

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 969 020**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/70**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2017 PCT/EP2017/055650**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.09.2017 WO17153566**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2017 E 17710224 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2023 EP 3426805**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para la detección del virus de Zika**

30 Prioridad:

**11.03.2016 US 201662306803 P**

**26.04.2016 US 201662327688 P**

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

**16.05.2024**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)**

**Grenzacherstrasse 124**

**4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**DUGENNY, SLAV;**

**FISS, ELLEN H.;**

**FONG, JEFFERY;**

**HEIL, MARINTHA;**

**SPIER, EUGENE y**

**SUN, JINGTAO**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 969 020 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones y procedimientos para la detección del virus de Zika

5 **Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere al campo del diagnóstico vírico y, más en particular, a la detección del virus de Zika.

10 **Antecedentes de la invención**

El virus de Zika, un miembro de la familia *Flaviridae* y el género *Flavivirus*, es un virus que se transmite por mosquitos *Aedes*, que incluyen *A. aegypti* y *A. albopictus*. El virus de Zika está relacionado con el virus del dengue, el virus de la fiebre amarilla, el virus de la encefalitis japonesa (JEV) y el virus del Nilo Occidental (WNV). La infección por el virus de Zika se conoce como fiebre de Zika y, en los humanos, puede causar fiebre, erupción cutánea y malestar general. La infección por el virus de Zika está relacionada con afecciones neurológicas en adultos, incluido el síndrome de Guillain-Barré. Además, a principios de 2016, la infección por el virus de Zika en mujeres embarazadas se ha relacionado con abortos espontáneos y/o microcefalia. Hasta la fecha, no se conocen tratamientos farmacológicos ni vacunas eficaces contra la infección por el virus de Zika.

En 2013-2014, hubo brotes epidémicos del virus de Zika en Oceanía. En mayo de 2015 se identificó en Brasil el primer caso confirmado de infección por el virus de Zika. Desde mayo de 2015, se estima que ha habido entre 440.000 y 1.300.000 personas infectadas en Brasil. Los recientes brotes en Brasil se han relacionado con el alto número de reclamaciones por microencefalía. A principios de 2016 estaba en curso un brote generalizado del virus de Zika, principalmente en el continente americano, que se originó en Brasil y se propagó a otros países de América del Sur, América Central, México y el Caribe.

Se han desarrollado pruebas serológicas (ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) o inmunofluorescencia) para el virus de Zika. Sin embargo, la reactividad cruzada con otros flavivirus, incluidos el dengue o la fiebre amarilla, limita la utilidad de una prueba diagnóstica de anticuerpos IgM. Además, es posible que los anticuerpos no estén presentes en la fase temprana de la infección, lo que reduce aún más la utilidad y la idoneidad de una prueba serológica para la infección aguda. Por tanto, existe la necesidad en la técnica de un procedimiento rápido, fiable, específico y sensible para detectar el virus de Zika. Los procedimientos para la detección del virus de Zika mediante PCR son conocidos en la técnica anterior, tales como Lanciotti *et al*, 2008 (Emerging Infectious Diseases, vol.14, n.º 8, pp.1232-1239) y Faye *et al*, 2013 (Virology Journal, vol.10, n.º1, p.311).

**Sumario de la invención**

El alcance de la invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

La presente divulgación se refiere a procedimientos para la detección rápida de la presencia o ausencia del virus de Zika en una muestra biológica o no biológica mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ultrarrápida con retrotranscriptasa. Los procedimientos de detección del virus de Zika comprenden realizar al menos una etapa de ciclado, que incluye una etapa de amplificación y una etapa de hibridación. Además, se divulgan cebadores, sondas y kits que están diseñados para la detección del virus de Zika en un solo tubo. Los procedimientos están diseñados para dirigirse a la región del genoma que codifica la región de la envoltura (E). Otros procedimientos se dirigen además a regiones no estructurales (NS), tales como NS3 y/o NS5.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de detección del virus de Zika en una muestra, comprendiendo el procedimiento: realizar una etapa de amplificación que comprende poner en contacto la muestra con un conjunto de cebadores oligonucleotídicos para producir un producto de amplificación si está presente un ácido nucleico del virus de Zika en la muestra; realizar una etapa de hibridación que comprende poner en contacto el producto de amplificación con una sonda oligonucleotídica detectable; y detectar la presencia o ausencia del producto de amplificación, en la que la presencia del producto de amplificación es indicativa de la presencia del virus de Zika en la muestra y en la que la ausencia del producto de amplificación es indicativa de la ausencia del virus de Zika en la muestra; en la que el conjunto de cebadores oligonucleotídicos se hibrida específicamente con la región de envoltura (E) del ácido nucleico del virus de Zika para producir un producto de amplificación en la etapa de amplificación y comprende un primer cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:1 y un segundo cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:5; y en la que la sonda oligonucleotídica detectable se hibrida específicamente con dicho producto de amplificación y comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:9. En algunos modos de realización, la etapa de hibridación comprende poner en contacto el producto de amplificación con la sonda detectable que se marca con un resto fluorescente donante y un resto aceptador correspondiente; y la etapa de detección comprende detectar la presencia o ausencia de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre el resto fluorescente donante y el resto aceptador de la

sonda, en la que la presencia o ausencia de fluorescencia es indicativa de la presencia o ausencia del virus de Zika en la muestra. En algunos modos de realización, la etapa de amplificación emplea una enzima polimerasa que tiene una actividad nucleasa en dirección 5' a 3'. En algunos modos de realización, el resto fluorescente donante y el resto aceptador correspondiente están separados en no más de 8-20 nucleótidos entre sí en la sonda. En algunos modos de realización, el resto aceptador es un extintor. En algunos modos de realización, la muestra es una muestra biológica. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además un procedimiento para detectar un ácido nucleico de uno o más de otros virus, en paralelo. En el presente documento, los uno o más de otros virus se pueden seleccionar del grupo que consiste en virus del dengue, virus del chikungunya y virus del Nilo Occidental. En algunos modos de realización, los oligonucleótidos tienen 40 nucleótidos o menos. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además realizar la etapa de amplificación y la etapa de hibridación en presencia de uno o más conjuntos adicionales de cebadores oligonucleotídicos para producir uno o más productos de amplificación adicionales si un ácido nucleico del virus de Zika está presente en la muestra y una o más sondas oligonucleotídicas detectables adicionales, en la que la presencia de los uno o más productos de amplificación adicionales es indicativa de la presencia del virus de Zika en la muestra y en la que la ausencia de los uno o más productos de amplificación adicionales es indicativa de la ausencia del virus de Zika en la muestra y en la que un conjunto adicional de cebadores oligonucleotídicos se hibrida con la región no estructural NS5 del ácido nucleico del virus de Zika y comprende un primer cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:2 y un segundo cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:6; y una sonda oligonucleotídica detectable adicional se hibrida específicamente con dicho producto de amplificación y comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:10; o/y un conjunto adicional de cebadores oligonucleotídicos se hibrida con la región no estructural NS3 del ácido nucleico del virus de Zika y comprende un primer cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:3 y un segundo cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:7; y una sonda oligonucleotídica detectable adicional que comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:11. En el presente documento se divulgan oligonucleótidos que comprende o que consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO:1-12 o un complemento de las mismas, presentando dichos oligonucleótidos 100 nucleótidos o menos. Los oligonucleótidos pueden tener 40 nucleótidos o menos (por ejemplo, 35-40 nucleótidos, 35 nucleótidos o menos, por ejemplo, 30-35 nucleótidos, 30 nucleótidos o menos, por ejemplo, 25-30 nucleótidos, 25 nucleótidos o menos, por ejemplo, 20-25 nucleótidos, etc.). Los oligonucleótidos pueden comprender al menos un nucleótido modificado, por ejemplo, para alterar la estabilidad de la hibridación de ácidos nucleicos con respecto a nucleótidos no modificados. Opcionalmente, los oligonucleótidos comprenden al menos un marcador y al menos un resto de extintor. La amplificación puede emplear una enzima polimerasa que tiene actividad nucleasa en dirección 5' a 3'. Por tanto, el resto fluorescente donante y el resto aceptador, por ejemplo, un extintor, pueden estar separados en no más de 5 a 20 nucleótidos (por ejemplo, en 8 o 10 nucleótidos) entre sí a lo largo de la longitud de la sonda. Además, la sonda puede incluir una secuencia de ácido nucleico que permita la formación de estructuras secundarias. Dicha formación de estructuras secundarias puede dar como resultado una proximidad espacial entre el primer y segundo resto fluorescente. De acuerdo con este procedimiento, el segundo resto fluorescente en la sonda puede ser un extintor.

Las sondas específicas para el virus de Zika se pueden marcar con un tinte fluorescente, que actúa como indicador. La sonda también puede tener un segundo tinte, que actúa como extintor. El tinte indicador se mide a una longitud de onda definida, lo que permite, por tanto, la detección y discriminación de la diana del virus de Zika amplificada. La señal fluorescente de las sondas intactas es suprimida por el tinte extintor. Durante la etapa de amplificación por PCR, la hibridación de las sondas con el molde de ADN monocatenario específico da como resultado la escisión por la actividad nucleasa en dirección 5' a 3' de la ADN polimerasa, lo que da como resultado la separación de los tintes indicador y extintor y la generación de una señal fluorescente. Con cada ciclo de PCR, se generan cantidades incrementadas de sondas escindidas y, al mismo tiempo, se incrementa la señal acumulativa del tinte indicador. Opcionalmente, una o más sondas adicionales (por ejemplo, tal como un control de referencia interno u otra sonda dirigida (por ejemplo, otros ácidos nucleicos víricos) también se pueden marcar con un tinte fluorescente indicador, único y distinto del marcador de tinte fluorescente asociado con la sonda para el virus de Zika. En tal caso, debido a que los tintes indicadores específicos se miden a longitudes de onda definidas, es posible la detección y discriminación simultáneas de la diana del virus de Zika amplificada y las una o más sondas adicionales.

También se proporcionan procedimientos para detectar la presencia o ausencia del virus de Zika, o ácido nucleico del virus de Zika, en una muestra biológica de un individuo. Estos procedimientos se pueden emplear para detectar la presencia o ausencia del virus de Zika o ácido nucleico del virus de Zika en plasma, para su uso en pruebas de cribado y de diagnóstico en sangre. Además, alguien con experiencia en la técnica puede usar la misma prueba para evaluar la orina y otros tipos de muestras para detectar el virus de Zika o ácido nucleico del virus de Zika.

En otro aspecto, la presente invención se refiere además a un kit para detectar uno o más ácidos nucleicos del virus de Zika. El kit comprende un conjunto de cebadores oligonucleotídicos que se hibridan específicamente con la región de envoltura (E) del ácido nucleico del virus de Zika para producir un producto de amplificación que

comprende un primer cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:1 y un segundo cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:5; y una sonda oligonucleotídica detectable que se hibrida específicamente con dicho producto de amplificación que comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:9. En algunos modos de realización, se marca la sonda oligonucleotídica detectable, comprendiendo dicho marcador un resto fluorescente donante y un resto aceptador correspondiente. En algunos modos de realización, el kit comprende además nucleósidos trifosfato, ácido nucleico polimerasa y tampones necesarios para la función de la ácido nucleico polimerasa. En algunos modos de realización, el kit comprende además uno o más conjuntos adicionales de cebadores oligonucleotídicos y una o más sondas oligonucleotídicas adicionales, en el que un conjunto adicional de cebadores oligonucleotídicos se hibrida con la región no estructural NS5 del ácido nucleico del virus de Zika y comprende un primer cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:2 y un segundo cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:6; y una sonda oligonucleotídica detectable adicional que comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:10; o/ y un conjunto adicional de cebadores oligonucleotídicos se hibrida con la región no estructural NS3 del ácido nucleico del virus de Zika y comprende un primer cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:3 y un segundo cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO: 7; y una sonda oligonucleotídica detectable adicional que comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:11.

En el presente documento, el kit puede incluir sondas ya marcadas con los restos donante y aceptador correspondientes, por ejemplo, otro resto fluorescente o un extintor oscuro, o puede incluir restos fluorofóricos para marcar las sondas. El kit también puede incluir un prospecto del envase e instrucciones para usar los cebadores, sondas y restos fluorofóricos para detectar la presencia o ausencia de ácido nucleico del virus de Zika en una muestra.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o pruebas de la presente materia objeto, se describen a continuación procedimientos y materiales adecuados.

Los detalles de uno o más modos de realización de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y en la descripción a continuación. Otros rasgos característicos, objetivos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de los dibujos y la descripción detallada, y a partir de las reivindicaciones.

### Breve descripción de las figuras

La **FIGURA 1** muestra curvas de crecimiento de experimentos por PCR que muestran que los cebadores y sondas específicos para las regiones E (a), NS3 (b) y NS5 (c) del genoma del virus de Zika detectan el virus de Zika.

La **FIGURA 2** muestra curvas de crecimiento de experimentos por PCR que muestran que los cebadores y sondas específicos para las regiones E y NS5 del genoma del virus de Zika detectan el virus de Zika.

La **FIGURA 3** muestra curvas de crecimiento de experimentos de PCR, en presencia de un control de referencia interno, que muestran la capacidad de los cebadores y sondas para el virus de Zika para multiplexarse con otras dianas/ácidos nucleicos.

La **FIGURA 4** muestra curvas de crecimiento de experimentos por PCR que muestran que los cebadores y sondas detectan el virus de Zika a partir de una muestra biológica, por ejemplo, plasma, usando ensayos ENV y NS5.

### Descripción detallada de la invención

El diagnóstico de la infección por el virus de Zika mediante amplificación de ácidos nucleicos proporciona un procedimiento para detectar la infección vírica de forma rápida, exacta, fiable, específica y sensible. En el presente documento se describe un ensayo cuantitativo de PCR ultrarrápida con retrotranscriptasa para detectar el virus de Zika en una muestra biológica o no biológica. Se proporcionan cebadores y sondas para detectar el virus de Zika, así como artículos de fabricación o kits que contienen dichos cebadores y sondas. La especificidad y sensibilidad incrementadas de la PCR ultrarrápida para la detección del virus de Zika en comparación con otros procedimientos, así como los rasgos característicos mejorados de la PCR ultrarrápida que incluyen la contención de la muestra y la detección ultrarrápida del producto amplificado, hacen viable la implementación de esta tecnología para el diagnóstico rutinario de las infecciones por el virus de Zika en el laboratorio clínico. Además, esta tecnología se puede emplear para el cribado en sangre así como para el pronóstico. Este ensayo de detección del virus de Zika también se puede multiplexar con otros ensayos para la detección de otros ácidos nucleicos, por ejemplo, el virus del dengue, el virus del chikungunya y el virus del Nilo Occidental, en paralelo.

El genoma del virus de Zika es una molécula de ARN monocatenario de sentido positivo de 10.794 bases de longitud con dos regiones no codificantes conocidas como 5'NCR y 3' NCR. El marco de lectura abierto del virus de Zika se lee 5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'. Codifica un polipéptido que posteriormente se escinde en cápside (C), membrana precursora (prM), envoltura (E) y proteínas no estructurales (NS). La envoltura comprende la mayor parte de la superficie del virión y participa en aspectos de replicación.

La presente divulgación incluye cebadores oligonucleotídicos y sondas de hidrólisis marcadas con fluorescencia que se hibridan con el genoma del virus de Zika (por ejemplo, una región del genoma que codifica la región de envoltura (E) y/o regiones no estructurales (NS) diana, tales como NS3, NS4B y NS5), para identificar específicamente el virus de Zika usando, por ejemplo, tecnología de amplificación y detección TaqMan®. Los oligonucleótidos se hibridan específicamente con la región de envoltura (E) y/o regiones no estructurales (NS) diana, tales como NS3, NS4B y NS5. Tener oligonucleótidos que se hibridan en múltiples localizaciones en el genoma es más ventajoso para mejorar la sensibilidad que dirigirse a un locus genético de copia única.

Los procedimientos divulgados pueden incluir realizar al menos una etapa de ciclado que incluye amplificar una o más porciones de la diana del gen de la molécula de ácido nucleico de una muestra usando uno o más pares de cebadores. "Cebador(es) para el virus de Zika" como se usa en el presente documento se refiere a cebadores oligonucleotídicos que se hibridan específicamente con las secuencias de ácido nucleico encontradas en el genoma del virus de Zika, e inician la síntesis de ADN a partir de las mismas en condiciones apropiadas que producen los productos de amplificación respectivos. Los ejemplos de secuencias de ácidos nucleicos encontradas en el genoma del virus de Zika incluyen ácidos nucleicos dentro de la región de envoltura (E) y/o regiones no estructurales (NS) diana, como NS3, NS4B y NS5. Cada uno de los cebadores para el virus de Zika analizados se hibrida con una diana dentro de la región de envoltura (E) y/o regiones no estructurales (NS) diana, como NS3, NS4B y NS5, de modo que al menos una porción de cada producto de amplificación contenga secuencia de ácido nucleico correspondiente a la diana. Los uno o más productos de amplificación se producen siempre que estén presentes uno o más ácidos nucleicos en la muestra; por tanto, la presencia de los uno o más productos de amplificación es indicativa de la presencia del virus de Zika en la muestra. El producto de amplificación debe contener las secuencias de ácido nucleico que son complementarias a una o más sondas detectables para el virus de Zika. "Sonda(s) del virus de Zika" como se usa en el presente documento se refiere a sondas oligonucleotídicas que se hibridan específicamente con secuencias de ácido nucleico encontradas en el genoma del virus de Zika. Cada etapa de ciclado incluye una etapa de amplificación, una etapa de hibridación y una etapa de detección, en las que la muestra se pone en contacto con las una o más sondas detectables para el virus de Zika para la detección de la presencia o ausencia de virus de Zika en la muestra.

Como se usa en el presente documento, el término "amplificación" se refiere al procedimiento de sintetizar moléculas de ácido nucleico que son complementarias a una o ambas hebras de una molécula de ácido nucleico molde (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico del genoma del virus de Zika). La amplificación de una molécula de ácido nucleico típicamente incluye desnaturalizar el ácido nucleico molde, hibridar cebadores con el ácido nucleico molde a una temperatura que esté por debajo de las temperaturas de fusión de los cebadores y el alargamiento de forma enzimática a partir de los cebadores para generar un producto de amplificación. La amplificación típicamente requiere la presencia de desoxirribonucleósidos trifosfato, una enzima ADN polimerasa (por ejemplo, Platinum® Taq) y un tampón apropiado y/o cofactores para la actividad óptima de la enzima polimerasa (por ejemplo, MgCl<sub>2</sub> y/o KCl).

El término "cebador" como se usa en el presente documento es conocido por los expertos en la técnica y se refiere a compuestos oligoméricos, principalmente a oligonucleótidos, pero también a oligonucleótidos modificados que pueden "cebar" la síntesis de ADN por una ADN polimerasa dependiente de molde, es decir, el extremo 3', por ejemplo, del oligonucleótido proporciona un grupo 3'-OH libre donde se pueden fijar otros "nucleótidos" por una ADN polimerasa dependiente de molde que establece un enlace fosfodiéster en dirección 3' a 5', con lo que se usan desoxinucleósidos trifosfato, y con lo que se libera pirofosfato.

El término "hibridación" se refiere a la hibridación de una o más sondas con un producto de amplificación. Las "condiciones de hibridación" típicamente incluyen una temperatura que esté por debajo de la temperatura de fusión de las sondas, pero que evite la hibridación no específica de las sondas.

El término "actividad nucleasa en dirección 5' a 3'" se refiere a una actividad de una ácido nucleico polimerasa, típicamente asociada a la síntesis de la hebra de ácido nucleico, con lo que los nucleótidos se eliminan del extremo 5' de la hebra de ácido nucleico.

El término "polimerasa termoestable" se refiere a una enzima polimerasa que es estable frente al calor, es decir, la enzima cataliza la formación de productos de extensión del cebador complementarios a un molde y no se desnaturaliza de forma irreversible cuando se somete a temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para efectuar la desnaturalización de ácidos nucleicos molde bicatenarios. En general, la síntesis se inicia en el extremo 3' de cada cebador y continúa en dirección 5' a 3' a lo largo de la hebra molde. Se han aislado

polimerasas termoestables de *Thermus flavus*, *T. ruber*, *T. thermophilus*, *T. aquaticus*, *T. lacteus*, *T. rubens*, *Bacillus stearothermophilus* y *Methanothermobacter fervidus*. No obstante, también se pueden emplear polimerasas que no sean termoestables en ensayos de PCR siempre que se reponga la enzima, si es necesario.

- 5 El término "complemento del mismo" se refiere a un ácido nucleico que al mismo tiempo tiene la misma longitud que, y es exactamente complementario a, un ácido nucleico dado.

El término "extensión" o "alargamiento" cuando se usa con respecto a ácidos nucleicos, se refiere a cuando se incorporan nucleótidos adicionales (u otras moléculas análogas) en los ácidos nucleicos. Por ejemplo, un ácido nucleico se extiende opcionalmente por un biocatalizador que incorpora nucleótidos, tal como una polimerasa que típicamente añade nucleótidos en el extremo terminal 3' de un ácido nucleico.

Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad" en el contexto de dos o más secuencias de ácido nucleico se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, por ejemplo, como se mide usando uno de los algoritmos de comparación de secuencias disponibles para los expertos o por inspección visual. Los algoritmos ejemplares que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los programas BLAST, que se describen en, por ejemplo, Altschul *et al.* (1990) "Basic local alignment search tool" J. Mol. Biol. 215:403-410, Gish *et al.* (1993) "Identification of protein coding regions by database similarity search" Nature Genet. 3:266-272, Madden *et al.* (1996) "Applications of network BLAST server" Meth. Enzymol. 266:131-141, Altschul *et al.* (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs" Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 y Zhang *et al.* (1997) "PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation" Genome Res. 7:649-656.

Un "nucleótido modificado" en el contexto de un oligonucleótido se refiere a una alteración en la que al menos un nucleótido de la secuencia de oligonucleótidos se reemplaza por un nucleótido diferente que proporciona una propiedad deseada al oligonucleótido. Los nucleótidos modificados ejemplares que se pueden sustituir en los oligonucleótidos descritos en el presente documento incluyen, por ejemplo, un t-butil bencilo, una C5-metil-dC, una C5-etil-dC, un C5-metil-dU, un C5-etil-dU, una 2,6-diaminopurina, una C5-propinil-dC, un C5-propinil-dU, una C7-propinil-dA, una C7-propinil-dG, una C5-propargilamino-dC, un C5-propargilamino-dU, una C7-propargilamino-dA, una C7-propargilamino-dG, una 7-desaza-2-desoxixantosa, un análogo de pirazolopirimidina, un pseudo-dU, un nitropirrol, un nitroindol, 2'-O-metil-ribo-U, 2'-O-metil-ribo-C, una N4-etil-dC, una N6-metil-dA y similares. En el presente documento se hace referencia a muchos otros nucleótidos modificados que se pueden sustituir en los oligonucleótidos o de otro modo son conocidos en la técnica. En determinados modos de realización, las sustituciones de nucleótidos modificados modifican las temperaturas de fusión (T<sub>f</sub>) de los oligonucleótidos con respecto a las temperaturas de fusión de los oligonucleótidos no modificados correspondientes. Para ilustrar además, determinadas sustituciones de nucleótidos modificados pueden reducir la amplificación de ácidos nucleicos no específica (por ejemplo, minimizar la formación de dímeros de cebadores o similares), incrementar el rendimiento de un amplicón diana pretendido y/o similares en algunos modos de realización. Se describen ejemplos de estos tipos de modificaciones de ácido nucleico, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 6.001.611. Otras sustituciones de nucleótidos modificados pueden alterar la estabilidad del oligonucleótido o proporcionar otros rasgos característicos deseables.

#### 45 Detección del virus de Zika

La presente divulgación proporciona procedimientos para detectar el virus de Zika amplificando, por ejemplo, una porción de la secuencia de ácido nucleico del virus de Zika. Están disponibles secuencias de ácido nucleico del virus de Zika (por ejemplo, cepa de referencia: Uganda 1957, acceso: NC\_012532). Específicamente, en la presente divulgación se proporcionan cebadores y sondas para amplificar y detectar dianas de moléculas de ácido nucleico del virus de Zika.

Para la detección del virus de Zika, se proporcionan cebadores y sondas para amplificar el virus de Zika. Los ácidos nucleicos del virus de Zika distintos de los ejemplificados en el presente documento también se pueden usar para detectar virus de Zika en una muestra.

**TABLA 1: Cebadores directos para el virus de Zika**

| Cebadores directos         |            |                       |                    |
|----------------------------|------------|-----------------------|--------------------|
| Nombre del oligonucleótido | SEQ ID NO: | Secuencia             | Modificaciones     |
| ZIKF1151_21TBB             | 1          | AACATGGCGGAGGTAAGATCJ | J=t-butilbencil-dC |
| ZIKF9806_20TBB             | 2          | CTCCACCACTTCAACAAGJ   | J=t-butilbencil-dC |

| Cebadores directos         |            |                            |                    |
|----------------------------|------------|----------------------------|--------------------|
| Nombre del oligonucleótido | SEQ ID NO: | Secuencia                  | Modificaciones     |
| ZIKF6006_21TBB             | 3          | GAACCCCAACAAACCTGGAGJ      | J=t-butylbencil-dA |
| ZIKF7369_26TBB             | 4          | TTGTGGATGGAATAGTGGTAACTGAJ | J=t-butylbencil-dC |

TABLA 2: Cebadores inversos para el virus de Zika

| Cebadores inversos         |            |                                 |                    |
|----------------------------|------------|---------------------------------|--------------------|
| Nombre del oligonucleótido | SEQ ID NO: | Secuencia                       | Modificaciones     |
| ZIKR1236_30TBB             | 5          | TAATGTTCTTTTGCAGACATATTG AGTGTJ | J=t-butylbencil-dC |
| ZIKR9896_19_TBB            | 6          | CAGTCTCCCGGATGCTCCJ             | J=t-butylbencil-dA |
| ZIKR6075_26TBB             | 7          | CTGGAGGTAAATGTTGTCAAGAA<br>GCJ  | J=t-butylbencil-dA |
| ZIKR7470_17_TBB            | 8          | AGCCTCCCCCATCCCJ                | J=t-butylbencil-dC |

5 TABLA 3: Sondas para el virus de Zika

| Sondas                     |     |            |                                                    |                                 |
|----------------------------|-----|------------|----------------------------------------------------|---------------------------------|
| Nombre del oligonucleótido | del | SEQ ID NO: | Secuencia                                          | Modificaciones                  |
| ZIKPS1197_35HQ8            |     | 9          | HTGCCCAACQACAAGGTGAAGCCTA<br>CCTTGACAAGCAP         | P=fosfato, H=HEX-Thr,<br>Q=BHQ2 |
| ZIKPS9844_27HQ8            |     | 10         | HCCGCCACCQAAGATGAACGTATTG<br>GCCGP                 | P=fosfato, H=HEX-Thr,<br>Q=BHQ2 |
| ZIKPS6019_33HQ8            |     | 11         | HTGGAGGTGQGGTGTGCAGAGACT<br>GATGAAGACCAP           | P=fosfato, H=HEX-Thr,<br>Q=BHQ2 |
| ZIKPS7372_42HQ8            |     | 12         | HTGACACAAQTGACAAATTGACCCCC<br>AAGTGGAGAAGAAGATGGCP | P=fosfato, H=HEX-Thr,<br>Q=BHQ2 |

Los conjuntos de cebadores y sondas para el virus de Zika se pueden usar para detectar el virus de Zika en una muestra biológica que se sospecha que contiene el virus de Zika (tablas 1-3). Los conjuntos de cebadores y sondas pueden comprender o consistir en los cebadores y las sondas específicos para las secuencias de ácido nucleico del virus de Zika, que comprenden o consisten en las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO:1-12. En otro modo de realización que no forma parte de la invención, los cebadores y sondas para la diana del virus de Zika comprenden o consisten en una variante funcionalmente activa de cualquiera de los cebadores y sondas de SEQ ID NO:1-12.

Una variante funcionalmente activa de cualquiera de los cebadores y/o sondas de SEQ ID NO:1-12 se puede identificar usando los cebadores y/o sondas en los procedimientos divulgados. Una variante funcionalmente activa de un cebador y/o sonda de cualquiera de SEQ ID NO:1-12 pertenece a un cebador y/o sonda que proporciona una especificidad y sensibilidad similares o mayores en el procedimiento o kit descrito en comparación con la secuencia respectiva de SEQ ID NO:1-12.

La variante puede variar, por ejemplo, de la secuencia de SEQ ID NO:1-12 en una o más adiciones, deleciones o sustituciones de nucleótidos, tal como una o más adiciones, deleciones o sustituciones de nucleótidos en el extremo 5' y/o en el extremo 3' de la secuencia respectiva de SEQ ID NO:1-12. Como se detalla anteriormente, un cebador (y/o sonda) se puede modificar químicamente, es decir, un cebador y/o sonda puede comprender un nucleótido modificado o un compuesto distinto de nucleótido. Una sonda (o un cebador) es, entonces, un oligonucleótido modificado. Los "nucleótidos modificados" (o "análogos nucleotídicos") difieren de un "nucleótido" natural en alguna modificación, pero todavía consisten en una base o compuesto similar a base, un azúcar pentofuranosilo o un compuesto similar a azúcar pentofuranosilo, una parte fosfato o parte similar a fosfato o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, un "marcador" se puede unir a la porción de base de un "nucleótido", con lo que se obtiene un "nucleótido modificado". Una base natural en un "nucleótido" también se puede

reemplazar por, por ejemplo, una 7-desazapurina, con lo que también se obtiene un "nucleótido modificado". Los términos "nucleótido modificado" o "análogo nucleotídico" se usan de manera intercambiable en la presente solicitud. Un "nucleósido modificado" (o "análogo nucleosídico") difiere de un nucleósido natural en alguna modificación de la manera como se explica anteriormente para un "nucleótido modificado" (o un "análogo nucleotídico"). Se pueden diseñar oligonucleótidos, incluyendo oligonucleótidos modificados y análogos nucleotídicos que amplifican una molécula de ácido nucleico que codifica la diana del virus de Zika, por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican porciones alternativas del virus de Zika, usando, por ejemplo, un programa de ordenador tal como OLIGO (Molecular Biology Insights Inc., Cascade, Colo.). Los rasgos característicos importantes cuando se diseñan oligonucleótidos que se van a usar como cebadores de amplificación incluyen, pero no se limitan a, un producto de amplificación de tamaño apropiado para facilitar la detección (por ejemplo, por electroforesis), temperaturas de fusión similares para los miembros de un par de cebadores, y la longitud de cada cebador (es decir, los cebadores necesitan ser lo suficientemente largos como para hibridarse con especificidad de secuencia y para iniciar la síntesis, pero no tan largos como para que se reduzca la fidelidad durante la síntesis de oligonucleótidos). Típicamente, los cebadores oligonucleotídicos tienen de 8 a 50 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 o 50 nucleótidos de longitud).

Además de un conjunto de cebadores, los procedimientos usan una o más sondas para detectar la presencia o ausencia de virus de Zika. El término "sonda" se refiere a ácidos nucleicos (ADN o ARN) producidos sintéticamente o biológicamente, que por diseño o selección contienen secuencias de nucleótidos específicas que les permiten hibridarse en condiciones rigurosas predeterminadas definidas específicamente (es decir, preferentemente) con "ácidos nucleicos diana", en el presente caso con un ácido nucleico (diana) del virus de Zika. Una "sonda" se puede denominar "sonda de detección", lo que significa que detecta el ácido nucleico diana.

En algunos modos de realización, las sondas para el virus de Zika descritas se pueden marcar con al menos un marcador fluorescente. En un modo de realización, las sondas para el virus de Zika se pueden marcar con un resto fluorescente donante, por ejemplo, un tinte fluorescente, y un resto aceptador correspondiente, por ejemplo, un extintor. En un modo de realización, la sonda comprende o consiste en un resto fluorescente y las secuencias de ácido nucleico comprenden o consisten en SEQ ID NO:9-12.

El diseño de oligonucleótidos que se van a usar como sondas se puede realizar de manera similar al diseño de cebadores. Los modos de realización pueden usar una sonda única o un par de sondas para la detección del producto de amplificación. Dependiendo del modo de realización, el uso de la(s) sonda(s) puede comprender al menos un marcador y/o al menos un resto extintor. Como con los cebadores, las sondas normalmente tienen temperaturas de fusión similares, y la longitud de cada sonda debe ser suficiente para que se produzca la hibridación específica de secuencia, pero no tan larga como para que se reduzca la fidelidad durante la síntesis. Las sondas oligonucleotídicas tienen, en general, de 15 a 40 (por ejemplo, 16, 18, 20, 21, 22, 23, 24 o 25) nucleótidos de longitud.

Las construcciones pueden incluir vectores, que contienen cada uno una de moléculas de ácido nucleico de cebadores y sondas para el virus de Zika (por ejemplo, SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10). Se pueden usar construcciones, por ejemplo, como moléculas de ácido nucleico molde de control. Los vectores adecuados para su uso están disponibles comercialmente y/o se producen por procedimientos de tecnología de ácido nucleico recombinante rutinarios en la técnica. Se pueden obtener moléculas de ácido nucleico del virus de Zika, por ejemplo, por síntesis química, clonación directa a partir del virus de Zika o por amplificación de ácidos nucleicos.

Las construcciones adecuadas para su uso en los procedimientos típicamente incluyen, además de las moléculas de ácido nucleico del virus de Zika (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que contiene una o más secuencias de SEQ ID NO:1-12), secuencias que codifican un marcador seleccionable (por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos) para seleccionar construcciones y/o transformantes deseados, y un origen de replicación. La elección de los sistemas de vectores normalmente depende de varios factores, incluyendo, pero sin limitarse a, la elección de células huésped, eficacia de la replicación, selectividad, inducibilidad y la facilidad de recuperación.

Las construcciones que contienen moléculas de ácido nucleico del virus de Zika se pueden propagar en una célula huésped. Como se usa en el presente documento, el término célula huésped pretende incluir procariotas y eucariotas, tales como células de levadura, vegetales y de animal. Los huéspedes procariotas pueden incluir *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis*. Los huéspedes eucariotas incluyen levaduras, tales como *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Pichia pastoris*, células de mamíferos, tales como células COS o células de ovario de hámster chino (CHO), células de insectos y células vegetales, tales como *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum*. Se puede introducir una construcción en una célula huésped usando cualquiera de las técnicas conocidas comúnmente por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la precipitación con fosfato de calcio, electroporación, choque térmico, lipofección, microinyección y transferencia de ácido nucleico mediada por virus son procedimientos comunes para introducir ácidos nucleicos en células huésped. Además, se puede suministrar ADN no marcado directamente a las células (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.580.859 y 5.589.466).



**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Las patentes de EE. UU. n.º 4.683.20250, 4.683.195, 4.800.159 y 4.965.188 divulgan técnicas de PCR convencionales. La PCR típicamente emplea dos cebadores oligonucleotídicos que se unen a un molde de ácido nucleico seleccionado (por ejemplo, ADN o ARN). Los cebadores incluyen oligonucleótidos que pueden actuar como puntos de iniciación de la síntesis de ácido nucleico dentro de las secuencias de ácido nucleico del virus de Zika descritas (por ejemplo, las SEQ ID NO: 1-8). Un cebador se puede purificar a partir de un hidrolizado de restricción por procedimientos convencionales, o se puede producir sintéticamente. El cebador es preferentemente monocatenario para una máxima eficacia en la amplificación, pero el cebador puede ser bicatenario. En primer lugar, se desnaturalizan los cebadores bicatenarios, es decir, se tratan para separar las hebras. Un procedimiento de desnaturalización de ácidos nucleicos bicatenarios es por calentamiento.

Si el ácido nucleico molde es bicatenario, es necesario separar las dos hebras antes de que se pueda usar como molde en la PCR. La separación de las hebras se puede lograr por cualquier procedimiento de desnaturalización adecuado que incluya medios físicos, químicos o enzimáticos. Un procedimiento de separación de las hebras de ácido nucleico implica calentar el ácido nucleico hasta que esté predominantemente desnaturalizado (por ejemplo, más de un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % desnaturalizado). Las condiciones de calentamiento necesarias para desnaturalizar el ácido nucleico molde dependerán, por ejemplo, de la concentración de sal del tampón y la longitud y composición de nucleótidos de los ácidos nucleicos que se desnaturalizan, pero típicamente varían de aproximadamente 90 °C a aproximadamente 105 °C durante un tiempo dependiendo de rasgos característicos de la reacción, tales como la temperatura y la longitud del ácido nucleico. La desnaturalización típicamente se realiza durante de aproximadamente 30 s a 4 min (por ejemplo, de 1 min a 2 min 30 s, o 1,5 min).

Si el ácido nucleico molde bicatenario se desnaturaliza por calor, la mezcla de reacción se deja enfriar hasta una temperatura que promueva la hibridación de cada cebador con su secuencia diana. La temperatura para la hibridación es normalmente de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 65 °C (por ejemplo, de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 60 °C; de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 50 °C). Los tiempos de hibridación pueden ser de aproximadamente 10 s a aproximadamente 1 min (por ejemplo, de aproximadamente 20 s a aproximadamente 50 s; de aproximadamente 30 s a aproximadamente 40 s). A continuación, se ajusta la mezcla de reacción a una temperatura a la que se promueve u optimiza la actividad de la polimerasa, es decir, una temperatura suficiente para que se produzca la extensión a partir del cebador hibridado para generar productos complementarios al ácido nucleico molde. La temperatura debe ser suficiente para sintetizar un producto de extensión a partir de cada cebador que se hibrida con un molde de ácido nucleico, pero no debe ser tan alta como para desnaturalizar un producto de extensión a partir de su molde complementario (por ejemplo, la temperatura para la extensión varía, en general, de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 80 °C (por ejemplo, de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C; aproximadamente 60 °C). Los tiempos de extensión pueden ser de aproximadamente 10 s a aproximadamente 5 min (por ejemplo, de aproximadamente 30 s a aproximadamente 4 min; de aproximadamente 1 min a aproximadamente 3 min; de aproximadamente 1 min 30 s a aproximadamente 2 min).

El genoma de un retrovirus o virus de ARN, tal como el virus de Zika así como otros flavivirus, está compuesto de un ácido ribonucleico, es decir, ARN. En tal caso, el ácido nucleico molde, el ARN, se debe transcribir en primer lugar en ADN complementario (ADNc) por medio de la acción de la enzima retrotranscriptasa. Las retrotranscriptasas usan un molde de ARN y un cebador corto complementario al extremo 3' del ARN para dirigir la síntesis de la primera hebra de ADNc, que a continuación se puede usar directamente como molde para la reacción en cadena de la polimerasa.

Los ensayos de PCR pueden emplear ácido nucleico del virus de Zika, tal como ARN o ADN (ADNc). No se necesita purificar el ácido nucleico molde; puede ser una fracción menor de una mezcla compleja, tal como ácido nucleico del virus de Zika contenido en células humanas. Las moléculas de ácido nucleico del virus de Zika se pueden extraer de una muestra biológica por técnicas rutinarias, tales como las descritas en *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications* (Persing *et al.* (eds), 1993, American Society for Microbiology, Washington D.C.). Se pueden obtener ácidos nucleicos de una serie de fuentes, tales como plásmidos, o fuentes naturales, incluyendo bacterias, levaduras, virus, orgánulos u organismos superiores, tales como plantas o animales.

Los cebadores oligonucleotídicos (por ejemplo, las SEQ ID NO:1-8) se combinan con reactivos de PCR en condiciones de reacción que inducen la extensión del cebador. Por ejemplo, las reacciones de extensión de la cadena incluyen, en general, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), MgCl<sub>2</sub> 15 mM, gelatina al 0,001 % (p/v), 0,5-1,0 µg de ADN molde desnaturalizado, 50 pmoles de cada cebador oligonucleotídico, 2,5 U de polimerasa Taq y DMSO al 10 %. Las reacciones normalmente contienen de 150 a 320 µM de cada uno de dATP, dCTP, dTTP, dGTP o uno o más análogos de los mismos.

Las hebras recién sintetizadas forman una molécula bicatenaria que se puede usar en las etapas sucesivas de la reacción. Las etapas de separación de las hebras, hibridación y alargamiento se pueden repetir tan a menudo como se necesite para producir la cantidad deseada de productos de amplificación correspondientes a las moléculas de ácido nucleico diana del virus de Zika. Los factores limitantes en la reacción son las cantidades de cebadores, enzima termoestable y nucleósidos trifosfato presentes en la reacción. Las etapas de ciclado (es decir, desnaturalización, hibridación y extensión) se repiten preferentemente al menos una vez. Para su uso en la detección, el número de etapas de ciclado dependerá, por ejemplo, de la naturaleza de la muestra. Si la muestra es una mezcla compleja de ácidos nucleicos, se requerirán más etapas de ciclado para amplificar la secuencia diana lo suficiente para su detección. En general, las etapas de ciclado se repiten al menos aproximadamente 20 veces, pero se pueden repetir tantas como 40, 60 o incluso 100 veces.

#### Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET)

La tecnología de FRET (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 4.996.143, 5.565.322, 5.849.489 y 6.162.603) se basa en un concepto de que cuando un resto fluorescente donante y un resto fluorescente aceptador correspondiente se sitúan dentro de una determinada distancia entre sí, tiene lugar una transferencia de energía entre los dos restos fluorescentes que se puede visualizar o de otro modo detectar y/o cuantificar. El donante típicamente transfiere la energía al aceptador cuando se excita el donante por radiación de luz con una longitud de onda adecuada. El aceptador típicamente reemite la energía transferida en forma de radiación de luz con una longitud de onda diferente. En determinados sistemas, se puede transferir energía no fluorescente entre restos donantes y aceptadores, por medio de biomoléculas que incluyan restos donantes sustancialmente no fluorescentes (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 7.741.467).

En un ejemplo, una sonda oligonucleotídica puede contener un resto fluorescente donante (por ejemplo, HEX) y un extintor correspondiente (por ejemplo, BlackHole Quenchers™ (BHQ)), que puede ser fluorescente o no, y que disipa la energía transferida en una forma distinta de la luz. Cuando la sonda está intacta, la transferencia de energía típicamente se produce entre los restos donantes y aceptadores, de modo que la emisión fluorescente del resto fluorescente donante se extinga por el resto aceptador. Durante una etapa de extensión de una reacción en cadena de la polimerasa, se escinde una sonda unida a un producto de amplificación mediante la actividad nucleasa en dirección 5' a 3' de, por ejemplo, una polimerasa Taq de modo que la emisión fluorescente del resto fluorescente donante ya no se extingue. Se describen sondas ejemplares para este propósito, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 5.210.015, 5.994.056 y 6.171.785. Los pares donante-aceptador usados comúnmente incluyen el par FAM-TAMRA. Los extintores usados comúnmente son DABCYL y TAMRA. Los extintores oscuros usados comúnmente incluyen BlackHole Quenchers™ (BHQ), (Biosearch Technologies, Inc., Novato, Cal.), Iowa Black™, (Integrated DNA Tech., Inc., Coralville, Iowa), BlackBerry™ Quencher 650 (BBQ-650), (Berry & Assoc., Dexter, Mich.).

En otro ejemplo, dos sondas oligonucleotídicas, que contienen cada una un resto fluorescente, se pueden hibridar con un producto de amplificación en posiciones particulares determinadas por la complementariedad de las sondas oligonucleotídicas con la secuencia de ácido nucleico diana del virus de Zika. Tras la hibridación de las sondas oligonucleotídicas con el ácido nucleico del producto de amplificación en las posiciones apropiadas, se genera una señal de FRET. Las temperaturas de hibridación pueden variar de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 65 °C durante de aproximadamente 10 s a aproximadamente 1 min.

Se puede llevar a cabo el análisis fluorescente usando, por ejemplo, un sistema de microscopio epifluorescente de recuento de fotones (que contiene el espejo dicróico apropiado y filtros para supervisar la emisión fluorescente en el intervalo particular), un sistema fotomultiplicador de recuento de fotones o un fluorímetro. Se puede llevar a cabo la excitación para iniciar la transferencia de energía, o para permitir la detección directa de un fluoróforo, con un láser de iones de argón, una lámpara de arco de mercurio (Hg) de alta intensidad, una lámpara de xenón, una fuente de luz de fibra óptica u otra fuente de luz de alta intensidad filtrada apropiadamente para la excitación en el intervalo deseado.

Como se usa en el presente documento con respecto a los restos donantes y aceptadores correspondientes, "correspondiente" se refiere a un resto fluorescente aceptador o un extintor oscuro que tiene un espectro de absorbancia que se solapa con el espectro de emisión del resto fluorescente donante. El máximo de longitud de onda del espectro de emisión del resto fluorescente aceptador debe ser al menos 100 nm mayor que el máximo de longitud de onda del espectro de excitación del resto fluorescente donante. En consecuencia, se puede producir una transferencia de energía no radiativa eficaz entre los mismos.

Los restos donantes y aceptadores correspondientes fluorescentes se eligen, en general, para (a) la transferencia de energía de Foerster de alta eficacia; (b) un gran desplazamiento de Stokes final (>100 nm); (c) un desplazamiento de la emisión lo más lejos posible en la parte roja del espectro visible (>600 nm); y (d) un desplazamiento de la emisión a una mayor longitud de onda que la emisión fluorescente del agua de Raman producida por excitación a la longitud de onda de excitación del donante. Por ejemplo, se puede elegir un resto fluorescente donante que tenga su máximo de excitación cercano a una línea láser (por ejemplo, helio-cadmio 442 nm o argón 488 nm), un alto coeficiente de extinción, un alto rendimiento cuántico y un buen solapamiento

de su emisión fluorescente con el espectro de excitación del resto fluorescente aceptador correspondiente. Se puede elegir un resto fluorescente aceptador correspondiente que tenga un alto coeficiente de extinción, un alto rendimiento cuántico, un buen solapamiento de su excitación con la emisión del resto fluorescente donante y emisión en la parte roja del espectro visible (>600 nm).

Los restos fluorescentes donantes representativos que se pueden usar con diversos restos fluorescentes aceptadores en la tecnología de FRET incluyen fluoresceína, amarillo Lucifer, B-ficoeritrina, 9-acridinisotiocianato, amarillo Lucifer VS, ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico, 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina, 1-pirenbutirato de succinimidilo y derivados de ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico. Los restos fluorescentes aceptadores representativos que dependen del resto fluorescente donante usado, incluyen LC Red 640, LC Red 705, Cy5, Cy5.5, cloruro de sulfonil lisamina rodamina B, tetrametilrodamina-isotiocianato, rodamina x-isotiocianato, eritrosina-isotiocianato, fluoresceína, pentaacetato de dietilentiamina u otros quelatos de iones de lantánido (por ejemplo, europio o terbio). Se pueden obtener restos fluorescentes donantes y aceptadores, por ejemplo, de Molecular Probes (Junction City, Oreg.) o Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.).

Los restos fluorescentes donantes y aceptadores se pueden fijar al oligonucleótido de sonda apropiado por medio de un brazo conector. La longitud de cada brazo conector es importante, ya que los brazos conectores afectarán a la distancia entre los restos fluorescentes donantes y aceptadores. La longitud de un brazo conector puede ser la distancia en Angstroms (Å) desde la base nucleotídica al resto fluorescente. En general, un brazo conector es de aproximadamente 10 Å a aproximadamente 25 Å. El brazo conector puede ser de la clase descrita en el documento WO 84/03285. El documento WO 84/03285 también divulga procedimientos para fijar brazos conectores a una base nucleotídica particular, y también para fijar restos fluorescentes a un brazo conector.

Se puede combinar un resto fluorescente aceptador, tal como un LC Red 640, con un oligonucleótido que contenga un conector de amino (por ejemplo, C6-aminofosforamiditas disponibles de ABI (Foster City, Calif.) o Glen Research (Sterling, VA)) para producir, por ejemplo, un oligonucleótido marcado con LC Red 640. Los conectores usados con frecuencia para acoplar un resto fluorescente donante, tal como fluoresceína, a un oligonucleótido incluyen conectores de tiourea (derivados de FITC, por ejemplo, fluoresceína-CPG de Glen Research o ChemGene (Ashland, Mass.)), conectores de amida (derivados de éster de NHS de fluoresceína, tal como CX-fluoresceína-CPG de BioGenex (San Ramon, Calif.)) o 3'-amino-CPG que requieren el acoplamiento de un éster de NHS de fluoresceína después de la síntesis de los oligonucleótidos.

### **Detección del virus de Zika**

La presente divulgación proporciona procedimientos para detectar la presencia o ausencia de virus de Zika en una muestra biológica o no biológica. Los procedimientos proporcionados evitan problemas de contaminación de la muestra, negativos falsos y positivos falsos. Los procedimientos incluyen realizar al menos una etapa de ciclado que incluya amplificar una porción de las moléculas de ácido nucleico diana del virus de Zika de una muestra usando uno o más pares de cebadores para el virus de Zika y una etapa de detección de FRET. Se realizan múltiples etapas de ciclado, preferentemente en un termociclador. Se pueden realizar procedimientos usando los cebadores y sondas para el virus de Zika para detectar la presencia de virus de Zika, y la detección del virus de Zika indica la presencia de virus de Zika en la muestra.

Como se describe en el presente documento, los productos de amplificación se pueden detectar usando sondas de hibridación marcadas que aprovechan la tecnología de FRET. Un formato de FRET utiliza tecnología TaqMan® para detectar la presencia o ausencia de un producto de amplificación, y de ahí la presencia o ausencia de virus de Zika. La tecnología TaqMan® utiliza una sonda de hibridación monocatenaria marcada, por ejemplo, con un tinte fluorescente (por ejemplo, HEX) y un extintor (por ejemplo, BHQ), que puede ser fluorescente o no. Cuando se excita un primer resto fluorescente con luz de una longitud de onda adecuada, la energía absorbida se transfiere a un segundo resto fluorescente o un extintor oscuro de acuerdo con los principios de FRET. El segundo resto fluorescente, en general, es una molécula extintora. Durante la etapa de hibridación de la reacción de PCR, la sonda de hibridación marcada se une al ADN diana (es decir, el producto de amplificación) y se degrada mediante la actividad nucleasa en dirección 5' a 3' de, por ejemplo, la polimerasa Taq durante la fase de alargamiento posterior. Como resultado, el resto fluorescente y el resto extintor se separan espacialmente entre sí. Como consecuencia, tras la excitación del primer resto fluorescente en ausencia del extintor, se puede detectar la emisión de fluorescencia del primer resto fluorescente. A modo de ejemplo, un sistema de detección de secuencias ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) usa la tecnología TaqMan®, y es adecuado para realizar los procedimientos descritos en el presente documento para detectar la presencia o ausencia de virus de Zika en la muestra.

También se pueden usar balizas moleculares conjuntamente con FRET para detectar la presencia de un producto de amplificación usando los procedimientos de PCR ultrarrápida. La tecnología de balizas moleculares usa una sonda de hibridación marcada con un primer resto fluorescente y un segundo resto fluorescente. El segundo

resto fluorescente es, en general, un extintor, y los marcadores fluorescentes típicamente se localizan en cada extremo de la sonda. La tecnología de balizas moleculares usa un oligonucleótido de sonda que tiene secuencias que permiten la formación de estructuras secundarias (por ejemplo, una horquilla). Como resultado de la formación de estructuras secundarias dentro de la sonda, ambos restos fluorescentes están en proximidad espacial cuando la sonda está en solución. Después de la hibridación con los ácidos nucleicos diana (es decir, los productos de amplificación), la estructura secundaria de la sonda se altera y los restos fluorescentes se separan entre sí, de modo que, después de la excitación con luz de una longitud de onda adecuada, se pueda detectar la emisión del primer resto fluorescente.

Otro formato común de la tecnología de FRET utiliza dos sondas de hibridación. Cada sonda se puede marcar con un resto fluorescente diferente y, en general, se diseñan para hibridarse en estrecha proximidad entre sí en una molécula de ADN diana (por ejemplo, un producto de amplificación). Un resto fluorescente donante, por ejemplo, fluoresceína, se excita a 470 nm por la fuente de luz del instrumento LightCycler®. Durante la FRET, la fluoresceína transfiere su energía a un resto fluorescente aceptador, tal como LightCycler®-Red 640 (LC Red 640) o LightCycler®-Red 705 (LC Red 705). A continuación, el resto fluorescente aceptador emite luz de una longitud de onda más larga, que se detecta por el sistema de detección óptica del instrumento LightCycler®. La FRET eficaz solo puede tener lugar cuando los restos fluorescentes están en proximidad local directa y cuando el espectro de emisión del resto fluorescente donante se solapa con el espectro de absorción del resto fluorescente aceptador. La intensidad de la señal emitida se puede correlacionar con el número de moléculas de ADN diana originales (por ejemplo, el número de genomas de virus de Zika). Si se produce la amplificación del ácido nucleico diana del virus de Zika y se produce un producto de amplificación, la etapa de hibridación da como resultado una señal detectable basada en FRET entre los miembros del par de sondas.

En general, la presencia de FRET indica la presencia de virus de Zika en la muestra, y la ausencia de FRET indica la ausencia de virus de Zika en la muestra. Sin embargo, la inadecuada obtención de muestras, los retrasos por el transporte, las condiciones de transporte inapropiadas o el uso de determinados hisopados de obtención (varilla de alginato de calcio o de aluminio) son todas condiciones que pueden afectar al éxito y/o exactitud del resultado de una prueba.

Las muestras biológicas representativas que se pueden usar en la práctica de los procedimientos incluyen, pero no se limitan a, muestras respiratorias, orina, muestras fecales, muestras de sangre, plasma, hisopados dérmicos, hisopados nasales, hisopados en heridas, hemocultivos, piel e infecciones de partes blandas. Son conocidos procedimientos de obtención y almacenamiento de muestras biológicas para los expertos en la técnica. Las muestras biológicas se pueden procesar (por ejemplo, por procedimientos y/o kits de extracción de ácido nucleico conocidos en la técnica) para liberar el ácido nucleico del virus de Zika o, en algunos casos, la muestra biológica se puede poner en contacto directamente con los componentes de la reacción PCR y los oligonucleótidos apropiados.

El análisis de la curva de fusión es una etapa adicional que se puede incluir en un perfil de ciclado. El análisis de la curva de fusión se basa en el hecho de que el ADN se funde a una temperatura característica llamada temperatura de fusión ( $T_f$ ), que se define como la temperatura a la que la mitad de las dobles hebras de ADN se han separado en hebras únicas. La temperatura de fusión de un ADN depende principalmente de su composición de nucleótidos. Por tanto, las moléculas de ADN ricas en nucleótidos G y C tienen una mayor  $T_f$  que las que tienen una abundancia de nucleótidos A y T. Al detectar la temperatura a la que se pierde la señal, se puede determinar la temperatura de fusión de las sondas. De forma similar, al detectar la temperatura a la que se genera la señal, se puede determinar la temperatura de hibridación de las sondas. La(s) temperatura(s) de fusión de las sondas de los productos de amplificación del virus de Zika puede(n) confirmar la presencia o ausencia de virus de Zika en la muestra.

Dentro de cada tanda de termociclador, también se pueden ciclar muestras de control. Las muestras de control positiva pueden amplificar el molde de control de ácido nucleico diana (distinto de los productos de amplificación descritos de genes diana) usando, por ejemplo, cebadores de control y sondas de control. Las muestras de control positiva también pueden amplificar, por ejemplo, una construcción plasmídica que contenga las moléculas de ácido nucleico diana. Dicho control plasmídico se puede amplificar internamente (por ejemplo, dentro de la muestra) o en una tanda con muestra separada paralelamente con las muestras del paciente usando los mismos cebadores y sonda que los usados para la detección de la diana pretendida. Dichos controles son indicadores del éxito o fracaso de la amplificación, hibridación y/o reacción de FRET. Cada tanda de termociclador también puede incluir un control negativo que, por ejemplo, carezca de ADN molde diana. El control negativo puede medir la contaminación. Esto garantiza que el sistema y los reactivos no dan lugar a una señal positiva falsa. Por lo tanto, las reacciones de control pueden determinar fácilmente, por ejemplo, la capacidad de los cebadores de hibridarse con especificidad de secuencia y de iniciar el alargamiento, así como la capacidad de las sondas de hibridarse con especificidad de secuencia y para que se produzca la FRET.

En un modo de realización, los procedimientos incluyen etapas para evitar la contaminación. Por ejemplo, un procedimiento enzimático que utiliza uracil-ADN glucosilasa se describe en las patentes de EE. UU. n.º

5.035.996, 5.683.896 y 5.945.313 para reducir o eliminar la contaminación entre una tanda de termociclador y la siguiente.

Se pueden usar procedimientos de PCR convencionales conjuntamente con tecnología de FRET para poner en práctica los procedimientos. En un modo de realización, se usa un instrumento LightCycler®. Las siguientes solicitudes de patente describen la PCR ultrarrápida como se usa en la tecnología de LightCycler®: documentos WO 97/46707, WO 97/46714 y WO 97/46712.

El LightCycler® se puede hacer funcionar usando una estación de trabajo con PC y puede utilizar un sistema operativo Windows NT. Las señales de las muestras se obtienen a medida que la máquina sitúa los capilares secuencialmente sobre la unidad óptica. El programa informático puede presentar las señales de fluorescencia de forma ultrarrápida inmediatamente después de cada medición. El tiempo de adquisición fluorescente es de 10-100 milisegundos (ms). Después de cada etapa de ciclado, se puede actualizar continuamente una representación cuantitativa de la fluorescencia frente al número de ciclos para todas las muestras. Los datos generados se pueden almacenar para otro análisis.

Como alternativa a FRET, se puede detectar un producto de amplificación usando un tinte de unión a ADN bicatenario, tal como un tinte de unión a ADN fluorescente (por ejemplo, SYBR® Green o SYBR® Gold (Molecular Probes)). Tras la interacción con el ácido nucleico bicatenario, dichos tintes de unión a ADN fluorescentes emiten una señal de fluorescencia después de la excitación con luz a una longitud de onda adecuada. También se puede usar un tinte de unión a ADN bicatenario, tal como un tinte de intercalación de ácido nucleico. Cuando se usan tintes de unión a ADN bicatenario, normalmente se realiza un análisis de la curva de fusión para confirmar la presencia del producto de amplificación.

Un experto en la técnica apreciará que también se pueden emplear otros procedimientos de amplificación de señales o ácidos nucleicos. Los ejemplos de dichos procedimientos incluyen, sin limitación, amplificación de señales de ADN ramificado, amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP), amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), replicación de secuencias autosostenida (3SR), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), o procedimiento de amplificación inteligente versión 2 (SMAP 2).

Se entiende que los modos de realización de la presente divulgación no se limitan por la configuración de uno o más instrumentos disponibles comercialmente.

#### Artículos de fabricación/kits

Los modos de realización de la presente divulgación proporcionan además artículos de fabricación o kits para detectar virus de Zika. Un artículo de fabricación puede incluir cebadores y sondas usados para detectar la diana del gen del virus de Zika, conjuntamente con materiales de envasado adecuados. Los cebadores y sondas representativos para la detección del virus de Zika pueden hibridar con las moléculas de ácido nucleico diana del virus de Zika. Además, los kits también pueden incluir reactivos y materiales adecuadamente envasados necesarios para la inmovilización, hibridación y detección de ADN, tales como soportes sólidos, tampones, enzimas y patrones de ADN. En el presente documento se divulgan procedimientos de diseño de cebadores y sondas, y se proporcionan ejemplos representativos de cebadores y sondas que amplifican y se hibridan con las moléculas de ácido nucleico diana del virus de Zika.

Los artículos de fabricación también pueden incluir uno o más restos fluorescentes para marcar las sondas o, de forma alternativa, se pueden marcar las sondas suministradas con el kit. Por ejemplo, un artículo de fabricación puede incluir un resto fluorescente donante y/o uno aceptador para marcar las sondas para el virus de Zika. Anteriormente se proporcionan ejemplos de restos fluorescentes donantes y restos fluorescentes aceptadores correspondientes para FRET adecuados.

Los artículos de fabricación también pueden contener un prospecto del envase o ficha técnica del envase que tiene instrucciones en el mismo para usar los cebadores y sondas para el virus de Zika para detectar virus de Zika en una muestra. Los artículos de fabricación pueden incluir adicionalmente reactivos para llevar a cabo los procedimientos divulgados en el presente documento (por ejemplo, tampones, enzimas polimerasa, cofactores o agentes para prevenir la contaminación). Dichos reactivos pueden ser específicos para uno de los instrumentos disponibles comercialmente descritos en el presente documento.

En los siguientes ejemplos se describirán además modos de realización de la presente divulgación, que no limitan el alcance de la invención definida en las reivindicaciones.

## Ejemplos

Se proporcionan los siguientes ejemplos y figuras para ayudar al entendimiento de la materia objeto, exponiéndose su verdadero alcance en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que se pueden realizar modificaciones en los procedimientos expuestos sin apartarse del alcance de la invención.

La región seleccionada del genoma del virus de Zika incluía ambas regiones estructurales (por ejemplo, envoltura (E)), así como regiones no estructurales (por ejemplo, NS3, NS4B y NS5). Se alinearon todas las secuencias de ácido nucleico y se consideraron y puntuaron todos los cebadores y sondas según su inclusividad prevista para todas las cepas del virus de Zika conocidas y otras propiedades. Se crearon controles positivos considerando las secuencias de los virus en circulación. Se exportaron secuencias de bases de datos disponibles públicamente y se realizaron alineaciones de secuencias. A continuación, se filtraron las secuencias para considerar secuencias contemporáneas de 2007 en adelante. Se fabricó un clon de ADNc para que sirviera como control positivo de ADN o ARN. El clon de ADNc se basó en la cepa Surinam 2015 en relación con la cepa de referencia (linaje africano, Uganda) y una cepa africana histórica. Las secuencias se alinearon con respecto a los cebadores y sondas y se realizaron ligeros ajustes a las secuencias.

### Ejemplo 1: detección de virus de Zika cultivado

Se extrajo ARN del virus de Zika MR 766 cultivado usando QIAmp Viral RNA Mini Kit (Qiagen). Se cuantificó el ARN total usando RiboGreen Assay (ThermoFisher Scientific), Qubit (ThermoFisher Scientific) y NanoDrop (ThermoFisher Scientific).

Se realizó RT-PCR cuantitativa ultrarrápida utilizando cebadores y sondas que se dirigen a las regiones E, NS3 y NS5 en concentraciones variables de ARN de virus de Zika (es decir,  $2,5 \times 10^4$  y  $2,5 \times 10^6$  copias de ARN/ml). Los resultados muestran que los cebadores y las sondas pueden detectar las regiones E (SEQ ID NO:1, 5 y 9), NS3 (SEQ ID NO:3, 7 y 11) y NS5 (SEQ ID NO:2, 6, and 10) (véase la figura 1). Se realizaron estudios adicionales en un intervalo más amplio de concentraciones iniciales de ARN del virus de Zika (de  $2,5 \times 10^0$ ,  $2,5 \times 10^1$ ,  $2,5 \times 10^2$ ,  $2,5 \times 10^3$ ,  $2,5 \times 10^4$  y  $2,5 \times 10^5$  copias de ARN/ml), que mostraron que los cebadores y las sondas podrían detectar las regiones E y NS5 del virus de Zika de forma dependiente de la dosis (véase la figura 2). Ensayos adicionales que se dirigen a la región E, en presencia de un conjunto de cebadores/sondas de control de referencia interno, demuestran la capacidad de los cebadores y sondas para el virus de Zika para detectar el virus de Zika y multiplexarse con otros ensayos para la detección (véase la figura 3).

### Ejemplo 2: detección del virus de Zika en muestras biológicas

Para demostrar que los cebadores y sondas que detectan el virus de Zika podían detectar el virus de Zika a partir de muestras biológicas, por ejemplo, líquidos corporales, los cebadores y las sondas que se dirigen a las regiones E y NS5 del genoma del virus de Zika se sometieron a prueba frente a ARN del virus de Zika obtenido de muestras de plasma. Los resultados muestran que los cebadores y sondas para el virus de Zika podían detectar el virus de Zika en plasma con especificidad y sensibilidad. Este proceso completo se realizó varias veces y se demostró que los cebadores y sondas para el virus de Zika detectan de manera reproducible el virus de Zika (en la figura 4 se muestra un ejemplo representativo). Estos resultados demuestran que los cebadores y sondas para el virus de Zika detectan la presencia de virus de Zika en muestras biológicas, por ejemplo, plasma.

### Ejemplo 3: rendimiento del ensayo de una prueba de ácido nucleico del virus de Zika para cribado en sangre

La infección humana por el virus de Zika (ZIKV) se asocia con microcefalia y enfermedad neurológica. Dado que la mayoría de las infecciones son asintomáticas, los donantes de sangre pueden albergar la infección sin saberlo. Se detectó ácido nucleico del ZIKV en un 2,8 % de los donantes de sangre durante el brote en la Polinesia Francesa en 2013-2014, y recientemente se han notificado casos de transmisión por transfusión en Brasil. La FDA de EE. UU. emitió recomendaciones para reducir el riesgo de transmisión del ZIKV por transfusión. En áreas de transmisión activa, los establecimientos de sangre deben suspender las recogidas de sangre a menos que las donaciones se criben con una prueba de ácido nucleico (NAT) para ZIKV o los componentes se hayan sometido a una reducción de patógenos (PR). Actualmente, la PR se limita a plaquetas y productos plasmáticos.

En respuesta a las recomendaciones de la FDA, se desarrolló la prueba **cobas**<sup>®</sup> Zika, un procedimiento cualitativo para la detección del ARN del VZIK usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para su uso en los sistemas **cobas**<sup>®</sup> 6800/8800. Estos sistemas incorporan preparación, amplificación y detección de muestras totalmente automatizadas, y reactivos y controles listos para usar. La prueba está destinada a detectar el ARN del ZIKV en muestras de plasma de donantes de sangre total y hemoderivados, así como de otros donantes vivos.

La prueba **cobas**<sup>®</sup> Zika se diseñó para detectar todos los linajes de ZIKV. La mayoría de los estudios de rendimiento usaron sobrenadante de cultivo de ZIKV con títulos asignados en copias/ml usando transcrito de ARN de ZIKV. Los estudios incluyeron especificidad, sensibilidad, límite de detección (LdD), sustancias interferentes, equivalencia de matriz y reactividad cruzada. El LdD y la repetibilidad se evaluaron utilizando 190

réplicas en múltiples concentraciones, lotes de reactivos y días. La sensibilidad clínica se evaluó sometiendo a prueba 25 muestras confirmadas positivas para ZIKV usando secuencias de oligonucleótidos publicadas (Lanciotti, Emerg Infect Dis, 2008). Además, se añadieron 5 muestras clínicas a una mezcla de plasmas negativa para crear 250 muestras artificiales en varias diluciones.

El LdD por próbito al 95 % para **cobas**<sup>®</sup> Zika fue de 8,1 copias/ml y los resultados fueron reproducibles en múltiples parámetros. La especificidad fue del 100 % en 500 muestras recogidas en una región no endémica del ZIKV. Ni la detectabilidad ni la especificidad del ZIKV se vieron afectadas por sustancias potencialmente interferentes, incluyendo albúmina, bilirrubina, hemoglobina, ADN humano y triglicéridos, ni por diversos anticoagulantes. No hubo reacción cruzada con el VIH, el VHB, el VHC, el CHIKV, el DENV serotipos 1-4 y el WNV. La sensibilidad clínica de **cobas**<sup>®</sup> Zika fue del 100 % con 25 muestras positivas para ZIKV confirmadas de 4 países diferentes. La reactividad fue del 100 % con 250 muestras artificiales con un intervalo de concentraciones víricas.

#### Ejemplo 4: detección del virus de Zika en donantes de sangre puertorriqueños

La FDA de EE. UU. emitió recomendaciones para reducir el riesgo de transmisión del virus de Zika (ZIKV) por transfusiones, incluyendo la suspensión de las recogidas de sangre en áreas de transmisión activa del ZIKV, a menos que las donaciones se criben con una prueba de ácido nucleico (NAT) del ZIKV o se hayan sometido a una reducción de patógenos (PR). Se requirió que Puerto Rico suspendiera las recogidas, ya que no había ninguna prueba NAT aprobada por la FDA y la PR solo está disponible para productos de plasma y plaquetas. En respuesta a las recomendaciones de la FDA, se desarrolló un ensayo PCR NAT cualitativo para detectar el ARN del ZIKV en plasma de donantes de sangre total y hemoderivados.

Se desarrolló la prueba **cobas**<sup>®</sup> Zika para su uso en los sistemas **cobas**<sup>®</sup> 6800/8800 para detectar todos los linajes de ZIKV. El rendimiento se estableció con estudios que incluyeron especificidad, sensibilidad, límite de detección (LdD), posibles sustancias interferentes, equivalencia de matriz y reactividad cruzada. La FDA aprobó el uso de la prueba como nuevo medicamento en investigación (IND). A continuación, comenzaron a someterse a prueba muestras de donantes individuales de sangre (IDT) de Puerto Rico. Las donaciones de índice reactivo se volvieron a someter a prueba en minimezclas (MP) simuladas de 6. Un laboratorio de referencia también sometido a prueba las donaciones de índice reactivo usando un ensayo modificado por PCR para el ZIKV de los CDC, carga viral estimada (VL), anticuerpos IgM e IgG contra el ZIKV y una prueba de neutralización por reducción de placa (PRNT) para muestras reactivas a IgM. Se invitó a los donantes con resultados reactivos a que se inscribieran en un estudio de seguimiento.

Se han cribado 3573 donaciones mediante **cobas**<sup>®</sup> Zika, y 13 (0,36 %) resultaron reactivas.

Los resultados adicionales de 9 de estas donaciones se muestran en la tabla 4.

| Tabla 4. Resumen de los resultados de las pruebas en donaciones reactivas con <b>cobas</b> <sup>®</sup> Zika |                                |             |                |             |                |          |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-------------|----------------|-------------|----------------|----------|-----------|
| ID de muestra                                                                                                | <b>cobas</b> <sup>®</sup> ZIKA |             | CDC modificado |             | Serología      |          | PRNT      |
|                                                                                                              | IDT                            | MP simulada | PCR            | Media de VL | IgG            | IgM      |           |
| 1                                                                                                            | R                              | R           | Dudosa         | 4,20E+02    | Negativa       | Negativa | NP        |
| 2                                                                                                            | R                              | R           | Positiva       | 2,70E+03    | Positiva       | Positiva | Pendiente |
| 3                                                                                                            | R                              | R           | Positiva       | 5,90E+06    | Negativa       | Negativa | NP        |
| 4                                                                                                            | R                              | R           | Positiva       | 7,90E+03    | Negativa       | Negativa | NP        |
| 5                                                                                                            | R                              | R           | Positiva       | 5,40E+04    | Negativa       | Negativa | NP        |
| 6                                                                                                            | R                              | NR          | Positiva       | 3,20E+02    | No concluyente | Dudosa   | NP        |
| 7                                                                                                            | R                              | R           | Positiva       | 4,90E+05    | Negativa       | Negativa | NP        |
| 8                                                                                                            | R                              | R           | Positiva       | 7,10E+03    | Negativa       | Negativa | NP        |
| 9                                                                                                            | R                              | R           | Positiva       | 7,60E+04    | Dudosa         | Negativa | NP        |
| R, reactivo; NR, no reactivo; NP, no procede                                                                 |                                |             |                |             |                |          |           |

#### Ejemplo 5: ensayo alternativo para identificar ácido nucleico del virus de Zika en muestras

Se desarrolló la prueba **cobas**<sup>®</sup> Zika para su uso en los sistemas **cobas**<sup>®</sup> 6800/8800 para el cribado en sangre como nuevo fármaco en investigación (IND). Para establecer la sensibilidad de la prueba con el IND, la FDA requirió el análisis de muestras positivas para el virus de Zika (ZIKV). La adquisición de muestras positivas para ZIKV fue un desafío debido a la alta demanda, la escasez de muestras con ZIKV confirmado y las barreras para

el envío de muestras desde algunos países donde el virus de Zika es endémico. Se desarrolló un segundo ensayo por PCR del ZIKV como herramienta para cribar muestras con estado desconocido. Este segundo ensayo por PCR del ZIKV usa específicamente el **cobas omni** Utility Channel, que es ideal para la creación rápida de prototipos y el cribado ultrarrápido. El **cobas omni** Utility Channel utiliza la mayoría de los reactivos usado para las pruebas **cobas**® IVD, excepto los cebadores y sondas específicos del ensayo, lo que permite flexibilidad para realizar pruebas desarrolladas en laboratorio en la plataforma.

El segundo ensayo por PCR de ZIKR que se dirigió a un locus génico separado del locus génico objetivo al que se dirige la prueba **cobas**® Zika se desarrolló usando la funcionalidad **cobas omni** Utility Channel del sistema **cobas**® 6800/8800. Este ensayo se usó para identificar "posibles" muestras con ZIKV mediante el cribado de muestras recogidas en Colombia y El Salvador. Las muestras se obtuvieron originalmente de áreas endémicas de chikungunya y dengue y resultaron negativas para esos virus. Para el cribado, debido a los volúmenes limitados, las muestras se diluyeron a al menos 1:3,75 y se sometieron a prueba individualmente. Se usaron criterios de aceptación de Ct amplios para identificar "posibles" muestras positivas para ZIKV. Las muestras identificadas como ZIKV "posible" mediante este segundo ensayo se sometieron a prueba adicionalmente en 4 réplicas usando RT-PCR con secuencias de oligonucleótidos publicadas por los CDC (Lanciotti, 2008) y una vez mediante la prueba **cobas**® Zika. Se consideró que las muestras estaban confirmadas para ZIKV si se observaba una reactividad constante (4/4 réplicas) usando los oligonucleótidos de los CDC.

De 1296 muestras cribadas mediante el ensayo interno en el **cobas omni** Utility Channel, 111 se identificaron como "posibles" positivos para ZIKV. Se sometieron a prueba treinta y siete muestras con volumen suficiente usando los oligonucleótidos de los CDC y la prueba **cobas**® Zika. Se diluyeron 1:100 y se sometieron a prueba tres muestras adicionales con volumen limitado. De estos 40 "posibles" positivos, 23 muestras, incluyendo las 3 muestras diluidas, se confirmaron como positivas mediante los oligonucleótidos de los CDC y todas fueron reactivas con **cobas**® Zika. Diecisiete muestras tuvieron < 4/4 resultados reactivos con los oligonucleótidos de los CDC; 15/17 dieron positivo con la prueba **cobas**® Zika. Los resultados se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5** Detección por **cobas**® Zika en muestras con diferentes niveles de reactividad según los CDC

| Número de muestras individuales <i>N</i> = 40 | Número de réplicas positivas según los CDC por muestra | Interpretación de resultados de ZIKV con oligonucleótidos de los CDC | Número de muestras reactivas usando <b>cobas</b> ® Zika |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| 23                                            | 4 de 4 réplicas                                        | Confirmada                                                           | 23/23 reactivos                                         |
| 4                                             | 3 de 4 réplicas                                        | Dudosa                                                               | 4/4 reactivos                                           |
| 1                                             | 2 de 4 réplicas                                        | Dudosa                                                               | 1/1 reactivos                                           |
| 7                                             | 1 de 4 réplicas                                        | Dudosa                                                               | 6/7 reactivos                                           |
| 5                                             | 0 de 4 réplicas                                        | Negativa                                                             | 4/5 reactivos                                           |



## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección del virus de Zika en una muestra, comprendiendo el procedimiento:
  - 5 realizar una etapa de amplificación que comprende poner en contacto la muestra con un conjunto de cebadores oligonucleotídicos para producir un producto de amplificación si un ácido nucleico del virus de Zika está presente en la muestra;
  - 10 realizar una etapa de hibridación que comprende poner en contacto el producto de amplificación con una sonda oligonucleotídica detectable; y
  - 15 detectar la presencia o ausencia del producto de amplificación, en el que la presencia del producto de amplificación es indicativa de la presencia de virus de Zika en la muestra y en el que la ausencia del producto de amplificación es indicativa de la ausencia de virus de Zika en la muestra;
  - 20 en el que el conjunto de cebadores oligonucleotídicos se hibrida específicamente con la región de la envoltura (E) del ácido nucleico del virus de Zika para producir un producto de amplificación en la etapa de amplificación y comprende un primer cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:1 y un segundo cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:5; y
  - en el que la sonda oligonucleotídica detectable se hibrida específicamente con dicho producto de amplificación y comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:9.
- 25 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que:
  - la etapa de hibridación comprende poner en contacto el producto de amplificación con la sonda detectable que está marcada con un resto fluorescente donante y un resto aceptador correspondiente; y
  - 30 la etapa de detección comprende detectar la presencia o ausencia de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre el resto fluorescente donante y el resto aceptador de la sonda, en la que la presencia o ausencia de fluorescencia es indicativa de la presencia o ausencia de virus de Zika en la muestra.
- 35 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha etapa de amplificación emplea una enzima polimerasa que tiene actividad nucleasa en dirección 5' a 3'.
4. El procedimiento de la reivindicación 2 o 3, en el que el resto fluorescente donante y el resto aceptador correspondiente están separados dentro de no más de 8-20 nucleótidos entre sí en la sonda.
- 40 5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que el resto aceptador es un extintor.
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la muestra es una muestra biológica.
- 45 7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además un procedimiento de detección de un ácido nucleico de uno o más de otros virus, en paralelo.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que los uno o más de otros virus se seleccionan del grupo que consiste en virus del dengue, virus del chikungunya y virus del Nilo Occidental.
- 50 9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que los oligonucleótidos tienen 40 nucleótidos o menos.
10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además
  - 55 realizar la etapa de amplificación y la etapa de hibridación en presencia de uno o más conjuntos adicionales de cebadores oligonucleotídicos para producir uno o más productos de amplificación adicionales si un ácido nucleico del virus de Zika está presente en la muestra y una o más sondas oligonucleotídicas detectables adicionales,
  - 60 en el que la presencia de los uno o más productos de amplificación adicionales es indicativa de la presencia de virus de Zika en la muestra y en el que la ausencia de los uno o más productos de amplificación adicionales es indicativa de la ausencia de virus de Zika en la muestra y en el que
  - 65 un conjunto adicional de cebadores oligonucleotídicos se hibrida con la región no estructural NS5 del ácido nucleico del virus de Zika y comprende un primer cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:2 y un segundo cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de

oligonucleótidos de SEQ ID NO:6; y una sonda oligonucleotídica detectable adicional se hibrida específicamente con dicho producto de amplificación y comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:10; o/y

5 un conjunto adicional de cebadores oligonucleotídicos se hibrida con la región no estructural NS3 del ácido nucleico del virus de Zika y comprende un primer cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:3 y un segundo cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:7; y una sonda oligonucleotídica detectable adicional que comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:11.

10 11. Un kit para detectar un ácido nucleico del virus de Zika que comprende:

un conjunto de cebadores oligonucleotídicos que se hibrida específicamente con la región de la envoltura (E) del ácido nucleico del virus de Zika para producir un producto de amplificación que comprende un primer cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:1 y un segundo cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:5; y

15 una sonda oligonucleotídica detectable que se hibrida específicamente con dicho producto de amplificación que comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:9.

20 12. El kit de la reivindicación 11, en el que se marca la sonda oligonucleotídica detectable, comprendiendo dicho marcador un resto fluorescente donante y un resto aceptador correspondiente.

25 13. El kit de la reivindicación 11 o 12, que comprende además nucleósidos trifosfato, ácido nucleico polimerasa y tampones necesarios para la función de la ácido nucleico polimerasa.

14. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 que comprende además uno o más conjuntos adicionales de cebadores oligonucleotídicos y una o más sondas oligonucleotídicas adicionales, en el que

30 un conjunto adicional de cebadores oligonucleotídicos se hibrida con la región no estructural NS5 del ácido nucleico del virus de Zika y comprende un primer cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:2 y un segundo cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:6; y una sonda oligonucleotídica detectable adicional que comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:10; o/y

35 un conjunto adicional de cebadores oligonucleotídicos se hibrida con la región no estructural NS3 del ácido nucleico del virus de Zika y comprende un primer cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:3 y un segundo cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:7; y una sonda oligonucleotídica detectable adicional que comprende una secuencia de oligonucleótidos de SEQ ID NO:11.

40

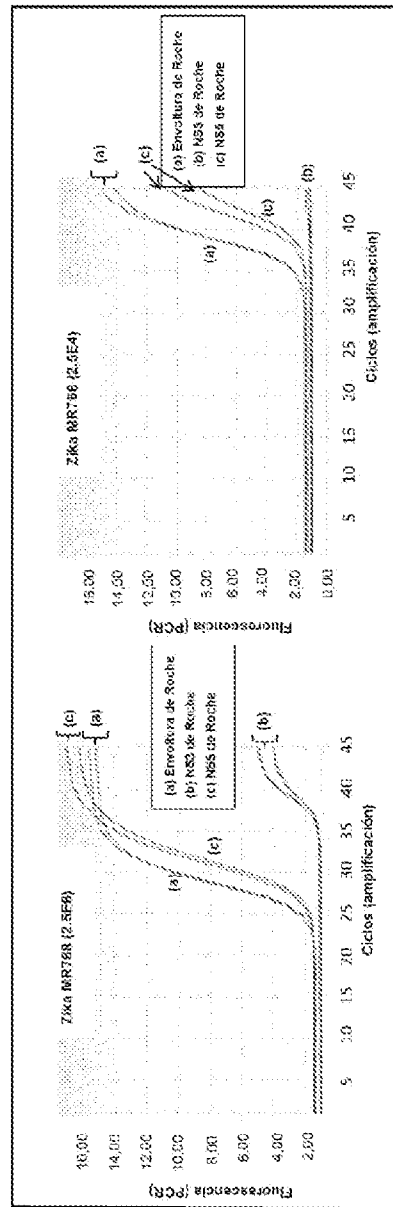


FIGURA 1

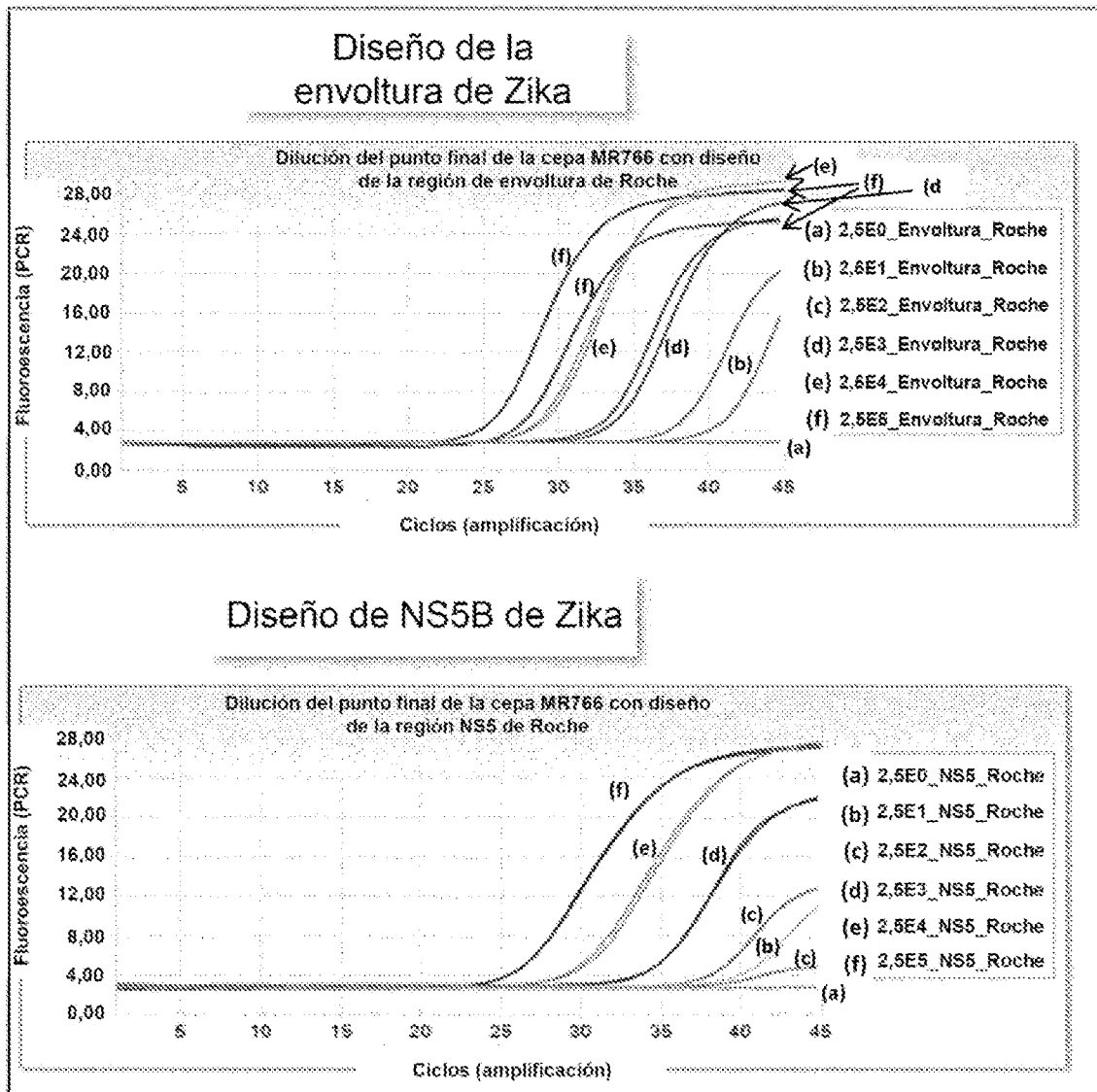


FIGURA 2

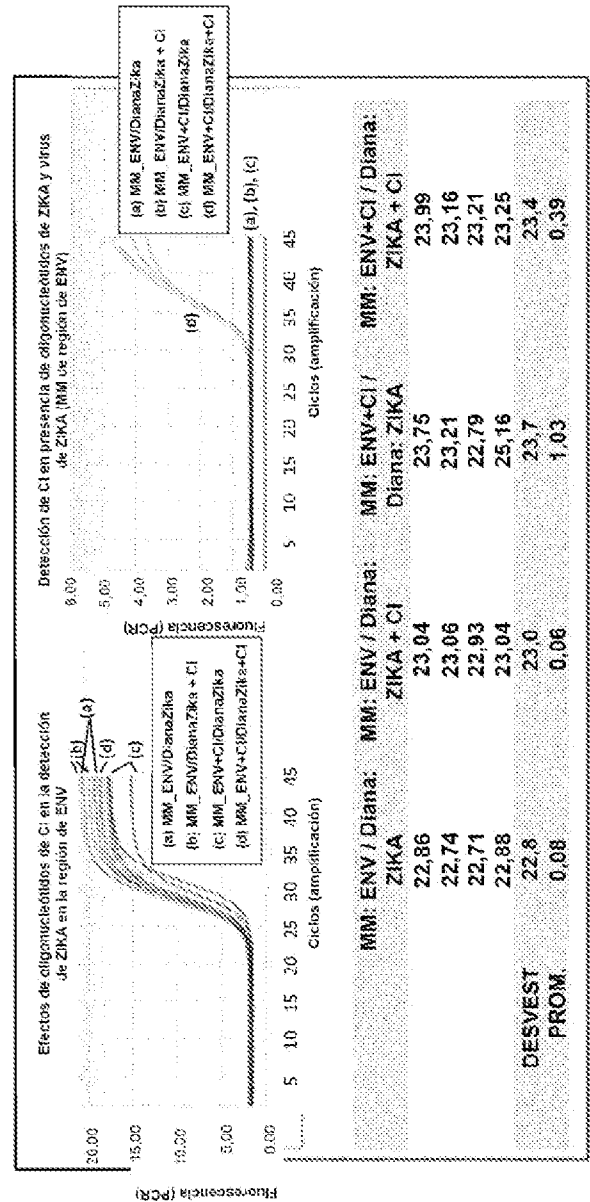


FIGURA 3

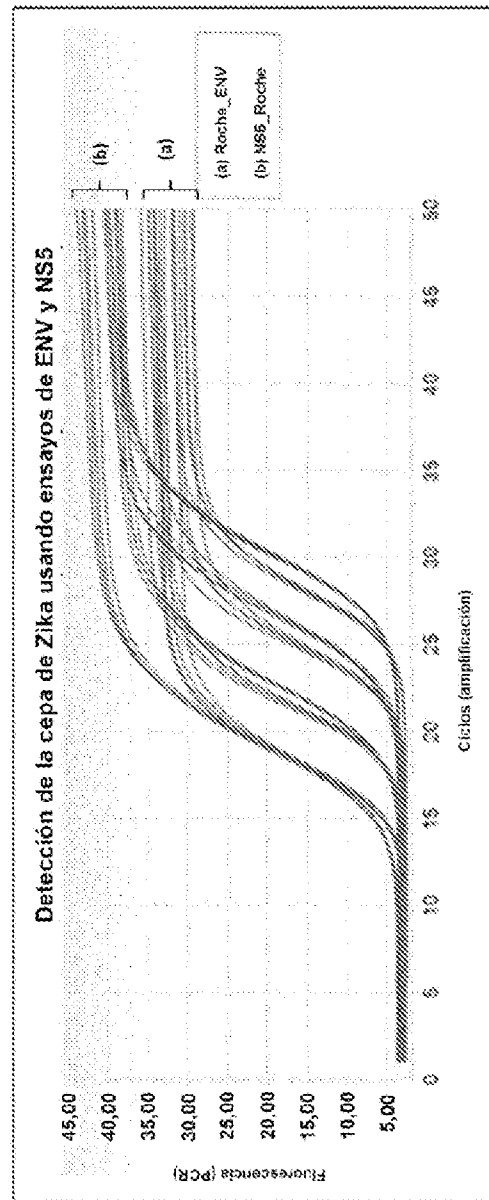


FIGURA 4