



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 345 790**

⑮ Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

C12Q 1/34 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **07729279 .5**

⑯ Fecha de presentación : **18.05.2007**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **2018564**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **28.01.2009**

⑭ Título: **Procedimiento de detección de virus de gripe.**

⑩ Prioridad: **18.05.2006 EP 06114170**
23.08.2006 US 839415 P
23.08.2006 EP 06119398

⑬ Titular/es: **Veterinärmedizinische Universität Wien**
Veterinärplatz 1
1210 Vienna, AT

⑮ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.10.2010

⑭ Inventor/es: **Bovin, Nikolay Vladimirovich;**
Lubavina, Irina Alexandrovna y
Leiser, Robert-Matthias

⑮ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.10.2010

⑭ Agente: **Carpintero López, Mario**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de detección de virus de gripe.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de detección rápida de virus y/o partículas víricas de la gripe que comprenden un componente hemaglutinina y un componente neuraminidasa, dicho procedimiento comprende la unión de los virus y/o partículas víricas a un soporte mediante una molécula de unión específica, que se une al componente hemaglutinina de los virus y/o partículas víricas y que detecta a los virus y/o partículas víricas unidos mediante la reacción del componente neuraminidasa con su sustrato enzimático, que da como resultado una señal 10 detectable. Adicionalmente se refiere a un sistema de detección para la detección rápida de virus y/o partículas víricas de la gripe que emplea el procedimiento según la invención y al uso del sistema de detección según la invención.

15 Todos los virus de la gripe aviar (GA) son virus de la gripe de tipo A de la familia de los virus *Orthomyxoviridae* y todas las cepas conocidas del virus de la gripe A infectan a pájaros. Los virus de la gripe de tipo A se subdividen en subtipos en base a la proteína hemaglutinina (H) y neuraminidasa (N) que sale del núcleo central del virus. Existen 16 tipos de H y hasta 9 subtipos de N, dando 144 combinaciones potenciales diferentes de proteínas H y N.

20 La gripe aviar (también conocida como gripe de los pájaros, gripe aviar, gripe A del virus de la gripe, gripe de tipo A, o gripe de género A) es una gripe provocada por un tipo de virus de la gripe que tiene a los pájaros como huésped, pero que puede infectar a diversas especies de mamíferos.

25 Una pandemia de gripe es una epidemia a gran escala del virus de la gripe, tal como la gripe española de 1918. La Organización Mundial de la Salud (OMS) advierte de que existe un riesgo sustancial de una pandemia de gripe en los próximos años. Uno de los candidatos más probables es el subtipo A (H5N1) de la gripe aviar.

30 El H5N1 es un tipo de virus de la gripe aviar (virus de la gripe de los pájaros) que ha mutado por deriva antigenética en docenas de variantes altamente patógenas, pero todas ellas pertenecen actualmente al genotipo Z del virus de la gripe aviar H5N1. El genotipo Z surgió por redistribución en 2002 de genotipos previos altamente patógenos de H5N1 que apareció por primera vez en China en 1996 en pájaros y en Hong Kong en 1997 en seres humanos. Los virus H5N1 de infecciones en seres humanos y los virus aviares íntimamente relacionados aislados en 2004 y 2005 pertenecen a un solo genotipo, a menudo denominado genotipo Z.

35 Los subtipos de gripe aviar que se han confirmado en seres humanos, ordenados por el número de muertes humanas conocidas, son: el H1N1 que causó la gripe española, el H2N2 que causó la gripe asiática, el H3N2 que causó la gripe de Hong Kong, H5N1, H7N7, H9N2, H7N2, H7N3, H10N7.

40 Para poder responder rápidamente en caso de que aparezca una nueva cepa mutada y virulenta de gripe capaz de transmitirse de humano a humano se requiere un procedimiento de ensayo rápido y fiable para determinar si un animal o una persona están infectados con el virus. Los procedimientos de laboratorio actuales para la detección de virus a partir de muestras medioambientales, animales, y de pacientes son laboriosos y requieren tiempo.

45 El documento US-B-6.503.745 divulga compuestos de ciclopentano y de ciclopenteno suministrados junto con su uso en un procedimiento para la detección del virus de la gripe. El virus es capturado usando una superficie recubierta de fetuña y la detección se lleva a cabo con un compuesto marcado que se une a neuraminidasa.

50 D.E. Noyola y col. informan en el *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, p. 1161-1165 sobre perlas recubiertas con fetuña. La fetuña también actúa como sustrato para la neuraminidasa, y la detección se lleva a cabo usando aglutinación.

55 El documento US-A-2003/0129618 divulga procedimientos y composiciones para la detección de analitos usando la fluorescencia que se produce en un material polimérico en respuesta a la unión selectiva de analitos a materiales poliméricos. En particular, la presente invención permite la detección fluorescente de reacciones que modifican la membrana y de analitos responsables de esas modificaciones y la selección de los inhibidores de acción.

El documento US-B-6.503.745 divulga ciclopentano y compuestos de ciclopenteno y su uso en un procedimiento para la detección del virus de la gripe.

60 Todas las soluciones rápidas *in situ* conocidas y accesibles se basan en el uso de anticuerpos contra epítropos virales o en simples pruebas para la neuraminidasa (NA). La principal desventaja de las soluciones con anticuerpos basados en una técnica de flujo lateral u otros tipos de ensayo es la inestabilidad de los reactivos anticuerpos. Además, la mayoría de ensayos inmunológicos disponibles hasta la fecha muestran una especificidad por la gripe A, pero no por H5N1. Adicionalmente, el uso de anticuerpos conduce irremediablemente a un incremento de los costes del ensayo.

65 La principal desventaja de las pruebas de NA específicas para los virus de la gripe es el caro reactivo del sustrato necesario usado en el estado de la técnica, que debe estar parcialmente metilado.

ES 2 345 790 T3

La presente invención soluciona estos problemas proporcionando un procedimiento para la detección rápida de virus y/o partículas víricas de la gripe, un sistema de detección que emplea dicho procedimiento así como el uso de dicho sistema de detección como se define en las reivindicaciones.

5 En la memoria descriptiva se usarán las siguientes abreviaturas:

3'SLN = Neu5Aca2-3Gal β 1-4GlcNAc

10 HA = hemaglutinina;

HAR = reacción de hemaglutinación;

15 LOD = límite de detección;

NA = neuraminidasa;

TCID = dosis infecciosa para un cultivo tisular;

20 Tampón TN = tris-HCl 0,02 M (pH 7,2) con NaCl 0,1 M.

Según la invención se emplea un procedimiento de detección rápida de virus y/o partículas víricas de la gripe, el procedimiento que comprende las etapas de:

25 a) la unión de virus y/o partículas víricas a un soporte que contiene al menos un tipo de receptor de carbohidrato seleccionado del grupo constituido por oligosacáridos naturales o sintéticos, que está conjugado a, o situado en una composición con glicoproteínas como la glicoforina, la a1-glicoproteína ácida, la a2-macroglobulina, el ovomucoide, y sus combinaciones cuyo receptor de carbohidrato se une al componente hemaglutinina de los virus y/o partículas víricas;

30 b) la reacción del componente neuraminidasa de los virus y/o partículas víricas unidos con su sustrato enzimático marcado, que causa la generación de una señal detectable; y

35 c) la detección de la señal generada en la etapa b).

En particular, se detectan virus y/o partículas víricas de la gripe que comprenden todos los subtipos conocidos de gripe aviar (IA).

40 En otra forma de realización de la invención los virus y/o partículas víricas de la gripe comprenden un cierto subtipo o grupo de subtipos. El procedimiento es adecuado para detectar virus y/o partículas víricas de la gripe que comprenden una variante altamente patógena.

45 La invención se puede realizar en particular con un soporte que es un papel o membrana cromatográficos. Esos materiales son muy conocidos por la persona experta en la materia. Según la invención es posible unir covalentemente o adsorber físicamente el receptor de carbohidrato, como se ha mencionado anteriormente, al soporte.

50 En particular, la invención emplea un receptor de carbohidrato que contiene el motivo α 2-3Gal. Según una forma de realización de la invención (solución con transferencia de manchas) la unión de los virus y/o partículas víricas se lleva a cabo cargando una muestra que contiene los virus y/o partículas víricas en el soporte en forma de punto. Según la invención la unión de los virus y/o partículas víricas se lleva a cabo poniendo en remojo una muestra que contiene los virus y/o partículas víricas a lo largo de dicho soporte en forma de la denominada aproximación de flujo lateral. En otra forma de realización de la invención un sustrato enzimático marcado del componente neuraminidasa se precipita en el sitio del virus y/o partículas víricas unidos.

55 En otra forma de realización más de la presente invención, el sustrato enzimático está marcado con un grupo cromógeno y la reacción con una neuraminidasa induce un cambio de color de dicho sustrato enzimático. Como sus tratos enzimáticos se pueden emplear, entre otros, los siguientes derivados cromógenos del ácido N-acetilneuramínico, en particular, el ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -N-acetilneuramínico. Alternativamente, la reacción con la neuraminidasa induce una señal de fluorescencia específica cuando se emplean como marcador moléculas fluorescentes adecuadas.

60 El procedimiento de la invención se puede llevar a cabo de manera ventajosa con un sistema de detección para la detección rápida de virus y/o partículas víricas de la gripe según la invención. El sistema comprende un sistema de detección para la detección rápida de virus y/o partículas víricas de la gripe usando el procedimiento de la invención, dicho sistema que comprende:

65 a) un soporte que contiene al menos un tipo de receptor de carbohidrato seleccionado del grupo constituido por oligosacáridos naturales o sintéticos, que está conjugado a, o situado en una composición con glicoproteínas como

la glicoforina, la a1-glicoproteína ácida, la a2-macroglobulina, el ovomucoide, y sus combinaciones cuyo receptor de carbohidrato se une al componente hemaglutinina de los virus y/o partículas víricas;

5 b) un sustrato enzimático marcado que reacciona con el componente neuraminidasa, generando así una señal detectable.

10 En particular, el soporte está encerrado en un contenedor de plástico con una ventana para la lectura del resultado de la prueba con una muestra y un control positivo. El soporte comprende, en particular, al menos dos cantidades diferentes de dichos agentes aglutinantes específicos para la estimación semi-cuantitativa del contenido en virus de la muestra. En otra forma de realización, el soporte comprende al menos dos receptores específicos de especificidad de 15 subtipo diferente para la detección simultánea de virus que pertenecen a diferentes subtipos. El sistema de detección de la invención sirve como unidad contenedora y de transporte de la muestra para pruebas confirmatorias como la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa después de revelar la presencia de virus y/o partículas víricas de la especificidad buscada.

15 Según la invención, también se reivindica el uso de un sistema de detección para la detección del virus y/o partículas víricas de la gripe en muestras de animales y/o seres humanos tales como frotis, heces y sangre en muestras del entorno y/o como un sistema de alerta temprana de la emergencia de subtipos de virus altamente patógenos.

20 La hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) están presentes sobre la superficie de virus de la gripe. La HA induce la unión del virus a receptores celulares que contienen sialilo, mientras que la NA promueve el acceso del virus a las células diana y facilita la liberación del virus de las células infectadas y de inhibidores naturales [Matrosovich, M.N., Matrosovich, T.Y., Gray, T., Roberts, N.A., Klenk, H.D. 2004: J. Virol., 78(22) 12665-7], es decir, la HA está para la unión al receptor mientras que la NA está para la destrucción del receptor. Una condición importante para una 25 replicación vírica eficiente es la acción concertada de la HA y la NA, y para especies diferentes la relación de estas dos actividades es diferente. Los virus de la gripe aislados de pájaros presentan algunas características distintivas. Todos los virus de gripe aviar poseen HA, que presentan la afinidad más elevada por cadenas de carbohidratos Neu5Acα2-3Gal-terminales. Además, su actividad NA es mayor comparada con virus de otros orígenes.

30 En el procedimiento de detección y el sistema de detección según la presente invención, se usan estas propiedades de ambos componentes del virión, HA y NA, de virus aviares. Un virus de la gripe estará unido a una molécula de unión específica, preferentemente a una sustancia que contenga carbohidratos sialilados y que esté acoplada a una membrana, seguido de la reacción con, preferentemente la digestión de, un sustrato neuraminidasa que provoque la muerte de la 35 zona que contiene el virus sobre la membrana. El procedimiento de detección del virus de la gripe y el sistema según la presente invención presentan una variedad de ventajas comparados con sistemas de prueba del estado de la técnica. Usando dos componentes, HA y NA, se incrementa la especificidad del ensayo y permite la construcción de sistemas de detección con especificidades seleccionadas. Al mismo tiempo y en contraste con los sistemas de detección basados en procedimientos inmunológicos, no hay necesidad de una enzima marcadora adicional para revelar la detección positiva, debido a que para este propósito se usa la propia neuraminidasa viral.

40 Las diferentes variantes de los tipos de moléculas receptoras carbohidrato exhaustivamente seleccionadas recogerán todos los virus de la gripe independientemente del tipo y del subtipo, y son capaces de la detección simultánea específica de variantes altamente patógenas como la H5N1.

45 El resultado del procedimiento de detección según la invención se puede obtener sin el uso de ningún dispositivo sofisticado.

El procedimiento según la invención permite la detección de virus de la gripe en el intervalo de 0,1 a 2 horas.

50 La invención se explicará en profundidad por medio de los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1

55 *Síntesis de un conjugado de poliacrilamida del trisacárido 3'SLN para la preparación de la molécula receptora carbohidrato específica*

Una disolución de 1,7 mg (10 μ mol) de ácido poliacrílico completamente activado con N-hidroxisuccinimida, 60 MW ~1000 kDa, en 200 μ l de DMSO, y 4 μ l de diisopropiletilamina se añadieron a una disolución de 1,46 mg (2 μ mol) de 3'SLN-O(CH₂)₃NH₂ en 200 μ l de DMSO, la mezcla se mantuvo a 37°C durante 48 h, se añadieron 40 μ l de una disolución de amoniaco acuoso al 25% o 40 μ l de etanolamina y la disolución se mantuvo durante 18 h a temperatura ambiente, seguido de cromatografía de exclusión molecular en sefarosa LH, con un rendimiento del 90% 65 aproximadamente.

ES 2 345 790 T3

Ejemplo 2

Detección de virus de la gripe en fluido alantoico usando el procedimiento y el sistema de prueba según la invención

5 *Kit de ejemplo*

1. Tira de prueba
2. Tampón de la sonda. Tampón 1
- 10 3. Tampón de contraste. Tampón 2
4. Tampón de lavado A. Tampón 3
- 15 5. Tampón de lavado B. Tampón 4
6. Tampón de secado. Tampón 5
- 20 7. Tira doble (2 columnas con 8 pocillos) o placa de 96 pocillos
8. Tijeras o escalpelo
- 25 9. Tenazas
10. 10. Placa para el lavado de la tira
11. 11. Viales de revelado
- 30 12. Termostato (o su sustituto)
13. 35 Cámara para el procedimiento cromatográfico (o una tapa, que se usa para cubrir la placa de 96 pocillos con tiras).

35 *Materiales*

Tiras: nitrocelulosa, absorbente, algodón de la muestra obtenido en Whatman, EE.UU.

1. El reactivo específico (fetuina, Sigma) se aisló a partir de huevos de gallina frescos.
- 40 2. Tampón 1: tris-HCl 0,2 M (pH 7,2) con NaCl 3 M y el 0,5% de Tween-20
3. Tampón 2: tris-HCl 0,02 M (pH 7,2) con NaCl 0,3 M y el 0,05% de Tween-20
- 45 4. Tampón 3: tris-HCl 0,02 M (pH 7,2) con NaCl 0,1 M y el 0,05% de Tween-20
5. Tampón 4: tris-HCl 0,02 M (pH 7,2) con NaCl 0,1 M (Tampón TN)
- 50 6. Tampón 5: disolución de Neu-X 4 mM en tampón TN con CaCl₂ 0,01 M. El tampón TN se puede sustituir con otro tampón de equilibrado, por ejemplo, tampón fosfato salino o solución salina.

La tira (Figura 1) está dividida en tres zonas: zonas de puesta en remojo, de detección y de absorción. En la zona de detección está localizada una línea de la molécula receptora carbohidrato (línea de prueba) así como una línea control. Las tiras se ensamblan a partir de la membrana, el absorbente y los algodones de la muestra. La molécula receptora carbohidrato (1 microlitro de disolución de 1 mg/ml) se cargó sobre la zona de detección, después de que la tira se hubiese secado y lavado. A continuación la tira se almacenó en un matraz herméticamente cerrado a 18-25°C.

60 *Detección*

1. *Preparación de la muestra.* 1/10 partes (v/v) de Tampón 1 se añadió directamente a la sonda antes del análisis y se agitó bien. Ésta es la sonda 1 (P 1).
- 65 2. *Procedimiento de detección que involucra diversas fases (Tabla 1).*

En la primera fase, el algodón de la muestra de la tira se pone en 80-100 µl de la P 1. Tras la acción de las fuerzas capilares el líquido de la muestra se difunde hacia arriba y entra en la zona de absorción a través de la zona de detección

ES 2 345 790 T3

donde las partículas víricas se unen a la molécula receptora carbohidrato. La duración de este procedimiento depende de la viscosidad de la muestra, pero no debería superar los 15 minutos. Se añade el Tampón 2 al mismo pocillo de la placa (alternativamente es posible transferir la tira a otro pocillo relleno con el Tampón 2). Después de 10 minutos la tira se saca del pocillo.

5 *En la segunda fase*, la parte en remojo de la tira se corta (con tijeras). Después de la extracción con cuidado (por ejemplo, con la ayuda de tenazas) de la zona de absorción de la parte de la tira, la zona de prueba se lava con el Tampón 3 y a continuación con el Tampón 4. Posteriormente también se corta la zona de absorción.

10 10 *La tercera fase*. El resto de la zona de pruebas se coloca en el matraz con el Tampón 5. El matraz se cierra bien y se deja reposar en oscuridad a 37-40°C. La presencia de un virus de la gripe en la muestra se detecta como una coloración azul oscura de la zona de la molécula receptora carbohidrato. La duración de esta etapa depende de la concentración del virus en la muestra y puede llevar entre 20 minutos y 60 minutos antes de que se pueda detectar un virus por reacción de hemaglutinación (titulación HAR de 2 aproximadamente). Como norma estas muestras tienen 15 un valor de TCID/ml de 10^5 aproximadamente. Para sondas con un contenido en virus de 10 a 100 veces inferior (10^4 - 10^3 TCID/ml), la coloración puede aparecer después de varias horas. Después de este procedimiento, la tira se extrae de la disolución, seguido de una evaluación visual del resultado de la reacción.

20 *La línea control* de neuraminidasa en la zona de detección se usa para la evaluación de la funcionalidad del ensayo. La coloración azul oscura de la zona control debe producirse.

Los resultados se interpretan de la siguiente forma

25 1) Si se observa una línea uniformemente coloreada, se considera un positivo, es decir, la sonda contiene el virus; la intensidad del color debe ser comparable con la intensidad de la línea control.

30 2) Si se observa una línea débilmente coloreada, la muestra contiene el virus en una concentración que es insuficiente para una detección inequívoca, y la exposición de la tira en el Tampón 5 se debe prolongar durante toda la noche o se puede repetir la prueba una vez más.

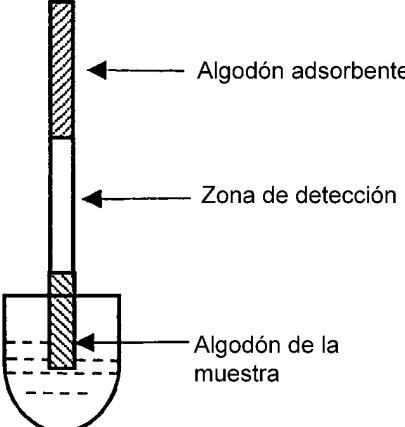
35 3) La ausencia de la línea coloreada significa que no hay virus en la muestra o su concentración es inferior al nivel de detección mínimo.

40 4) La ausencia de la línea coloreada en la línea del control positivo significa que el experimento se llevó a cabo de manera incorrecta o que la NA en la línea control ha sido destruida; en ese caso se recomienda volver a someter a prueba al espécimen usando un nuevo kit de prueba.

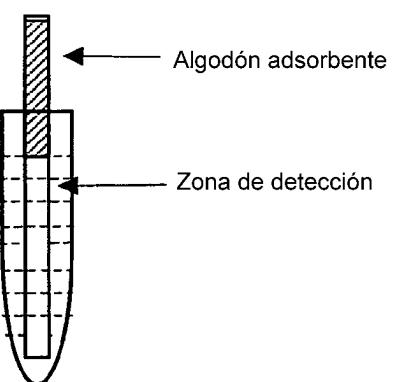
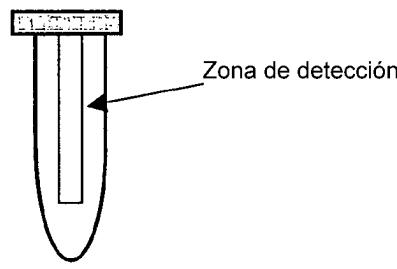
Los datos sobre la sensibilidad de la prueba se dan en la Tabla 2.

40 TABLA 1

Esquema del procedimiento de detección según la invención

45 ETAPA	PROCEDIMIENTO	FIGURA	CONDICIÓN
50 1	Preparación previa a la prueba		
55 2	Remojo/cromatografía	 <p>Algodón adsorbente</p> <p>Zona de detección</p> <p>Algodón de la muestra</p>	<p>El algodón de la muestra de la tira se coloca verticalmente al contenedor del espécimen durante 10 min a temperatura ambiente</p>

ES 2 345 790 T3

3	Lavado	 <p>Algodón adsorbente</p> <p>Zona de detección</p>	<p>Después de la extracción del algodón de la muestra la parte restante de la tira se coloca en la disolución de lavado</p>
4	Revelado en oscuridad	 <p>Zona de detección</p>	<p>20 min - 2 h en oscuridad a 40°C en la disolución sustrato de neuraminidasa</p>
5	Interpretación de los resultados	 <p>Línea de control azul</p> <p>Línea de prueba azul</p> <p>Positivo</p> <p>Negativo</p> <p>Inválido</p>	<p>Los resultados se evaluaron visualmente. En caso de resultado positivo (la muestra contiene virus en una concentración superior al límite de detección) se deberían observar dos líneas. La intensidad de la coloración de la línea de prueba debe ser comparable con la de la línea control. En caso de resultado negativo sólo se observa la línea control. Cuando no se pueda observar la línea control es necesario repetir la prueba.</p>

Ejemplo 3

Detección del virus de la gripe en heces de gallina usando el sistema de detección según la invención

En este ejemplo se usaron los mismos materiales y procedimientos que en el Ejemplo 2.

1. Se llevaron a cabo diluciones en serie de sondas que contienen el virus en suspensión de heces de gallinas sanas (2 g de sustancia seca por 10 ml de tampón). Se ha demostrado que las heces no afectan a la sensibilidad y especificidad de la detección del virus de la gripe con la prueba.

ES 2 345 790 T3

2. A heces frescas de gallina se les añadió 1/10 partes (v/v) del virus A/pato/Alberta/76 (titulación HAR 1:10) y la mezcla se homogeneizó. Después de la adición del Tampón 2 al homogeneizado (1:1 v/v), se tomó una alícuota de la suspensión resultante para su uso en el ensayo. La coloración azul oscura en la zona de prueba apareció después de 2 h. No se observó una influencia remarcable sobre los resultados de la prueba cuando las heces de gallina se añadieron a las muestras de la Tabla 1 antes de comenzar el procedimiento de ensayo.

Ejemplo 4

10 *Detección de virus de la gripe en tejido pulmonar de gallina muerta usando el sistema de detección según la invención*

En este ejemplo se usaron los mismos materiales y procedimientos que en el Ejemplo 2.

15 Se analizó el tejido pulmonar de una gallina que había muerto de infección por el virus de la gripe H5N1 y que se había extraído con tampón silina (recogido en: Crimea/enero de 2006). Se pudo demostrar que el virus de la gripe se puede detectar de manera fiable en el pulmón del cadáver de la gallina analizada.

TABLA 2

20 *Límite de detección (LOD) de los virus de la gripe aviares en muestras que contienen virus tal y como se someten a pruebas con el sistema de prueba según la invención*

25 Nº	VIRUS	LOD para 2 h	
		30 TCID/ml	35 Titulación HAR/ muestra
1	A/pato/Alberta/35/76 (H1N1)	10^5	4
2	A/pato/Francia/146/82 (H1N1)	2×10^4	10^{-2}
3	A/ánade/Primorie/695/76 (H2N3)	2×10^7	10
4	A/gaviota/Astrakhan/165/86 (H6N5)	10^3	10^{-1}
5	A/FPV/Rostock/34 (H7N1)	10^4	1
6	A/pato real/NT/12/02 (H7N3)	5×10^4	5×10^{-1}
7	A/pato real/Primorie/3/82 (H9N2)	10^6	10^{-1}
8	A/Hongkong/1073/99 (H9N2)	10^5	1
9	A/pato real/Guriev/244/82 (H14N6)	5×10^6	10^{-1}
10	A/pato real/PA/10218 (H5N2)	No determinado	10^{-2}
11	A/pato/Postdam/1402/6/86 (H5N2)	5×10^2	5×10^{-1}
12	A/NIBRG-14 (H5N1) ^a	5×10^3	5
13	A/gallina/Kurgan/5/2005 (H5N1) 2 pasos en MDCK	10^4	<1
14	A/pato/Kurgan/8/2005 (H5N1) 2 pasos en MDCK	10^6	10^{-1}

55 ^a- Ésta es la cepa de vacuna, que tiene los genes HA y NA del virus patógeno A/Vietnam/1194/04 y todos los genes de la proteína interna de A/Puerto Rico/2/34. Los virus se obtuvieron del Instituto de Poliomielitis y Encefalitis Viral (región de Moscú) y del Instituto de la Gripe (St. Petersburgo).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección rápida de virus y/o partículas víricas de la gripe que comprende un componente 5 hemaglutinina y un componente neuraminidasa, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

10 a) la unión de virus y/o partículas víricas a un soporte que contiene al menos un tipo de receptor de carbohidrato seleccionado del grupo constituido por oligosacáridos naturales o sintéticos, que está conjugado a, o situado en una composición con glicoproteínas cuyo receptor de carbohidrato se une al componente hemaglutinina de los virus y/o partículas víricas;

15 b) la reacción del componente neuraminidasa de los virus y/o partículas víricas unidos con su sustrato enzimático marcado, que causa la generación de una señal detectable; y

c) la detección de la señal generada en la etapa b).

20 2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que la glicoproteína se selecciona del grupo constituido por glicoforina, la a1-glicoproteína ácida, la a2-macroglobulina, el ovomucoide, y sus combinaciones.

25 3. El procedimiento según la reivindicación 1 ó 2 en el que dichos virus y/o partículas víricas de la gripe comprenden un cierto subtipo o un grupo de subtipos, en particular todos los subtipos conocidos de gripe aviar (GA).

4. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichos virus y/o partículas víricas de la gripe comprenden 25 una variante altamente patógena.

5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el soporte es un papel o una membrana chromatográficos.

30 6. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el receptor de carbohidrato, en particular cuando el receptor de carbohidrato contiene el motivo α 2-3Gal, está unido covalentemente o adsorbido físicamente al soporte.

35 7. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha unión de dichos virus y/o partículas víricas se lleva a cabo cargando una muestra que contiene virus y/o partículas víricas a dicho soporte como un punto, o en el que dicha unión de dichos virus y/o partículas víricas se lleva a cabo poniendo en remojo una muestra que contiene virus y/o partículas víricas a lo largo de dicho soporte.

40 8. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho sustrato enzimático marcado de dicho componente neuraminidasa se precipita en el sitio del virus y/o partículas víricas unidos.

45 9. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho sustrato enzimático está marcado con un grupo cromógeno y la reacción con la neuraminidasa induce un cambio de color de dicho sustrato enzimático, en particular dicho sustrato enzimático es un derivado cromógeno del ácido N-acetilneuramínico, en particular, el ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -N-acetilneuramínico.

10. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la reacción con la neuraminidasa induce una señal de fluorescencia específica.

50 11. Un sistema de detección para la detección rápida de virus y/o partículas víricas de la gripe usando un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, comprendiendo dicho sistema:

55 a) un soporte que contiene al menos un tipo de receptor de carbohidrato seleccionado del grupo constituido por oligosacáridos naturales o sintéticos, que está conjugado a, o situado en una composición con glicoproteínas, cuyo receptor de carbohidrato se une al componente hemaglutinina de los virus y/o partículas víricas;

60 b) un sustrato enzimático marcado que reacciona con el componente neuraminidasa, generando así una señal detectable.

12. El sistema de detección según la reivindicación 11, en el que dicho soporte está encerrado en un contenedor de plástico con una ventana para la lectura de los resultados de la prueba con una muestra y un control positivo.

65 13. El sistema de detección según la reivindicación 11 y/o 12, en el que dicho soporte comprende al menos dos cantidades diferentes de dichos agentes aglutinantes específicos para la estimación semi-cuantitativa del contenido en virus de la muestra.

ES 2 345 790 T3

14. El sistema de detección según la reivindicación 11 a 13, en el que dicho soporte comprende al menos dos receptores específicos de diferente especificidad de subtipo para una detección simultánea de virus que pertenecen a subtipos diferentes.

5 15. El sistema de detección según cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en el que el sistema, después de revelar la presencia del virus y/o partículas víricas de especificidad buscada, sirve como unidad contenedora y de transporte de la muestra para pruebas confirmatorias como la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa.

10 16. Uso del sistema de detección según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 para la detección del virus y/o partículas víricas de la gripe en muestras de animales y/o seres humanos como frotis, heces y sangre, en muestras del entorno y/o como un sistema de alerta temprana de la emergencia de subtipos de virus altamente patógenos.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

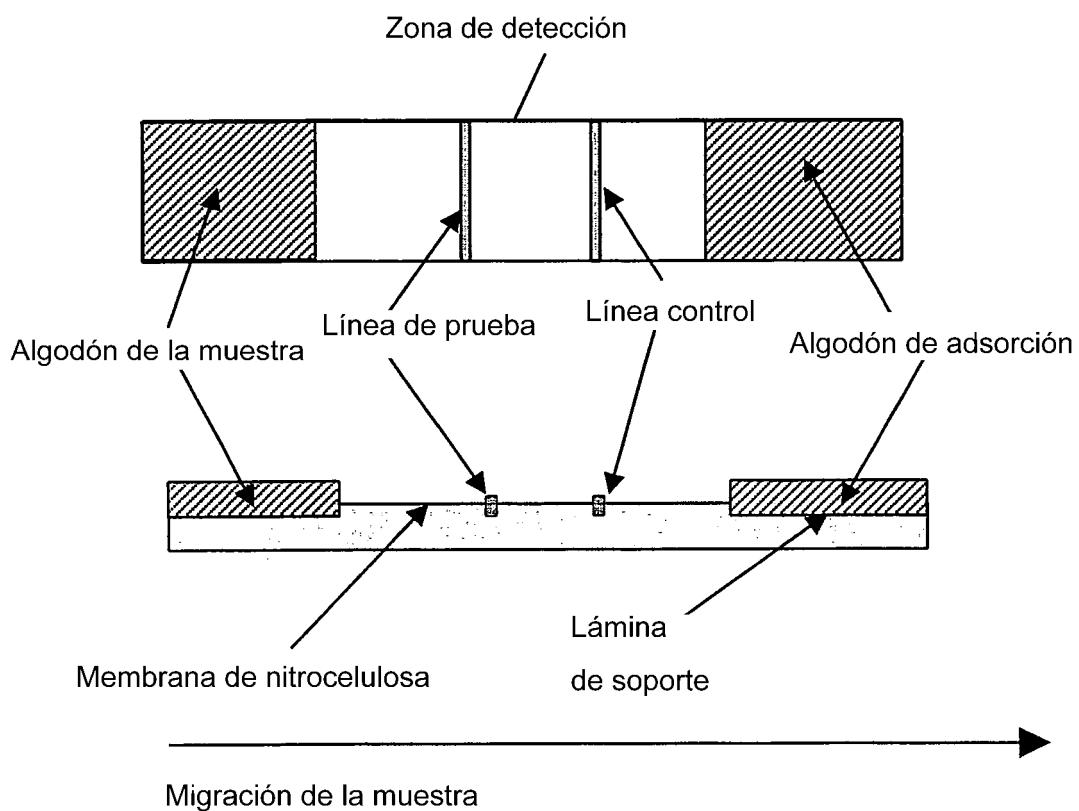


Figura 1: Diagrama esquemático de una tira de prueba para una prueba de flujo lateral