los oligonucleótidos de SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5, que sirven tanto como cebadores como moldes, dando lugar a un producto de amplificación que comprende la secuencia de SEQ ID NO:6.

14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los ácidos nucleicos amplificados en la etapa a) del método han sido extraídos de una muestra biológica.

15. Método según la reivindicación 14, en el que la muestra biológica ha sido tomada de un ser humano.

16. Método según la reivindicación 15, en el que la muestra biológica se selecciona de líquido cefalorraquídeo, muestras de órganos, muestras de sangre o suero obtenido de la misma.

17. Método según la reivindicación 14, en el que la muestra biológica procede de un artrópodo o de un ave.

18. Un kit que comprende los oligonucleótidos de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2.

19. Kit según la reivindicación 18, que adicionalmente comprende una sonda que contiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:3.

20. Kit según la reivindicación 19, en el que la sonda de SEQ ID NO:3 presenta unido al extremo 5' un compuesto fluorocromo y en 3' un compuesto *quencher* no fluorescente, capaz de aceptar la energía emitida por el compuesto fluorocromo cuando ambos están unidos al oligonucleótido de SEQ ID NO:3, compuesto *quencher* no fluorescente que contiene un resto MGB capaz de unirse al surco menor del DNA.

21. Kit según la reivindicación 20, que adicionalmente contiene una sonda con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:7.

22. Kit según la reivindicación 21, en el que la sonda con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:8 lleva unido covalentemente un compuesto fluorocromo distinto de cualquier fluorocromo presente en la sonda de SEQ ID NO:3.

23. Kit según la reivindicación 21 ó 22, que adicionalmente comprende los oligonucleótidos de SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5.

24. Kit según la reivindicación 21 ó 22, que adicionalmente comprende una molécula de DNA que comprende la secuencia representada por SEQ ID NO:6.

25. Kit según la reivindicación 24, en el que la molécula de DNA es un plásmido.

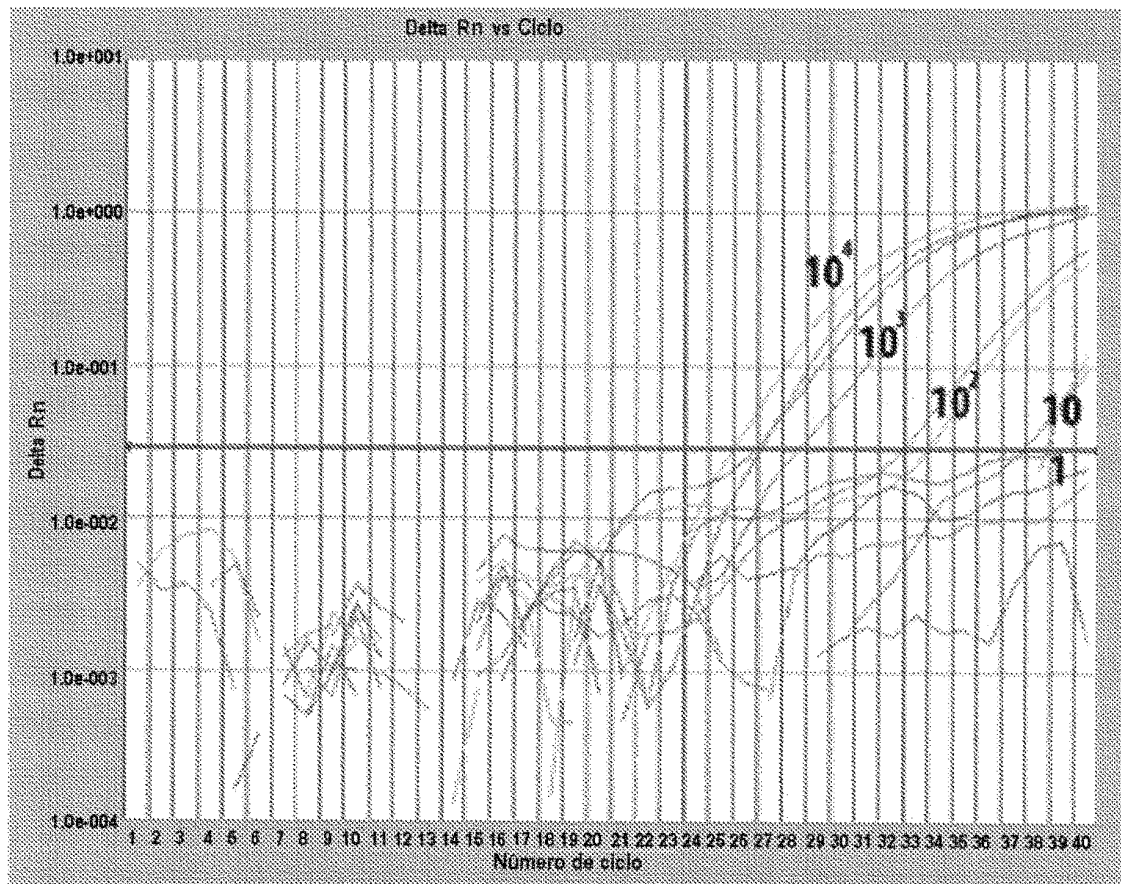


Fig. 1

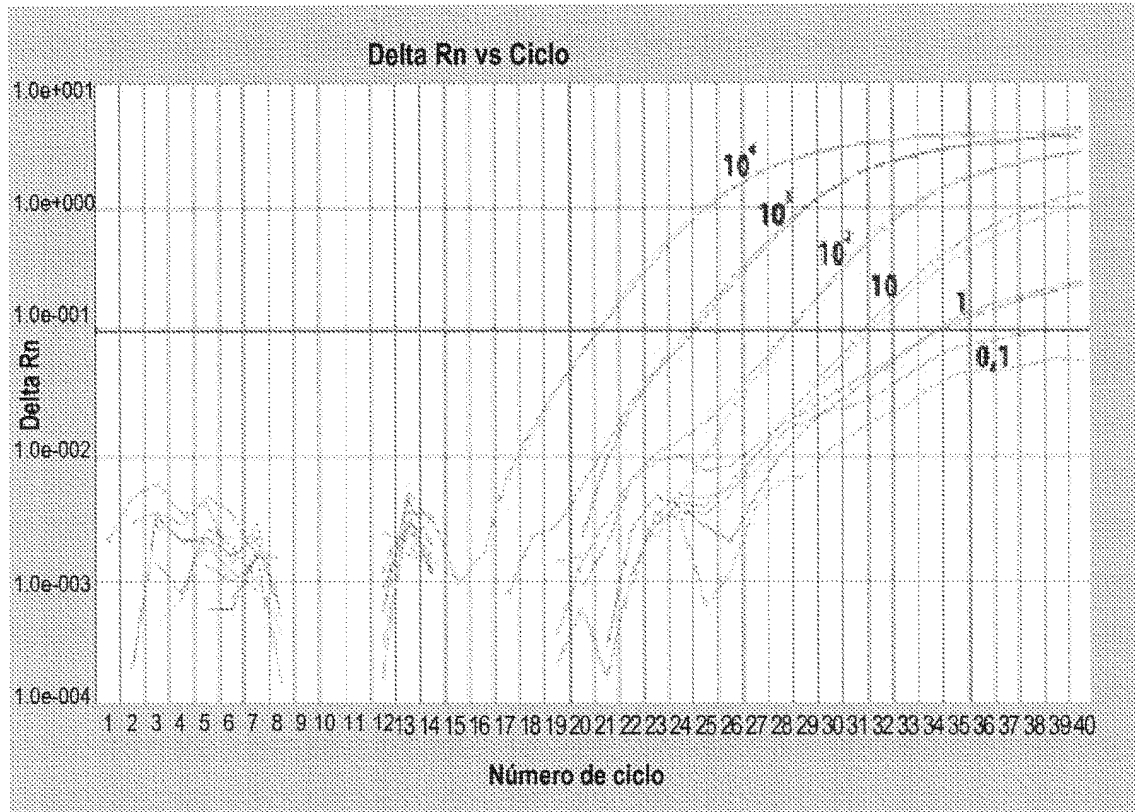


Fig. 2

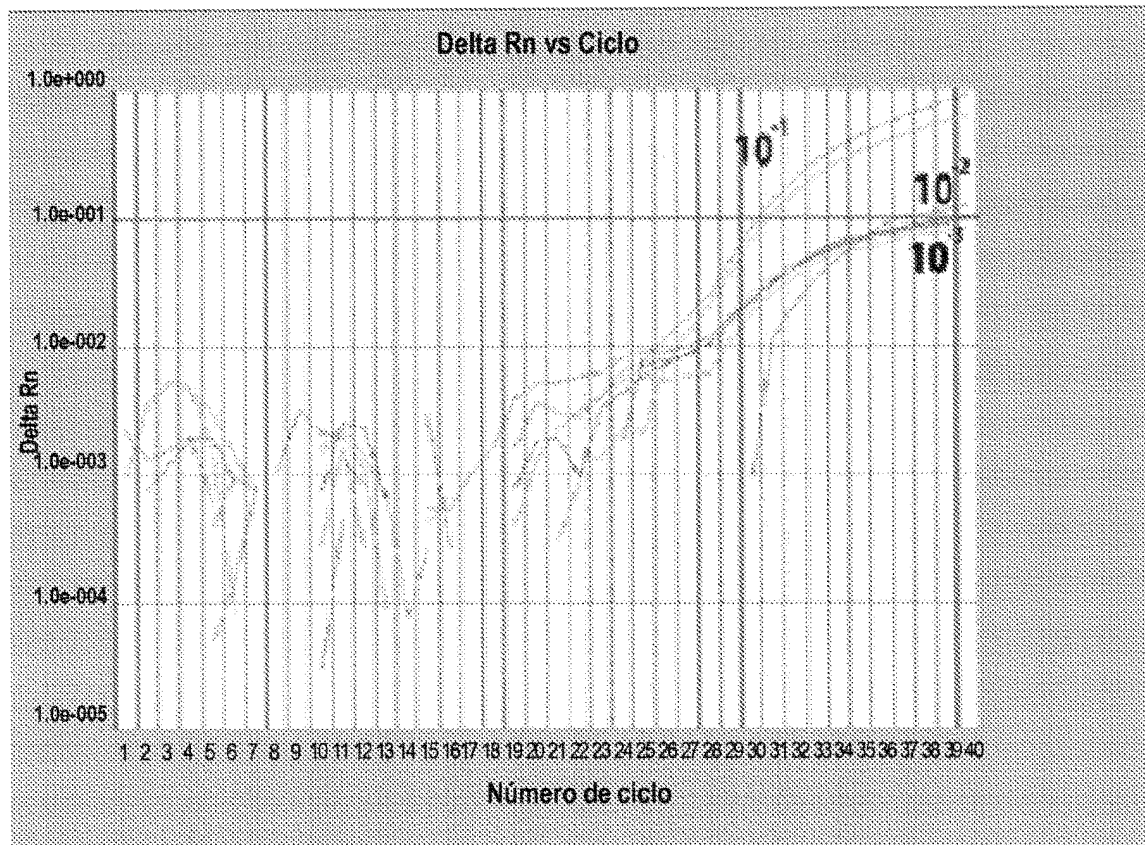


Fig. 3

	760	770	780	790	800	810	820	830	840	850
2WNgosha..	ACCGGAAGTGGGTACGCGTCTG	CCTGCGGCTCAACCCAGGAGG	ACTGGGTGACCAAAGCTGCGAG	GTGATCCAGTAAGCCCTCA	ACC					
2WNNC001..	ACCGGAAGTGGGTACGCGTCTG	CCTGCGGCTCAACCCAGGAGG	ACTGGGTGACCAAAGCTGCGAG	GTGATCCAGTAAGCCCTCA	ACC					
2WNSaraf..	ACCGGAAGTGGGTACGCGTCTG	CCTGCGGCTCAACCCAGGAGG	ACTGGGTGACCAAAGCTGCGAG	GTGATCCAGTAAGCCCTCA	ACC					
2WNFCOM1..	ACCGGAAGTGGGTACGCGTCTG	CCTGCGGCTCAACCCAGGAGG	ACTGGGTGACCAAAGCTGCGAG	GTGATCCAGTAAGCCCTCA	ACC					
2WNB956A..	ACCGGAAGTGGGTACGCGTCTG	CCTGCGGCTCAACCCAGGAGG	ACTGGGTGACCAAAGCTGCGAG	GTGATCCAGTAAGCCCTCA	ACC					
2WNB95..	ACCGGAAGTGGGTACGCGTCTG	CCTGCGGCTCAACCCAGGAGG	ACTGGGTGACCAAAGCTGCGAG	GTGATCCAGTAAGCCCTCA	ACC					
4WNLKVC..	ACCGGAAGTGGGTACGCGTCTG	CCTGCGGCTCAACCCAGGAGG	ACTGGGTGACCAAAGCTGCGAG	GTGATCCAGTAAGCCCTCA	ACC					
3WNRaben..	ACCGGAAGTGGGTACGCGTCTG	CCTGCGGCTCAACCCAGGAGG	ACTGGGTGACCAAAGCTGCGAG	GTGATCCAGTAAGCCCTCA	ACC					
5WNStral..	ACCGGAAGTGGGTACGCGTCTG	CCTGCGGCTCAACCCAGGAGG	ACTGGGTGACCAAAGCTGCGAG	GTGATCCAGTAAGCCCTCA	ACC					
KJ507_86	ACCGGAAGTGGGTACGCGTCTG	CCTGCGGCTCAACCCAGGAGG	ACTGGGTGACCAAAGCTGCGAG	GTGATCCAGTAAGCCCTCA	ACC					
wntRSONDA	-----WCCCCAGGAGGACTG-----									
WNTRp1m..	ACCGGAAGTGGGTACGCGTCTG	CCTGCGGCTCAACCCAGGAGG	ACTGGGTGACCAAAGCTGCGAG	GTGATCCAGTAAGCCCTCA	ACC					
1WNIItaly..	ACCGGAAGTGGGTACGCGTCTG	CCTGCGGCTCAACCCAGGAGG	ACTGGGTGACCAAAGCTGCGAG	GTGATCCAGTAAGCCCTCA	ACC					
1WNIIN200..	ACCGGAAGTGGGTACGCGTCTG	CCTGCGGCTCAACCCAGGAGG	ACTGGGTGACCAAAGCTGCGAG	GTGATCCAGTAAGCCCTCA	ACC					
1WNIChin0..	ACCGGAAGTGGGTACGCGTCTG	CCTGCGGCTCAACCCAGGAGG	ACTGGGTGACCAAAGCTGCGAG	GTGATCCAGTAAGCCCTCA	ACC					
1WNIWA200..	ACCGGAAGTGGGTACGCGTCTG	CCTGCGGCTCAACCCAGGAGG	ACTGGGTGACCAAAGCTGCGAG	GTGATCCAGTAAGCCCTCA	ACC					
1WNIWex03..	ACCGGAAGTGGGTACGCGTCTG	CCTGCGGCTCAACCCAGGAGG	ACTGGGTGACCAAAGCTGCGAG	GTGATCCAGTAAGCCCTCA	ACC					
1WNIWY99f..	ACCGGAAGTGGGTACGCGTCTG	CCTGCGGCTCAACCCAGGAGG	ACTGGGTGACCAAAGCTGCGAG	GTGATCCAGTAAGCCCTCA	ACC					
1WNIWMoroc..	ACCGGAAGTGGGTACGCGTCTG	CCTGCGGCTCAACCCAGGAGG	ACTGGGTGACCAAAGCTGCGAG	GTGATCCAGTAAGCCCTCA	ACC					
1WNIW097..	ACCGGAAGTGGGTACGCGTCTG	CCTGCGGCTCAACCCAGGAGG	ACTGGGTGACCAAAGCTGCGAG	GTGATCCAGTAAGCCCTCA	ACC					
1WNIWAs102..	ACCGGAAGTGGGTACGCGTCTG	CCTGCGGCTCAACCCAGGAGG	ACTGGGTGACCAAAGCTGCGAG	GTGATCCAGTAAGCCCTCA	ACC					
1WNIWMosqu..	ACCGGAAGTGGGTACGCGTCTG	CCTGCGGCTCAACCCAGGAGG	ACTGGGTGACCAAAGCTGCGAG	GTGATCCAGTAAGCCCTCA	ACC					
1WNIWAs102..	ACCGGAAGTGGGTACGCGTCTG	CCTGCGGCTCAACCCAGGAGG	ACTGGGTGACCAAAGCTGCGAG	GTGATCCAGTAAGCCCTCA	ACC					
1WNIWAs102..	ACCGGAAGTGGGTACGCGTCTG	CCTGCGGCTCAACCCAGGAGG	ACTGGGTGACCAAAGCTGCGAG	GTGATCCAGTAAGCCCTCA	ACC					
1WNIWethAn..	ACCGGAAGTGGGTACGCGTCTG	CCTGCGGCTCAACCCAGGAGG	ACTGGGTGACCAAAGCTGCGAG	GTGATCCAGTAAGCCCTCA	ACC					
1WNIWARC10..	ACCGGAAGTGGGTACGCGTCTG	CCTGCGGCTCAACCCAGGAGG	ACTGGGTGACCAAAGCTGCGAG	GTGATCCAGTAAGCCCTCA	ACC					

Fig. 4A

Alineamiento líneas y cebadores										
SEV NC 037580										
SEV NC 037581										
SEV NC 037582										
SEV NC 037583										
SEV NC 037584										
SEV NC 037585										
SEV NC 037586										
SEV NC 037587										
SEV NC 037588										
SEV NC 037589										
SEV NC 037590										
SEV NC 037591										
SEV NC 037592										
SEV NC 037593										
SEV NC 037594										
SEV NC 037595										
SEV NC 037596										
SEV NC 037597										
SEV NC 037598										
SEV NC 037599										
SEV NC 037600										
SEV NC 037601										
SEV NC 037602										
SEV NC 037603										
SEV NC 037604										
SEV NC 037605										
SEV NC 037606										
SEV NC 037607										
SEV NC 037608										
SEV NC 037609										
SEV NC 037610										
SEV NC 037611										
SEV NC 037612										
SEV NC 037613										
SEV NC 037614										
SEV NC 037615										
SEV NC 037616										
SEV NC 037617										
SEV NC 037618										
SEV NC 037619										
SEV NC 037620										
SEV NC 037621										
SEV NC 037622										
SEV NC 037623										
SEV NC 037624										
SEV NC 037625										
SEV NC 037626										
SEV NC 037627										
SEV NC 037628										
SEV NC 037629										
SEV NC 037630										
SEV NC 037631										
SEV NC 037632										
SEV NC 037633										
SEV NC 037634										
SEV NC 037635										
SEV NC 037636										
SEV NC 037637										
SEV NC 037638										
SEV NC 037639										
SEV NC 037640										
SEV NC 037641										
SEV NC 037642										
SEV NC 037643										
SEV NC 037644										
SEV NC 037645										
SEV NC 037646										
SEV NC 037647										
SEV NC 037648										
SEV NC 037649										
SEV NC 037650										
SEV NC 037651										
SEV NC 037652										
SEV NC 037653										
SEV NC 037654										
SEV NC 037655										
SEV NC 037656										
SEV NC 037657										
SEV NC 037658										
SEV NC 037659										
SEV NC 037660										
SEV NC 037661										
SEV NC 037662										
SEV NC 037663										
SEV NC 037664										
SEV NC 037665										
SEV NC 037666										
SEV NC 037667										
SEV NC 037668										
SEV NC 037669										
SEV NC 037670										
SEV NC 037671										
SEV NC 037672										
SEV NC 037673										
SEV NC 037674										
SEV NC 037675										
SEV NC 037676										
SEV NC 037677										
SEV NC 037678										
SEV NC 037679										
SEV NC 037680										
SEV NC 037681										
SEV NC 037682										
SEV NC 037683										
SEV NC 037684										
SEV NC 037685										
SEV NC 037686										
SEV NC 037687										
SEV NC 037688										
SEV NC 037689										
SEV NC 037690										
SEV NC 037691										
SEV NC 037692										
SEV NC 037693										
SEV NC 037694										
SEV NC 037695										
SEV NC 037696										
SEV NC 037697										
SEV NC 037698										
SEV NC 037699										
SEV NC 037700										

Fig. 4B

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Instituto de Salud Carlos III	
5	<120> MÉTODO DE AMPLIFICACIÓN GENÓMICA DEL VIRUS WEST NILE	
	<130> P-100851	
10	<160> 57	
	<170> PatentIn version 3.3	
15	<210> 1	
	<211> 23	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Cebador directo WNVRT_F para la amplificación de un fragmento de región no codificante de 3' del virus West Nile	
	<400> 1	
	cggaagtygr gtakacggtg ctg	23
30	<210> 2	
	<211> 21	
	<212> DNA	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Cebador inverso WNVRT_Re para la amplificación de un fragmento de región no codificante de 3' del virus West Nile	
	<400> 2	
	cggtwytgag ggcttacrtg g	21
45	<210> 3	
	<211> 15	
	<212> DNA	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de la invención para la detección del virus West Nile amplificado	
55	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(1)	
60	<223> /nota: Fluoróforo, preferiblemente FAM, unido en 5'	
	<220>	
	<221> misc_feature	
65	<222> (15)..(15)	
	<223> /nota: MGB unido a 3' en realización preferida	

<400> 3
 wccccaggwg gactg 15
 <210> 4
 5 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Oligonucleótido para la amplificación del control interno que contiene el cebador directo de PCR en Tiempo Real
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(23)
 20 <223> Secuencia del cebador directo de PCR
 <400> 4
 cggaagtygr gtakacggtg ctgccagcac acatgtgtct act 43
 25 <210> 5
 <211> 41
 <212> DNA
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido para la amplificación del control interno que contiene el cebador inverso de PCR en Tiempo Real
 35 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (1)..(21)
 <223> Secuencia del cebador inverso de PCR
 <400> 5
 45 cggtwytagg ggcttacrtg gagtagacac atgtgtgctg g 41
 <210> 6
 <211> 64
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Secuencia del control interno de amplificación y/o extracción
 <220>
 <221> misc_feature
 60 <222> (1)..(23)
 <223> Secuencia del oligonucleótido WNRT_F (SEQ ID NO:1)
 <220>
 65 <221> misc_feature
 <222> (44)..(64)

ES 2 364 833 B1

<223> Secuencia complementaria al oligonucleótido WNRT_Re (SEQ ID NO:2)

<220>

5 <221> misc_feature

<222> (44)..(64)

<223> Secuencia complementaria al oligonucleótido WNVRT_Re (SEQ ID NO: 2)

10 <400> 6

cggaagtygr gtakacggtg ctgccagcac acatgtgtct actccaygta agccctcarw 60

accg 64

15 <210> 7

<211> 20

<212> DNA

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sonda del control interno

25 <400> 7

ccagcacaca tgtgtctact 20

30 <210> 8

<211> 93

<212> DNA

<213> West Nile Virus

35 <220>

<221> source

<222> (1)..(93)

40 <223> Fragmento de la región 3' no codificante del virus West Nile (nucleótidos 10530 a 10622 del aislado Eg101)

<220>

<221> misc_feature

45 <222> (1)..(23)

<223> Fragmento correspondiente al cebador directo WNRT-F (SEQ ID NO:1)

<220>

50 <221> misc_feature

<222> (35)..(49)

<223> Fragmento de unión de la sonda de SEQ ID NO:3

55 <220>

<221> misc_feature

<222> (73)..(93)

60 <223> Fragmento correspondiente al cebador inverso WNRT-Re (SEQ ID NO: 2)

<400> 8

cggaagttga gtagacggtg ctgcctgcga ctcaacccca ggaggactgg gtgaacaaag 60

65 ctgcgaagtg atccatgtaa gccctcagaa ccg 93

<210> 9
 <211> 93
 <212> DNA
 5 <213> West Nile virus

 <220>
 <221> source
 10 <222> (1)..(93)
 <223> Fragmento de la región 3' no codificante del virus West Nile, aislado MP502_66, amplificado por el método de la invención

 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(23)
 20 <223> Fragmento correspondiente al cebador directo WNRT-F (SEQ ID NO:1)

 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (35)..(49)
 <223> Fragmento de unión de la sonda de SEQ ID NO:3

 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (73)..(93)
 <223> Fragmento correspondiente al cebador inverso WNRT-Re (SEQ ID NO: 2)

 35 <400> 9
 cggacgttga gtagacggtg ctgcctgcga ctcaacccca ggaggactgg gtgaacaaag 60
 ctgcgaggtg atccacgtaa gccctcagaa ccg 93
 40
 <210> 10
 <211> 93
 45 <212> DNA
 <213> West Nile virus

 <220>
 50 <221> source
 <222> (1)..(93)
 <223> Fragmento de la región 3' no codificante del virus West Nile, aislado HU2925_06_3nc, amplificado por el método de la invención

 55 <220>
 <221> source
 <222> (1)..(93)
 60 <223> Fragmento de la región 3' no codificante del virus West Nile, aislado HU2925_06, amplificado por el método de la invención

 <220>
 65 <221> misc_feature
 <222> (1)..(23)
 <223> Fragmento correspondiente al cebador directo WNRT-F (SEQ ID NO:1)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(49)
 5 <223> Fragmento de unión de la sonda de SEQ ID NO:3

 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (73)..(93)
 <223> Fragmento correspondiente al cebador inverso WNRT-Re (SEQ ID NO: 2)

 <400> 10
 15 cggaagttga gtagacggtg ctgcttgcca ctcaacccca ggaggactgg gtaaacaag 60
 ccgtagagag atccacgtaa gccctcaata ccg 93

 20 <210> 11
 <211> 31
 <212> DNA
 25 <213> West Nile virus

 <220>
 <221> source
 30 <222> (1)..(31)
 <223> Virus West Nile; Secuencia en la que están contenidas las secuencias de todos los cebadores de amplificación del WNV de la Tabla 5 de la solicitud WO 2004/036190

 35 <400> 11
 tccgccaccg gaagttgagt agacggtgct g 31

 <210> 12
 40 <211> 70
 <212> DNA
 <213> West Nile virus

 45 <220>
 <221> source
 <222> (1)..(70)
 50 <223> Virus West Nile; Secuencia en la que están contenidas las secuencias de todos los cebadores de amplificación del WNV de la Tabla 6 del documento WO 2004/036190

 <400> 12
 55 tccgagacgg ttctgagggc ttacatggat cacttcgcag ctttgttcac ccagtcctcc 60
 tggggttgag 70

 <210> 13
 60 <211> 48
 <212> DNA
 <213> West Nile virus

 65 <220>
 <221> source
 <222> (1)..(48)

ES 2 364 833 B1

<223> Virus West Nile: porción de SEQ ID NO:12 preferida para el diseño de cebadores de amplificación del WNV según la solicitud WO 2004/036190

5 <400> 13
tccgagacgg ttctgagggc ttacatggat cacttcgcag ctttgttc 48

<210> 14
10 <211> 24
<212> DNA
<213> West Nile virus

15 <220>
<221> source
<222> (1)..(24)
<223> Virus West Nile: porción de SEQ ID NO:12 preferida para el diseño de cebadores de amplificación del WNV según la solicitud WO 2004/036190

20 <400> 14
tccgagacgg ttctgagggc ttac 24

25 <210> 15
<211> 19
<212> DNA
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo de PCR de la región 3' no codificante del virus West Nile

35 <400> 15
tccgccaccg gaagttgag 19

40 <210> 16
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Cebador directo de PCR de la región 3' no codificante del virus West Nile

50 <220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)
<223> I: inosina

55 <220>
<221> modified_base
<222> (1)..(1)

60 <223> I: inosina

<220>
<221> misc_feature
65 <222> (1)..(1)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 16
 nccgccaccg gaagttgag 19
 5 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Cebador directo de PCR de la región 3' no codificante del virus West Nile
 15 <400> 17
 tccgccaccg gaagttgagt 20
 <210> 18
 20 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador directo de PCR de la región 3' no codificante del virus West Nile
 <400> 18
 30 tccgccaccg gaagttgagt a 21
 <210> 19
 <211> 18
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Cebador directo de PCR de la región 3' no codificante del virus West Nile
 <400> 19
 45 cgccaccgga agttgagt 18
 <210> 20
 <211> 18
 <212> DNA
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador directo de PCR de la región 3' no codificante del virus West Nile
 55 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(1)
 60 <223> I. inosina
 <220>
 65 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n es a, c, g, o t

	<400> 20	
	ngccaccgga agttgagt	18
5	<210> 21	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Cebador directo de PCR de la región 3' no codificante del virus West Nile	
15	<400> 21	
	cgccaccgga agttgagta	19
	<210> 22	
20	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador directo de PCR de la región 3' no codificante del virus West Nile	
	<400> 22	
30	ggaagttgag tagacggtgc t	21
	<210> 23	
	<211> 22	
35	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Cebador directo de PCR de la región 3' no codificante del virus West Nile	
	<400> 23	
45	ggaagttgag tagacggtgc tg	22
	<210> 24	
	<211> 20	
	<212> DNA	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Cebador directo de PCR de la región 3' no codificante del virus West Nile	
	<400> 24	
	gaagttgagt agacggtgct	20
60	<210> 25	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	

	<223> Cebador directo de PCR de la región 3' no codificante del virus West Nile	
	<400> 25	
5	gaagttgagt agacggtgct g	21
	<210> 26	
	<211> 20	
10	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador directo de PCR de la región 3' no codificante del virus West Nile	
	<400> 26	
20	aagttgagta gacggtgctg	20
	<210> 27	
	<211> 23	
	<212> DNA	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de PCR de la región 3' no codificante del virus West Nile	
30	<400> 27	
	tccgagacgg ttctgagggt tac	23
	<210> 28	
35	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador inverso de PCR de la región 3' no codificante del virus West Nile	
45	<400> 28	
	tccgagacgg ttctgagggt ta	22
	<210> 29	
50	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Cebador inverso de PCR de la región 3' no codificante del virus West Nile	
	<400> 29	
60	tccgagacgg ttctgagggt t	21
	<210> 30	
	<211> 20	
65	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	

<220>
 <223> Cebador inverso de PCR de la región 3' no codificante del virus West Nile

5 <400> 30
 ccagtcctcc tgggggttgag 20

<210> 31
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador inverso de PCR de la región 3' no codificante del virus West Nile

<400> 31
 20 acccagtcct cctgggggttg ag 22

<210> 32
 <211> 21
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <223> Cebador inverso de PCR de la región 3' no codificante del virus West Nile

<400> 32
 acccagtcct cctgggggttg a 21

35 <210> 33
 <211> 20
 <212> DNA
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador inverso de PCR de la región 3' no codificante del virus West Nile

45 <400> 33
 acccagtcct cctgggggttg 20

50 <210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Cebador inverso de PCR de la región 3' no codificante del virus West Nile

60 <220>
 <221> modified_base

<222> (7)..(7)
 65 <223> I: inosina

<220>

<221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> I: inosina
 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 10 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 34
 15 gctacarcacn gtgggggtcct 20
 <210> 35
 20 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador inverso de PCR de la región 3' no codificante del virus West Nile
 <220>
 30 <221> modified_base
 <222> (10)..(10)
 <223> I
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 40 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 35
 45 gctacaacacn gtgggggtcct 20
 <210> 36
 <211> 21
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Sonda propuesta en la solicitud WO 2004/036190 para la detección de virus West Nile amplificado
 <400> 36
 60 gagtagacgg tgctgcctgc g 21
 <210> 37
 <211> 19
 65 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

	<220>	
	<223> Sonda propuesta en la solicitud WO 2004/036190 para la detección de virus West Nile amplificado	
5	<400> 37	
	gtagacggtg ctgcctgcg	19
10	<210> 38	
	<211> 22	
	<212> DNA	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda propuesta en la solicitud WO 2004/036190 para la detección de virus West Nile amplificado	
20	<400> 38	
	tgcgactcaa ccccaggagg ac	22
25	<210> 39	
	<211> 18	
	<212> DNA	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Sonda propuesta en la solicitud WO 2004/036190 para la detección de virus West Nile amplificado	
	<400> 39	
40	tgcgactcaa ccccagga	18
	<210> 40	
45	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Sonda propuesta en la solicitud WO 2004/036190 para la detección de virus West Nile amplificado	
	<400> 40	
55	cgactcaacc ccaggaggac	20
	<210> 41	
60	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Sonda propuesta en la solicitud WO 2004/036190 para la detección de virus West Nile amplificado	

<400> 41
gactcaaccc caggaggac 19
5
<210> 42
<211> 18
<212> DNA
10 <213> Secuencia artificial
<220>
15 <223> Sonda propuesta en la solicitud WO 2004/036190 para la detección de virus West Nile amplificado
<400> 42
20 gactcaaccc caggagga 18
<210> 43
<211> 18
25 <212> DNA
<213> Secuencia artificial
<220>
30 <223> Sonda propuesta en la solicitud WO 2004/036190 para la detección de virus West Nile amplificado
<400> 43
35 actcaacccc aggaggac 18
<210> 44
40 <211> 19
<212> RNA
<213> Secuencia artificial
45 <220>
<223> Sonda propuesta en la solicitud WO 2004/036190 para la detección de virus West Nile amplificado
<400> 44
50 caggaggacu gggugaaca 19
<210> 45
55 <211> 19
<212> RNA
<213> Secuencia artificial
60 <220>
<223> Sonda propuesta en la solicitud WO 2004/036190 para la detección de virus West Nile amplificado
65 <400> 45
gaggacuggg ugaacaaag 19

<210> 46
 <211> 20
 <212> DNA
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda propuesta en la solicitud WO 2004/036190 para la detección de virus West Nile amplificado
 10
 <400> 46

 gtgaacaaaag ctgcgaagtg 20
 15
 <210> 47
 <211> 20
 <212> DNA
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda propuesta en la solicitud WO 2004/036190 para la detección de virus West Nile amplificado
 25
 <400> 47

 aagccgcgaa gtgatccatg 20
 30
 <210> 48
 <211> 19
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <223> Sonda propuesta en la solicitud WO 2004/036190 para la detección de virus West Nile amplificado

 <400> 48
 45 gtaagccctc agaaccgtc 19

 <210> 49
 <211> 20
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 55 <223> Cebador directo de PCR para la amplificación del virus West Nile

 <400> 49
 60 gccaccggaa gttgagtaga 20

 <210> 50
 65 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador inverso de PCR para la amplificación del virus West Nile

5 <400> 50

21

gagacgggttc tgagggctta c

10 <210> 51
 <211> 22
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador inverso de PCR para la amplificación del virus West Nile: propuesta inicial, cebador WNVRT-R1

20 <400> 51

22

cgagacgggtw ytgagggctt ac

25 <210> 52
 <211> 61
 <212> DNA
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador 4WNQF: cebador directo de PCR en Tiempo Real para la amplificación de fragmento de la región 3' NC del aislado LEIV-Krnd88-190 del virus West Nile

35 <220>
 <221> source
 40 <222> (1)..(61)
 <223> Aislado LEIV-Krnd88-190 del virus West Nile (GenBank: AY277251), nucleótidos 10470-10530

<220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (9)..(31)
 <223> Fragmento correspondiente al cebador directo WNRT-F (SEQ ID NO:1)

50 <400> 52

60

gccgccaccg gaagttgggt atacggtgct gcctgtgacc caaccccagg aggactggga

55 t style="text-align: right;">61

<210> 53
 <211> 67
 60 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 65 <223> Cebador 4WNQRe: cebador inverso de PCR en Tiempo Real para la amplificación de fragmento de la región 3' NC del aislado LEIV-Krnd88-190 del virus West Nile

<220>
 <221> source
 <222> (1)..(67)
 5 <223> Aislado LEIV-Krnd88-190 del virus West Nile (GenBank: AY277251), nucleótidos 10512-10578

 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (1)..(21)
 <223> Fragmento correspondiente al cebador inverso WNRT-Re (SEQ ID NO: 2)

 <400> 53
 15
 ttccgaaacg gtattgaggg cttacgtgga tcgctccatg gctttgatat cccagtcctc 60
 ctgggggt 67
 20
 <210> 54
 <211> 61
 25 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Cebador 5WNQF: cebador directo de PCR en Tiempo Real para la amplificación de fragmento de la región 3'
 NC de la cepa 804994 del virus West Nile

 <220>
 35 <221> source
 <222> (1)..(61)
 <223> Cepa 804994 del virus West Nile (GenBank: DQ256376), nucleótidos 10509-10570

 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(31)
 <223> Fragmento correspondiente al cebador directo WNRT-F (SEQ ID NO:1)
 45
 <400> 54

 50 tccgccaccg gatgttgagt agacggtgct gcctgcgtct caaccccagg aggactgggt 60
 g 61

 55 <210> 55
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> Cebador 5WNQRe: cebador inverso de PCR en Tiempo Real para la amplificación de fragmento de la región
 3' NC de la cepa 804994 del virus West Nile
 65
 <220>
 <221> source

ES 2 364 833 B1

<222> (1)..(69)

<223> Cepa 804994 del virus West Nile (GenBank: DQ256376), nucleótidos 10551-10619

5 <220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(20)

<223> Fragmento correspondiente al cebador inverso WNRT-Re (SEQ ID NO: 2)

10

<400> 55

15

cttccgaggc ggttctgagg gcttacatgg atcgctccgc agctttgttc acccagtcct 60

cctgggggtt 69

<210> 56

20

<211> 11029

<212> DNA

<213> West Nile virus

25

<220>

<221> source

<222> (1)..(11029)

30

<223> Aislado Eg101 del virus West Nile, secuencia completa (número de acceso en GenBank AF260968)

<220>

<221> misc_feature

35

<222> (10530)..(10552)

<223> Fragmento correspondiente al cebador directo WNRT-F (SEQ ID NO:1)

<220>

40

<221> misc_feature

<222> (10530)..(10622)

<223> Fragmento amplificado por el método de la invención

45

<220>

<221> misc_feature

<222> (10602)..(10622)

50

<223> Fragmento correspondiente al cebador inverso WNRT-Re (SEQ ID NO: 2)

<400> 56

55

agtagttcgc ctgtgtgagc tgacaaactt agtagtggtt gtgaggatta acaacaatta 60

acacggtgcg agctgtttct tagcacgaag atctcgatgt ctaagaaacc aggagggccc 120

ggcaagagcc gggctgtcaa tatgctaaaa cgcggaatgc cccgcgtgtt gtccttgatt 180

60

ggactgaaga gggcaatgtt gagcctgatc gacggcaagg gaccaatacg atttgtgttg 240

gctctcttgg cgttcttcag gttcacagca attgctccga cccgagcagt gctggatcga 300

65

ES 2 364 833 B1

	tggagaggtg	tgaacaaaca	aacagcgatg	aaacaccttc	tgagtttttaa	gaaggaacta	360
	gggaccttga	ccagtgcctat	caatcggcgg	agctcaaaac	aaaagaaaag	aggaggaaaag	420
5	accggaattg	cagtcgatgat	tggtctgatc	gccagcgtgg	gagcagttac	cctctctaac	480
	ttccaaggga	aggtgatgat	gactgtaaat	gccactgacg	tcacagacgt	catcacgatt	540
10	ccaacagctg	ctggaaagaa	tctatgcatt	gtcagagcaa	tggacgtggg	gtacatgtgt	600
	gatgatacta	tcacctatga	atgtccagtg	ctgtcggctg	gtaatgatcc	agaagacatc	660
	gactgttggg	gcacaaaatc	agcagtctac	gtcaggtatg	gaagatgcac	caagacacgc	720
15	caactcaagac	gtagccggag	gtcactgaca	gtgcagacac	atggagaaaag	caactctagcg	780
	aacaagaagg	gggcttggat	ggacagcacc	aaggctacaa	ggtatttggg	aaaaacagaa	840
20	tcatggatct	tgaggaaccc	cggatatgcc	ctggtggcag	ccgtcattgg	ttggatgctt	900
	ggaagcaaca	ccatgcagcg	agttgtgttc	gttgtgctac	tgctcttggg	ggctccagcc	960
	tacagcttta	actgccttgg	aatgagcaac	agagacttct	tagagggagt	gtctggagca	1020
25	acatgggtgg	atttggttct	cgaaggcgac	agctgtgtga	ccatcatgtc	taaggacaag	1080
	cctaccatcg	atgtgaagat	gatgaatatg	gaggccgcca	acctggcaga	ggtccgcagt	1140
30	tattgctatc	tggccaccgt	cagcgatctc	tccaccaaaag	ctgcgtgccc	gactatggga	1200
	gaagctcaca	atgacaaacg	tgctgaccca	gcttttgtgt	gtaaacaagg	agtagtggac	1260
35	aggggttggg	gcaacggctg	tggactatth	ggtaaaggaa	gcattgacac	atgcgccaaa	1320
	tttgctgtt	ctaccaaggc	aacaggaaga	accattctga	aagagaacat	caagtacgaa	1380
	gtggctatct	ttgtccatgg	accaaccact	gtggagtgcg	atggaaacta	ccccacacag	1440
40	attggggcca	ctcaggcagg	gagattcagc	atcactcctg	cggcgccttc	atacacacta	1500
	aaacttggag	agtatggaga	ggtgacggtg	gactgtgaac	cacgatcagg	gattgacacc	1560
45	aatgcatact	acgtgatgac	tgctcgaaca	aagacgttct	tgggtccatcg	tgagtggtht	1620
	atggacctca	acctcccttg	gagcagtgcc	ggaagcactg	tgtggaggaa	cagagagacg	1680
	ttgatggagt	ttgaggaacc	acacgccacg	aagcagtctg	tgatagcatt	gggctcacia	1740
50	gagggagctc	tgcataaagc	tttggctgga	gccattcctg	tggaaatttc	aagcaacact	1800
	gtcaagttga	catcgggtca	tttgaagtgt	agagtgaaga	tggaaaaatt	gcagttgaag	1860
55	ggaacaacct	acggcgtctg	ttcaaaggct	ttcaagtttc	ttggaactcc	cgcagacaca	1920
	ggccacggca	ctgtagtgtt	ggaattgcag	tacactggca	cggatggacc	ttgcaaagtt	1980
	cccatctcgt	cagtggcttc	attgaacgac	ctaacgccag	tgggcagggt	ggtcactgtc	2040
60	aacccttttg	tttcagtagc	cacggccaat	gccaagggtc	tgattgaatt	ggaaccaccc	2100
	tttgagagact	catacatagt	ggtgggcaga	ggagaacaac	agattaatca	ccattggcac	2160
65	aagtctggaa	gcagcattgg	caaagccttc	acaaccaccc	tcaaaggggc	gcagagatta	2220
	gccgccctag	gagatacagc	ttgggactth	ggatcagttg	gaggggtgtt	cacctcagtg	2280

ES 2 364 833 B1

	gggaaggctg tccatcaagt gtttggtgga gcattccgct cactgttcgg aggcatgtct	2340
	tggataacgc aaggattgct gggggctctg ctgttggtgga tgggcatcaa tgctcgtgac	2400
5	aggtccatag ctctcacgtt tctcgcagtt ggaggggttt tgctctttct ctccgtgaac	2460
	gtgcacgctg aactggatg tgccatagac atcagccggc aggagctgag atgtggaagt	2520
10	ggagtgttca tacacaatga tgtggaggct tggatggacc ggtacaagta ctaccctgaa	2580
	acgccacaag gcctagccaa gatcattcaa aaagcccaca aagaaggagt gtgcggtcta	2640
	cggtcggttt ccagactgga gcaccaaattg tgggaagcgg tgaaggacga gctaaacact	2700
15	cttttgaaag agaatggtgt ggacctcagt gttgtggttg agaaacagga gggaatgtac	2760
	aagtcagcac ctaaactgtct caccgctacc acggaaaaat tggaaatagg ctggaaggcc	2820
20	tggggaaaga gcacccattt cgcaccagaa ttggccaaca acacttttgt ggttgatggt	2880
	ccggagacca aggaatgccc aactcagaat cgcgcttgga acagcttgga agtagaggat	2940
	tttggaatttg gtctcaccag taccggatg ttctgaagg tcagagagag caacacaact	3000
25	gaatgtgact caaagatcat cggaacggct gtcaagaaca acttggcgat ccacagtgac	3060
	ctgtcctatt ggattgaaag caggcttaat gatactgga agcttgaaag ggcggtcctg	3120
30	ggtgaagtta aatcatgcac ttggcctgaa acgcacactt tgtggggtga aggaatcctc	3180
	gagagtgact tgataatacc agtcacactg gcgggaccac gaagcaacca caatcggaga	3240
35	cctgggtaca agacacaaaa ccagggccca tgggacgaag gccgggtaga gattgatttc	3300
	gattactgcc caggaacgac ggtcacctg agtgagagct gcggacaccg tggacctgcc	3360
	actcgcacca ccacagagag cggaaagctg ataacggact ggtgctgcag gagctgcacc	3420
40	ttaccaccat tgcgctacca gacggacagc ggttggtggt atggtatgga gattagacca	3480
	cagaggcatg atgaaaagac ccttgctgcag tcacaagtga atgcttaca cgctgatatg	3540
45	attgatcctt ttcagctggg ccttctggtc gtgttcttgg ccaccagga ggtccttcgc	3600
	aagagggtgga cagccaagat cagcatgcca gctatactga ttgctctgct agtcctggtg	3660
50	tttgggggca ttacttacac tgacgtgta cgctatgtca tcttagtggg agcagctttc	3720
	gcagaatcca attcgggag agacgtggta cacttggcgc tcatggcgac cttcaagata	3780
	caaccagtgt ttatggtggc atcgtttctc aaagcgagat ggaccaacca ggagaatatc	3840
55	ttgttgatgt tggcggtgt tttctttcaa atggcttacc atgacgctcg ccaaattctg	3900
	ctttgggaga tccctgatgt gttgaattca ttggcagtag cttggatgat actgagagcc	3960
60	ataaccttta caacaacatc aaacgtggtt gttccgctgc tagctctgtt aacaccggga	4020
	ctgagatgct tgaatctgga tgtgtacagg atcctgctat tgatggtcgg aataggcagc	4080
	ttgatcagag agaagagaag cgcagctgca aaaaagaaag gagcaagtct gttatgcctg	4140
65	gctctagcct caacaggact tttcaaccct atgatcctcg ccgctggact cattgcatgt	4200
	gatcccaacc gtaaacgagg atggcccgca actgaagtga tgactgctgt cggcctgatg	4260

ES 2 364 833 B1

	tttgccattg	tccgagggct	ggcagagctt	gacattgact	ccatggccat	tccaatgacc	4320
	atcgcagggc	tcatgtttgc	tgccttcgtg	atatctggga	aatcaacaga	tatgtggatc	4380
5	gagaggacgg	cggacatctc	ctgggaaagt	gatgcggaaa	ttacaggctc	gagcgagaga	4440
	gttgatgtgc	ggcttgatga	tgacggaaat	ttccagctca	tgaatgatcc	aggagcacct	4500
10	tggaagatat	ggatgctcag	aatggcttgc	ctcgcgatta	gtgcgtacac	cccttgggca	4560
	atcctgccct	cagtagttgg	atcttgata	actctccaat	acacaaagag	aggaggtgtg	4620
	ctgtgggaca	ctccctcacc	aaaggagtag	aaaaaagggg	acacgaccac	tggcgtctac	4680
15	aggatcatga	ctcgtgggct	gctcggcagt	tatcaagcag	gagcgggctg	gatggttgaa	4740
	ggggttttcc	acaccctttg	gcatacaaca	aaaggagccg	ctctgatgag	cggggaaggc	4800
20	cgcctggacc	catactgggg	tagtgtcaaa	gaggatcgac	tttgctacgg	aggaccctgg	4860
	aaattgcagc	acaagtggaa	tgggcaggat	gagggtgcaa	tgattgtggt	ggaacctggc	4920
	aagaacgtta	aaaacgtcca	gacgaaacca	gggggtgttca	aaacacctga	aggagaaatt	4980
25	ggggccgtga	ctctggactt	ccccactgga	acatcaggct	caccaatagt	ggacaaaaac	5040
	ggtgatgtga	tccggctcta	tggcaatgga	gtcataatgc	ccaacggctc	atacataagc	5100
30	gcgatagtgc	aggggtgaaag	gatggatgag	cggatcccag	cgggattcga	acctgagatg	5160
	ctgaggaaaa	aacagatcac	agttctggac	cttcatcccg	gtgctggtta	aacaaggagg	5220
	atactgccac	agatcatcaa	agaggccata	aatagaagat	tgagaacggc	cgtgctagca	5280
35	ccaactaggg	ttgtagccgc	tgagatggct	gaagccctga	gaggactgcc	catccggtat	5340
	cagacatctg	cagtgcccg	agaacacaat	ggaaatgaga	ttgttgatgt	catgtgccat	5400
40	gccactctca	ctcacaggct	gatgtctcct	cacaggggtg	cgaactacaa	tcttttcgtg	5460
	atggatgagg	ctcattttac	cgaccagct	agcattgcag	caaggggtta	tatttccaca	5520
45	aaagtcgagc	tgggggaggc	ggcggcaata	ttcatgacag	ctaccccacc	aggcacttca	5580
	gacccattcc	cagagtccaa	ttcacctatt	tctgacttgc	agactgagat	cccagatcgg	5640
	gcctggaact	ctgggtacga	atggattaca	gaatacattg	ggaaaacggg	ttggtttgtg	5700
50	cccagtgtga	aaatggggaa	tgagattgcc	ctttgtctac	aacgtgccgg	caaaaaagta	5760
	gtccaactga	acagaaagtc	gtatgagacg	gagtacccaa	agtgaagaa	cgatgattgg	5820
55	gactttgtta	tcacaacaga	catatctgaa	atgggggcta	acttcaaggc	gagcaggggtg	5880
	attgacagca	ggaagagtgt	gaaaccaacc	atcatcacgg	aaggagaagg	gagggtgatc	5940
	ctgggagaa	catccgctgt	gacagcagct	agtgcagccc	aaagacgtgg	acgcacggt	6000
60	aggaatccat	cgcaagttgg	tgatgagtac	tgctatgggg	ggcacacgaa	tgaagacgac	6060
	tcgaacttcg	cccattggac	tgaggcacga	atcatgctgg	acaacatcaa	catgccaaac	6120
65	ggactgatcg	ctcaattcta	ccaaccagag	cgtgaaaagg	tatacccat	ggatggagaa	6180
	taccgactca	gaggagaaga	gaggaaaaac	tttctggaat	tattgaggac	tgcagatctg	6240

ES 2 364 833 B1

	ccagtttggc	tggcttaca	ggtggcagcg	gctggagtgt	cataccacga	tcggagatgg	6300
	tgttttgatg	gccctaggac	aaacacaatt	ctagaagaca	acaacgaagt	ggaagtcatt	6360
5	acgaagcttg	gtgaaagaaa	gattctgagg	ccgcgctgga	ttgacgccag	ggtgtactcg	6420
	gatcatcagg	cattaaaggc	gttcaaggac	tttgcttcgg	gaaagcgttc	tcagataggg	6480
10	ctcattgagg	ttctgggaaa	gatgcctgag	cacttcatgg	ggaagacatg	ggaagcactt	6540
	gacaccatgt	atgttgtggc	caccgcagag	aaagggggaa	gagctcacag	aatggccttg	6600
	gaggaactgc	cagatgctct	ccagacaatt	gccctgattg	ccttattgag	tgtgatgacc	6660
15	atgggagtat	tcttctctct	catgcagcgg	aagggcattg	gaaagatagg	tttgggaggc	6720
	gttgtctctg	gagtcgcaac	cttcttttgt	tggatggctg	aagttccagg	aacgaagatc	6780
20	gccggaatgt	tgtctgtttc	ccttctcttg	atgattgtgc	taatccctga	gccagagaag	6840
	caacgttcgc	agacagacaa	ccagctagcc	gtgttcctga	tttgtgtgtt	gaccctcgtg	6900
	agcgcagtgg	cagccaacga	aatgggttgg	ctggacaaga	ccaagaatga	tataagcagt	6960
25	ttgtttgggc	aaagaattga	ggccaaggag	aatttcagta	tgggagagtt	tctcctggac	7020
	ttgagaccgg	caacagcctg	gtcactgtat	gctgtgacca	cagcggttct	cactccactg	7080
30	ctaaagcatc	tgatcacgtc	agattacatc	aacacttcat	tgacctcaat	caatgttcaa	7140
	gcaagtgcac	tattcacact	cgcgcgaggg	ttcccccttg	tcgatgttgg	agtgtcggct	7200
35	ctcctgctag	cagccggatg	ctggggacaa	gtcacccctc	ccgtgacggg	gacagcggca	7260
	acactcctgt	tctgccacta	cgcctacatg	gttccccgat	ggcaggctga	ggcaatgcgc	7320
	tcagcccagc	ggcggacagc	ggctggaatc	atgaaaaacg	ctgtagtgga	tggcatcgtg	7380
40	gccacggacg	tcccagaatt	agagcgcacc	acacccatca	tgcagaagaa	agttgggcaa	7440
	atcatgctga	tcttggtgtc	tctagctgca	gtagtagtga	acccgtctgt	gaagacagtg	7500
45	cgagaagccg	gaattctgat	cacggcagca	gcggtgacac	tctgggagaa	tggagcaagc	7560
	tctgtttgga	atgcaacaac	tgccatcgga	ctctgccaca	tcattgcgtg	gggttggttg	7620
	tcattgcttat	ccataacatg	gacactcata	aagaacatgg	aaaaaccagg	actaaaaaga	7680
50	ggtggggcaa	agggacgcac	cttgggagag	gtttggaaaag	aaagactcaa	ccagatgaca	7740
	aaagaagagt	tcactaggta	ccgcaaagag	gccatcatcg	aagtcgatcg	ctcagcagca	7800
55	aaacacgcca	ggaaagaagg	caatgtcact	ggagggcatc	cagtctctag	aggcacagca	7860
	aagctgagat	ggctggtcga	gcggagggtt	ctcgaaccgg	tcggaaaagt	gattgacctt	7920
60	ggatgtggaa	gaggcgggtt	gtgttactac	atggcaaccc	aaaaaagagt	ccaagaggtc	7980
	agaggggtaca	caaaggggtg	tcccggacat	gaagagcccc	aactggtgca	aagttatgga	8040
	tggaaacattg	tcaccatgaa	gagcggagtg	gatgtgttct	acagaccttc	tgagtgtctgc	8100
65	gataccctcc	tttgtgacat	cggagagtct	tcattcaagt	ctgaggttga	agagcatagg	8160
	acgatccggg	tccttgaaat	ggttgaggac	tggctgcacc	gagggccaaa	ggaattttgt	8220

ES 2 364 833 B1

	gtgaaggtgc	tctgccccta	tatgccaaaa	gtcatagaaa	agatggagct	gctccagcgc	8280
	cggatatgggg	ggggactggg	cagaaaccca	ctctcgcgga	attccacgca	cgagatgtat	8340
5	tgggtaagtc	gagcttcggg	caatgtggta	cactcagtga	acatgaccag	ccaggtgctt	8400
	ctgggaagaa	tggagaaaag	gacctggaag	ggaccccaat	acgaggaaga	tgtgaacttg	8460
10	ggaagtggaa	ccagggcggt	gggaaaaccc	ctactcaact	cagacactag	taaaatcaag	8520
	aacaggattg	aacgactcag	gcgtgagtac	agttcgacgt	ggcaccacga	tgagaaccac	8580
	ccatatagaa	cctggaacta	tcacggcagt	tatgatgtga	aacctacagg	ctccgccagc	8640
15	tcgctgggtca	atggagtggg	taggctcctc	tcaaaacccat	gggacaccat	cacgaacgtt	8700
	accaccatgg	ccatgactga	cactactccc	ttcggacagc	agcgggtggt	taaagagaag	8760
20	gtggacacga	aagctcctga	accgccagaa	ggagtgaagt	atgtgctcaa	tgaaaccacc	8820
	aactggttgt	gggcgtttct	ggccagagaa	aaacgtccca	gaatgtgctc	tcgagaggaa	8880
	ttcataaaaa	aggtcaatag	caatgcagct	ctgggtgcca	tgtttgaaga	gcagaaccaa	8940
25	tggaggagcg	ccagagaagc	agttgaggat	ccaaaatttt	gggagatggg	ggatgaggag	9000
	cgcgaggcac	acctgcgggg	ggaatgtcac	acttgcacat	acaacatgat	ggggaagaga	9060
30	gagaagaaac	ctggagagtt	cggaaaggct	aagggaagca	gagccatatg	gttcatgtgg	9120
	ctcggagctc	gctttctgga	gttcgaagct	ctgggctttc	ttaacgaaga	ccactggctt	9180
	ggaagaaaga	actcaggagg	cggggtcgag	ggcttggggc	tccaaaaact	gggttatatt	9240
35	ctgcgtgaag	ttggcaccgc	acctggaggc	aagatctatg	ctgatgacac	agctggctgg	9300
	gacaccgcga	ttacgagagc	tgacctggaa	aatgaagcta	aggttcttga	gttgctggat	9360
40	ggggaacatc	ggcgtcttgc	tagggccatc	attgagctca	cctatcgtca	caaagttgtg	9420
	aaagtgatgc	gcccggctgc	tgatggaaga	accgtcatgg	atgtcatctc	cagagaagat	9480
45	cagaggggga	gtggacaagt	tgtcacctac	gctctaaaca	ccttcaccaa	cctggccgtc	9540
	cagttggtga	ggatgatgga	aggggaagga	gtgattggcc	cagatgatgt	ggagaaactc	9600
	acaaagggaa	aaggacctaa	agtcaggacc	tggctgtttg	agaatgggga	ggaaagactc	9660
50	agccgcatgg	ctgtcagcgg	agatgactgt	gtggtaaagc	ccctagatga	ccgcttcgcc	9720
	acctctctcc	acttcctcaa	cgccatgtca	aaggttcgca	aagatatcca	ggagtggaaa	9780
55	ccgtcaactg	gatgggtatga	ctggcagcag	gttccattct	gctcgaacca	tttcaactgaa	9840
	ttaatcatga	aagatggaag	aacactgggtg	gttccatgcc	gaggacagga	cgaactggta	9900
	ggcagagctc	gcatttctcc	aggggcccga	tggaacgtcc	gtgacactgc	ttgtctggct	9960
60	aagtcttatg	cccagatgtg	gctgcttctg	tacttccaca	gaagagacct	gcggctaattg	10020
	gccaacgcca	tttgctccgc	tgctccctgtg	aattgggtcc	ctaccggaag	aaccacgtgg	10080
65	tccatccatg	ccggagggga	gtggatgaca	acagaagaca	tgctggaggt	ctggaaccgt	10140
	gtttggatag	aggagaatga	atggatggaa	gacaaaaccc	cagtggagaa	atggagtgc	10200

ES 2 364 833 B1

```

gtcccatact caggaaaacg ggaggacatc tgggtgtggca gcttgattgg cacaagaacc 10260
cgagccacgt gggcagaaaa catccaggta gccatcaacc aagtcagagc aatcattgga 10320
5  gatgagaagt atgtggatta catgagttca ttaaagagat atgaagacac gacttttggtt 10380
gaggacacag tactgtaaat actttattaa ttgtaaatag acaatgtaag catgtgtaaa 10440
10  agtatagttt tatagtagca tttagtgatg ttagtgtaaa tagttaagaa aattttaagg 10500
aggaagtcag gccggaaaagt ttccgccacc ggaagttgag tagacggtgc tgccctgcgac 10560
tcaaccccag gaggactggg tgaacaaagc tgcgaagtga tccatgtaag ccctcagaac 10620
15  cgtctcggaa ggaggacccc acatgttgta acttcaaagc ccaatgtcag accacgctac 10680
ggcgtgccac tctgcggaga gtgcagtctg cgatagtgcc ccaggaggac tgggttaaca 10740
20  aaggcagatc aacgccccac gcggccctag ccctggtaat ggtgttaacc agggcgaaaag 10800
gactagaggt tagaggagac cccgcggttt aaagtgcacg gccagcctg actgaagctg 10860
taggtcaggg gaaggactag aggttagtggt agaccccggtg ccacaaaaca ccacaacaaa 10920
25  acagcatatt gacacctggg atagactagg agatcttctg ctctgcacaa ccagccacac 10980
ggcacagtgc gccgacaatg gtggctggtg gtgcgagAAC acaggatct 11029
30  <210> 57
    <211> 571
    <212> DNA
35  <213> West Nile virus

    <220>
    <221> source
40  <222> (1)..(571)
    <223> Aislado MP502-66 del virus West Nile, región 3'NC

    <400> 57
45  taagtttgtg gtgatcatgt aaatatagtt gtaaataatta taaaagaagt tagttgtaga 60
gagagtcagg ccggcctaaa tccgccaccg gacgttgagt agacggtgct gcctgcgact 120
50  caaccccagg aggactgggt gaacaaagct gcgaggtgat ccacgtaagc cctcagaacc 180
gtctcggaag aaggacccca cgtgttttag cctcaaggcc cagtgtcaga ccacacttag 240
tgtgccactc tgcggagagt gcagtctgcg ctagtgcgcc aggtggactg ggttatcaaa 300
55  ggcatggcaa tgccccacgc ggccccaaacc ctaatgatgg tgттаатcag ggagcaagga 360
ctagaggtta gaggagaccc cgcgttcaca agtgcacggc ccaacctagc tgaagctgta 420
60  agctagggga aggactagag gttagaggag accccgtgcc aaagaaacac caaagaaaac 480
agcatattga cacctgggaa agactagggg atcttctgct caacacaacc agccacacgg 540
65  cacagagcgc cgatgtaggt ggctggtggt g 571

```



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030126

②② Fecha de presentación de la solicitud: 29.01.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/70** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2004036190 A2 (GEN PROBE INC) 29.04.2004, página 31, línea 16 – página 32, línea 2; página 35, líneas 20-31; Tablas 5,6,7; ejemplo 4; reivindicaciones 18-29.	1-25
A	TANG, Y. et al., 'Highly sensitive TaqMan RT-PCR assay for detection and quantification of both lineages of West Nile virus RNA.', JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY, 2006 Jul, Vol. 36, No. 3, páginas 177-182, ISSN: 1386-6532, Materiales y Métodos, Resultados.	1-25
A	JIMÉNEZ-CLAVERO, M.A. et al., 'A new fluorogenic real-time RT-PCR assay for detection of lineage 1 and lineage 2 West Nile viruses.', JOURNAL OF VETERINARY DIAGNOSTIC INVESTIGATION, 2006, Vol. 18, No. 5, páginas 459-462, ISSN: 1040-6387, todo el documento.	1-25
A	VÁZQUEZ GONZÁLEZ, A., 'Búsqueda de flavivirus en mosquitos de humedales españoles. Análisis molecular del virus West Nile y otros flavivirus'. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria [en línea], Diciembre 2008 [recuperada el 07.04.2011]. Recuperada de Internet <URL: http://eprints.ucm.es/11988/1/T30950.pdf >, Materiales y Métodos, Apartado 10; Resultados, Apartado 7; Discusión, Apartado 4.	1-25
A	SÁNCHEZ-SECO, M.P. et al., 'Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification', JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, 2005, Vol. 126, Nos 1-2, páginas 101-109, ISSN: 0166-0934, todo el documento.	1-25
A	LINKE, S. et al., 'Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR', JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, 2007, Vol. 146, Nos 1-2, páginas 355-358, ISSN: 0166-0934, todo el documento.	1-25
A	ZAAYMAN, D. et al., 'A highly sensitive method for the detection and genotyping of West Nile virus by real-time PCR.', JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, 2009 May, Vol. 157, No. 2, páginas 155-160. Epub: 10.01.2009, ISSN: 0166-0934, todo el documento.	1-25

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
26.08.2011

Examinador
J. Vizán Arroyo

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, EMBL-EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.08.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-25	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-25	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2004036190 A2 (GEN PROBE INC.)	29.04.2004
D02	TANG, Y. et al., <i>J. Clin. Virol.</i> , (2006 Jul), 36(3): 177-82.	2006
D03	JIMÉNEZ-CLAVERO, M.A. et al., <i>J. Vet. Diagn. Invest.</i> , (2006), 18(5): 459-62.	2006
D04	VÁZQUEZ GONZÁLEZ, A., Tesis doctoral.	2008
D05	SÁNCHEZ-SECO, M.P. et al., <i>J. Virol. Methods</i> , (2005), 126(1-2): 101-9.	2005
D06	LINKE, S. et al., <i>J. Virol. Methods</i> , (2007), 146(1-2): 355-8.	2007
D07	ZAAYMAN, D. et al., <i>J. Virol. Methods</i> , (2009), 157(2): 155-60.	10.01.2009

En D1-D7 se analizan diferentes métodos de detección del virus West Nile (WNV) basados en la aplicación de una reacción TaqMan RT-PCR específica.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes) y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).****1.1. El objeto de la reivindicación 1 consiste en un método para la detección del virus West Nile (WNV) basado en la amplificación de los ácidos nucleicos del virus mediante los cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, y en la posterior detección del fragmento amplificado.**

Según la solicitud de patente, el método reivindicado, capaz de detectar con sensibilidad y especificidad cualquiera de los siete linajes conocidos de WNV, consiste básicamente en la amplificación de un fragmento de la región 3' no codificante (3' NC) del genoma viral mediante el par de oligonucleótidos cebadores SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 cuya secuencia está degenerada en posiciones puntuales. Además, el fragmento amplificado puede ser detectado con la sonda de secuencia degenerada SEQ ID NO: 3 (cf. Página 10, línea 2- Página 11, línea 1).

En el estado de la técnica más próximo, representado por los documentos D1-D4, se han descrito métodos de detección de WNV basados en la amplificación de la región 3' NC del genoma viral mediante el uso de diferentes pares de oligonucleótidos cebadores y de sondas marcadas (cf. D1: página 31, línea 16 - página 32, línea 2; página 35, líneas 20 - 31; Tablas 5, 6 y 7. D2: Materiales y Métodos. D3: Tabla 1. D4: Materiales y Métodos, Apartado 10; Resultados, Apartado 7; Discusión, Apartado 4). La sensibilidad y especificidad de los procedimientos descritos en el estado de la técnica dependen de las características técnicas de los oligonucleótidos cebadores empleados, en particular, de su longitud y de su secuencia de nucleótidos (cf. D1: Ejemplo 4).

Aunque las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 coinciden parcialmente con las de algunos de los pares de cebadores divulgados en D1-D3, sin embargo, tanto su longitud como las degeneraciones puntuales en su secuencia de nucleótidos son características técnicas no descritas previamente. Además, dichas secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 no se deducen de una manera obvia combinando las secuencias de los diferentes oligonucleótidos cebadores divulgados en D1-D7. Por consiguiente, el objeto de protección de la reivindicación independiente 1 y el de las reivindicaciones dependientes 2-25 se considera que es nuevo y tiene actividad inventiva sobre la base de los documentos D1-D7.

1.2. La presente solicitud satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-25 es nuevo y tiene actividad inventiva de acuerdo con los Arts. 6.1. y 8.1. de la Ley de Patentes.