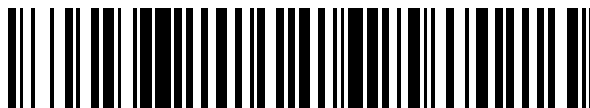


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 932 294**

21 Número de solicitud: 202130632

51 Int. Cl.:

C12Q 1/686 (2008.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

06.07.2021

43 Fecha de publicación de la solicitud:

17.01.2023

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE BURGOS (60.0%)

C/ Hospital del Rey s/n

09001 Burgos (Burgos) ES y

**GERENCIA REGIONAL DE SALUD DE CASTILLA
Y LEÓN (40.0%)**

72 Inventor/es:

RODRÍGUEZ LÁZARO, David;

SANTAMARÍA PALACIOS, Jorge;

CASADO MARTÍN, Lorena y

FERNÁNDEZ NATAL, Isabel

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE PARTÍCULAS VÍRICAS INFECTIVAS**

57 Resumen:

Método para la detección de partículas víricas infectivas.

La presente invención se refiere a un método in vitro para detectar partículas virales infectivas en una muestra que comprende añadir a la muestra no diluida un colorante de unión a ácidos nucleicos, y realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sobre el ácido nucleico extraído de la muestra empleando cebadores específicos para el ácido nucleico de la partícula viral, en donde si la PCR es positiva, entonces la muestra aislada contiene partículas virales infectivas. Asimismo, la presente invención también se refiere al uso de un kit para detectar partículas virales infectivas en una muestra y a un método para diagnosticar si un sujeto que padece una enfermedad vírica contiene partículas virales infectivas.

ES 2 932 294 A1

DESCRIPCIÓN

Método para la detección de partículas víricas infectivas

5 La presente invención se refiere a un método para detectar la presencia de partículas virales infectivas que comprende el pretratamiento de la muestra biológica no diluida con un colorante de unión a ácidos nucleicos previamente a la realización de una reacción en cadena de la polimerasa. Por lo tanto, la presente invención se engloba dentro del campo de la detección de agentes patógenos de relevancia clínica,
10 concretamente, en el campo del diagnóstico de laboratorio clínico.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La identificación de microorganismos patógenos se basa principalmente en su aislamiento o detección. En el caso de los virus, debido a que su aislamiento en cultivo
15 requiere tiempo prolongado y un alto nivel de bioseguridad, su diagnóstico se basa habitualmente en la detección de su ácido nucleico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), técnica de elección altamente sensible y específica, con capacidad de cuantificación, además de considerablemente robusta y fiable. Sin embargo, uno de sus principales inconvenientes es que únicamente detecta la presencia del genoma viral
20 por una amplificación específica de una región del mismo, expresado como umbral de ciclo—*Cicle threshold*— (C_T) -que hace referencia al número de ciclos en un ensayo de PCR necesario para amplificar el ácido nucleico viral para alcanzar un nivel detectable, pero no proporciona información sobre su capacidad infectiva. Este valor C_T dependerá del momento evolutivo de la enfermedad, de la celularidad de la muestra, y de la
25 plataforma de extracción y amplificación utilizada incluso cuando la secuencia diana (genes) de éstas sea la misma. Asimismo, se han descrito discrepancias entre la señal positiva de RT-qPCR obtenida, y la sintomatología observada, poniendo en cuestión si en esas fases finales, existe una correlación directa entre la señal de RT-qPCR, la eliminación del virus y su capacidad infectiva o riesgo de transmisión.

30 Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar una nueva metodología de diagnóstico de laboratorio clínico que permita superar los inconvenientes anteriormente señalados.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

35 La identificación de microorganismos patógenos se basa principalmente en su aislamiento o detección. En el caso de los virus, debido a que su aislamiento en cultivo

requiere tiempo prolongado y un alto nivel de bioseguridad, su diagnóstico se basa habitualmente en la detección de su ácido nucleico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (en cualquiera de sus variantes, como la RT-qPCR), técnica de elección altamente sensible y específica, con capacidad de cuantificación, además de
5 considerablemente robusta y fiable. Sin embargo, tal como se ha indicado en los antecedentes, esta técnica presenta inconvenientes.

Ahora bien, los inventores han descubierto que si se añade un colorante de unión a ácidos nucleicos a una muestra biológica sin diluir, previamente al aislamiento del ácido nucleico presente en dicha muestra, la posterior PCR permite averiguar si las posibles
10 partículas virales presentes en la muestra son infectivas o no, siendo dicho diagnóstico más eficaz, mejorando el límite de detección de la prueba y obteniendo un menor número de falsos negativos que si la muestra es diluida previamente al aislamiento del ácido nucleicos.

15

Así, la presente invención proporciona un método de diagnóstico

- que es compatible con los procesos de diagnosis clínica actuales, sin cambiar equipos ni reactivos, solo añadiendo algún paso intermedio; y
- que es especialmente útil en el diagnóstico de pacientes que (1) siguen dando
20 positivo de forma recurrente en pruebas de diagnóstico del virus (como el SARS-CoV2), semanas o meses después de haber sufrido y pasado los síntomas clínicos de la infección, y (2) dan positivo pero con un C_T elevado. La técnica de RT-qPCR expresa los resultados como C_T , que es el ciclo en el que la amplificación ha sido suficiente para ser detectada y supera un umbral mínimo definido. Básicamente, a mayor carga de ARN viral el resultado es un menor C_T ,
25 con lo que C_T con valores bajos son "más positivos" que C_T con valores altos. De hecho, a partir de un cierto valor de C_T (generalmente alrededor de 40) los resultados se consideran negativos aunque haya amplificación; y
- que presenta una mayor sensibilidad analítica, mejora el límite de detección de
30 la prueba y se obtienen menor número de falsos positivos que otras metodologías empleadas en el estado de la técnica.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una metodología que integra las bondades diagnósticas de la PCR con una capacidad de discriminación entre partículas
35 víricas infecciosas y no infecciosas, lo que puede ayudar tanto en la evaluación de la

prognosis de los pacientes con una infección vírica (como la COVID-19), como en la toma de decisiones sobre el momento adecuado para determinar si un paciente ha superado o no la infección por el virus.

- 5 Dicho lo anterior, en un aspecto la presente invención se relaciona con un método *in vitro* para detectar partículas virales infectivas en una muestra, de aquí en adelante “método de detección de la invención”, que comprende
- a) añadir a la muestra no diluida un colorante de unión a ácidos nucleicos;
 - b) extraer el ácido nucleico de la muestra resultante de llevar a cabo la etapa (a), y
 - 10 c) realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sobre el ácido nucleico extraído en la etapa (b) empleando cebadores específicos para el ácido nucleico de la partícula viral,
- en donde
- si la PCR es positiva, entonces la muestra contiene partículas virales infectivas,
 - 15 y si la PCR es negativa, entonces la muestra comprende partículas virales no infectivas; y
 - la muestra biológica no es una muestra de aguas residuales.

En la presente invención, la expresión “partícula viral” se refiere a aquella partícula que comprende al menos un ácido nucleico y una cubierta proteica, o cápside, dentro de la cual se encuentra el ácido nucleico. La partícula viral también recibe el nombre de partícula vírica o virión y ésta puede ser infectiva o no infectiva. En la presente invención se entiende que una partícula viral es infectiva cuando dicha partícula viral es capaz de infectar una célula huésped y utilizar la maquinaria celular para multiplicarse. Por

20 contrario, una partícula viral es no infectiva cuando no tiene dicha capacidad de infectar a una célula y/o multiplicarse usando la maquinaria celular.

El método de detección de la invención puede aplicarse a cualquier partícula viral, independientemente de la naturaleza de su ácido nucleico. Así, el ácido nucleico de las

30 partículas virales puede ser de:

- ADN bicatenario (por ejemplo, sin limitar a, adenovirus, herpesvirus y poxvirus)
- ADN monocatenario (por ejemplo, sin limitar a, parvovirus)
- ARN bicatenario (por ejemplo, sin limitar a, reovirus)
- ARN monocatenario positivo (por ejemplo, sin limitar a, coronavirus, picornavirus
- 35 y togavirus)

- ARN monocatenario negativo (por ejemplo, sin limitar a, ortomixovirus y rabdovirus)
- ARN monocatenario retrotranscrito, es decir, ARN con ADN intermedio en el ciclo de vida (por ejemplo, sin limitar a, retrovirus)
- 5 - ADN bicatenario retrotranscrito, es decir, ADN de virus con ARN intermedio en el ciclo de vida (por ejemplo, sin limitar a, Hepadnavirus).

No obstante, en una realización particular del método de detección de la invención la partícula viral comprende un ARN monocatenario. En otra realización más particular, la partícula viral es un coronavirus que, en otra realización todavía más particular, el coronavirus es MERS-CoV, SARS-CoV, SARS-CoV-2, 229E, NL63, 10 OC43 o HKU1.

El método de detección de la presente invención va dirigido a detectar partículas virales infectivas en una muestra. En la presente invención se entiende por “muestra” a una 15 parte o cantidad pequeña de una cosa que se considera representativa del total y que se toma o se separa de ella con ciertos métodos para someterla a estudio, análisis o experimentación. En la presente invención se puede emplear como muestra aquel material que sea susceptible de contener una partícula vírica y, en caso de haber partículas virales presentes, saber si éstas son infectivas o no. Así, en una realización 20 particular del método de detección de la presente invención, la muestra es una muestra biológica (o muestra clínica, una muestra alimentaria o una muestra ambiental, quedando excluida dentro de la muestra ambiental una muestra de agua residual.

El término “muestra biológica”, tal como se entiende en la presente invención, se refiere 25 a cualquier material biológico que se puede obtener del individuo, tal como una biopsia, un tejido, una célula o un fluido (suero, saliva, semen, esputo, lágrimas, moco, sudor, leche, extractos de cerebro y similares). El término “aislado/a” implica que la muestra biológica ha sido separada o extraída del resto de componentes que la acompañan de forma natural. Técnicas para obtener muestras biológicas de un individuo son 30 ampliamente conocidas en el estado de la técnica, y cualquiera de ellas puede emplearse en la puesta en práctica de la presente invención. Ejemplos de muestras biológicas que pueden emplearse en el método de detección de la invención incluyen, sin limitar a, una muestra de la mucosa nasofaríngea, una muestra de saliva, una muestra de sangre, una muestra de orina o una muestra de heces. No obstante, en una 35 realización más particular, la muestra es una muestra de mucosa nasofaríngea.

Dentro del concepto “muestras alimentarias” se incluyen todas aquellas muestras procedentes de un alimento destinado al consumo humano o animal. Ejemplos de muestras alimentarias incluyen, sin limitar a, una muestra cárnica, una muestra láctea,
5 una muestra de pescado, o una muestra vegetal.

En la presente invención también se contempla el empleo de muestras ambientales siempre y cuando ésta no sea una muestra de agua residual. Así, ejemplos que muestras ambientales distintas de aguas residuales incluyen, sin limitar a, una muestra
10 de suelo/tierra y una muestra de superficies sólidas (también llamado un frotis de superficie). Este tipo de muestra es de especial importancia pues permite averiguar si una superficie está contaminada con partículas virales infectivas, siendo en ese caso un foco de infección. Esto es de aplicación en hospitales (habitaciones, quirófanos, salas de espera, etc.), centros de manipulación de alimentos (bares, restaurantes, fábricas de
15 procesamiento de alimentos, etc.), centros públicos, etc.

La etapa a) del método de detección de la invención comprende añadir a la muestra no diluida un colorante de unión a ácidos nucleicos. Una característica técnica del presente método es que la muestra no tiene que ser diluida, es decir, una vez obtenida, la
20 concentración de sus componentes no tiene que ser rebajada mediante el empleo de un diluyente, por ejemplo, sin limitar a, tampón buffer. Como se ha explicado al principio de la presente descripción, la no dilución de la muestra permite que el método tenga una mayor sensibilidad analítica, una mejora en el límite de detección y se obtenga menor número de falsos positivos que otras metodologías empleadas en el estado de la
25 técnica.

Una vez obtenida la muestra, ésta es incubada con un colorante de unión específica a ácidos nucleicos, es decir, con un colorante que reconoce de forma específica el ADN o el ARN (en inglés son conocidos como *DNA/RNA Binding Dyes*) y se une a él
30 impidiendo su replicación. El empleo de estos colorantes y el tiempo de incubación necesario para que se una de forma específica a los ácidos nucleicos es ampliamente conocido por el experto en la materia en el campo técnico de la invención. Ejemplos de colorantes de unión específica a ácidos nucleicos incluyen, sin limitarse a, azul de metileno, yoduro de propidio, monoazida de etidio (EMA), monoazida de propidio (PMA)
35 y sus derivados como PMAxxTM, cloruro de platino (PtCl₄), y dicloruro de diamina platino

(CDDP). Cualquiera de ellos puede emplearse en el método de detección de la invención y están disponibles comercialmente. No obstante, en una realización particular, el colorante de unión a ácidos nucleicos se selecciona de la lista que consiste en monoazida de etidio (EMA), monoazida de propidio (PMA) y derivados, tales como PMAxx™ (Biotium Inc. California), cloruro de platino (PtCl₄), y dicloruro de diamina platino (CDDP).

Como sabe el experto en la materia, la cantidad de colorante a utilizar en la etapa (a) del método de detección de la invención depende del colorante utilizado. Determinar la cantidad de colorante a utilizar es práctica de rutina en el laboratorio para el experto en la materia a partir de la metodología existente en el estado de la técnica y las instrucciones de uso de las casas comerciales. No obstante, una realización particular del método de detección de la invención, la concentración del colorante de unión a ácidos nucleicos es entre 50 y 2.500 µM. En otra realización más particular, la concentración del colorante de unión a ácidos nucleicos es entre 100 y 1.500 µM, que en otra realización todavía más particular es entre 200 y 1.000 µM, e incluso más aún más particular, entre 300 y 500 µM.

Aunque el método de detección de la invención puede llevarse a cabo empleando cualquiera de las concentraciones anteriores del colorante de unión a ácidos nucleicos, los inventores han observado que cuando el colorante empleado es un derivado de PMA, tal como PMAxx™, la concentración óptima a la cual se alcanzan los mejores resultados es de entre 50 y 350 µM, más en particular, a 100, 200 y 300 µM, todavía más en particular, a 300 µM. Por otro lado, en caso de que el colorante empleado sea PtCl₄, la concentración óptima a la cual se alcanzan los mejores resultados es de entre 450 y 2.000 µM, más en particular, a 500, 1.000 y 1.500 µM, todavía más en particular, a 500 µM.

Una vez concluida la etapa (a), se obtiene una mezcla que, en caso de contener ácidos nucleicos libres en el medio, éstos estarán unidos al colorante añadido. Así, la siguiente etapa del método de detección de la invención [la etapa (b)] comprende extraer el ácido nucleico de la muestra resultante de llevar a cabo la etapa (a). Técnicas para extraer ácidos nucleicos a partir de una muestra son ampliamente conocidas en el estado de la técnica y cualquiera de ellas puede emplearse en el presente método. Asimismo, existen kits comerciales para la extracción tanto de ARN como de ADN. De cara a extraer el

ácido nucleico, la muestra se puede tratar para disgregar de forma física o mecánica las células, liberando los componentes intracelulares en una solución acuosa u orgánica para aislar y preparar los ácidos nucleicos. Como entiende el experto en la materia, dependiendo de si el ácido nucleico es ADN o ARN, el protocolo a emplear será
5 diferente.

Una vez aislado el ácido nucleico, se procede a realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sobre el ácido nucleico extraído empleando cebadores específicos para el ácido nucleico de la partícula viral cuya presencia se pretende detectar. En el
10 estado de la técnica existen múltiples variantes de la PCR y cualquiera de ellas puede emplearse en el contexto de la presente invención y la utilización de una u otra dependerá de si el ácido nucleico a amplificar es ADN o ARN. Así, ejemplos de variantes de la PCR incluyen, sin limitar a, PCR a Tiempo Real o PCR cuantitativa (qPCR del inglés *quantitative PCR*), PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR del inglés
15 Retrotranscriptase PCR), y PCR cuantitativa con transcriptasa inversa (RT-qPCR). No obstante, en una realización particular del método de detección de la invención, la PCR es la RT-PCR o RT-qPCR, pues es la PCR de elección para amplificar y detectar partículas virales de ARN como es el caso del SARS-CoV-2 agente causal de la Covid-19. Los cebadores y reactivos para llevar a cabo la PCR están disponibles en kits
20 comercialmente disponibles en el mercado. A partir de los mismos, la realización de una PCR y los parámetros a aplicar son práctica de rutina para el experto en la materia.

Tras la realización de la PCR, en función del resultado alcanzado, se puede concluir si la PCR es positiva (hay amplificación), entonces la muestra aislada contiene partículas
25 virales infectivas, y si la PCR es negativa (no hay amplificación), entonces la muestra aislada comprende partículas virales no infectivas. La razón que permite hacer esta discriminación entre partículas infectiva y no infectivas a partir del resultado de la PCR es por un lado, que el colorante añadido a la muestra en la etapa (a) es capaz de unirse al ácido nucleico libre en el medio, pero no al ácido nucleico presente dentro de las
30 partículas virales pues el colorante no puede atravesar la envuelta o cápside proteica del virus, y por otro lado que el ácido nucleico libre en el medio que tiene el colorante unido no puede ser amplificado por PCR, impidiendo que estos ácidos nucleicos sean detectados. Así, cuando en la etapa (b) del método de detección de la invención se procede al aislamiento del ácido nucleico de la muestra y su posterior detección por
35 PCR, sólo se amplificará aquel ácido nucleico que estaba en el interior de las partículas

virales intactas (y por lo tanto infectivas). Por lo tanto, una PCR positiva implica la amplificación del ácido nucleico del interior de las partículas víricas, por lo que se puede concluir que la muestra de partida comprende partículas víricas infectivas. Por el contrario, una PCR negativa implica que no ha habido amplificación, es decir, que el

5 ácido nucleico presente en la muestra de partida estaba libre en el medio (y no protegido dentro de la envuelta del virus), o que la envuelta del virus está dañada y el colorante ha podido acceder al interior de la partícula y unirse al ácido nucleico. En cualquier caso, ello implica que la partícula viral es no infectiva.

10 Como entiende el experto en la materia, la puesta en práctica del método de detección de la invención requiere el empleo de un kit que comprenda los elementos necesarios para llevarlo a cabo. Así, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso *in vitro* de un kit, de aquí en adelante “uso del kit de la invención”, que comprende

(i) un colorante de unión a ácidos nucleicos y

15 (ii) cebadores específicos para el ácido nucleico de la partícula viral,

en una RT-PCR para detectar partículas virales infectivas en una muestra no diluida, en donde la muestra no es una muestra de aguas residuales.

El kit para su uso según la presente invención puede contener, además, aquellos

20 reactivos útiles para la realización de la PCR, como son tampones y enzimas (polimerasa), así como materiales necesarios para la extracción del ácido nucleico de la muestra. Todos estos reactivos y materiales son ampliamente conocidos en el estado de la técnica.

25 Cualquiera de los colorantes de unión a ácidos nucleicos puede formar parte del kit. No obstante, en una realización particular del uso del kit de la invención, el colorante de unión a ácidos nucleicos se selecciona de la lista que consiste en monoazida de etidio (EMA), monoazida de propidio (PMA) y derivados, como PMAxx™, cloruro de platino (PtCl₄), y dicloruro de diamina platino (CDDP).

30

La concentración del colorante en el kit puede variar en un amplio rango de valores, tal como se ha explicada más arriba en párrafos anteriores. En una realización particular el uso del kit de la invención, la concentración del colorante de unión a ácidos nucleicos es entre 50 y 2.500 µM. En otra realización más particular, la concentración del colorante

35 de unión a ácidos nucleicos es entre 100 y 1.500 µM, que en otra realización todavía

más particular es entre 200 y 1.000 μM , e incluso más aún más particular, entre 300 y 500 μM .

5 No obstante, en una realización particular, las concentraciones óptimas del colorante de unión a ácidos nucleicos son las siguientes: cuando el colorante empleado es un derivado de PMA, tal como PMAxxTM, la concentración óptima a la cual se alcanzan los mejores resultados es de entre 50 y 350 μM , más en particular, a 100, 200 y 300 μM , todavía más en particular, a 300 μM . Por otro lado, en caso de que el colorante empleado sea PtCl_4 , la concentración óptima a la cual se alcanzan los mejores
10 resultados es de entre 450 y 2.500 μM , más en particular, a 500, 1.000 y 1.500 μM , todavía más en particular, a 500 μM .

El kit descrito en la presente descripción tiene su utilidad en una RT-PCR para detectar partículas virales infectivas en una muestra no diluida, en donde la muestra no es una
15 muestra de aguas residuales. Al igual que el método de detección de la invención, el uso del kit de la invención puede aplicarse para la detección de cualquier particular viral. El término particular viral ha sido definido en párrafos anteriores y es igualmente aplicable al presente aspecto inventivo. En una realización particular del uso el kit de la invención, la partícula viral comprende un ARN monocatenario. En otra realización más
20 particular, la partícula viral es un coronavirus que, en otra realización todavía más particular, el coronavirus es MERS-CoV, SARS-CoV, SARS-CoV-2, 229E, NL63, OC43 o HKU1.

En una realización particular del uso del kit de la presente invención, la muestra es una
25 muestra biológica (o muestra clínica), una muestra alimentaria o una muestra ambiental, quedando excluida dentro de la muestra ambiental una muestra de agua residual. El término “muestra” así como los tipos de muestra que pueden emplearse en la presente invención han sido definidos en párrafos anteriores. En una realización más particular, la muestra es una muestra de la mucosa nasofaríngea, una muestra de sangre, una
30 muestra de orina, una muestra de saliva o una muestra de heces.

Dentro del ámbito de la presente invención, también se contempla como otro aspecto inventivo un método *in vitro* para determinar y/o diagnosticar si un sujeto que sufre una infección vírica comprende partículas virales infectivas, de aquí en adelante “método de
35 diagnóstico de la invención”, que comprende

a) añadir a una muestra biológica aislada del sujeto no diluida un colorante de unión a ácidos nucleicos;

b) extraer el ácido nucleico de la muestra resultante de llevar a cabo la etapa (a), y

5 c) realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sobre el ácido nucleico extraído en la etapa (b) empleando cebadores específicos para el ácido nucleico de la partícula viral,

en donde si la PCR es positiva, entonces el sujeto comprende partículas virales infectivas, y si la PCR es negativa, entonces el sujeto comprende partículas virales no infectivas.

10

En la presente invención se entiende por "diagnóstico", "diagnosticar" o "diagnóstico clínico" al acto de determinar e identificar mediante el examen de los signos y los síntomas que presenta el paciente. Dentro del "diagnóstico clínico" se encuentra el "diagnóstico microbiológico". Se entiende por diagnóstico microbiológico a la detección
15 directa o indirecta de un microorganismo que corrobore o descarte su implicación en un cuadro clínico infeccioso derivándose de ello la actitud terapéutica y preventiva o de control. En la presente invención, la enfermedad a diagnosticar es una infección vírica que presente partículas virales infectivas con capacidad de causar enfermedad y/o transmitirse. Esto es de particular relevancia en el manejo y tratamiento del sujeto
20 analizado pues, dependiendo de si presenta partículas virales infectivas o no, el sujeto puede o no permanecer aislado/confinado para evitar contagios, o el sujeto puede recibir uno u otro tratamiento. El método de diagnóstico de la invención puede aplicarse a cualquier sujeto. En la presente invención, se entiende por "sujeto" a cualquier animal, lo que incluye, pero no se limita a, mamíferos (tales como animales domésticos, animales de granja, mascotas, etc.), preferiblemente primates, más preferiblemente
25 humanos, de cualquier raza, sexo o edad.

Como sabe el experto en la materia, existen muchas enfermedades víricas que pueden afectar a un sujeto. Ejemplos de enfermedades víricas incluyen, sin limitarse a,
30 enfermedades causadas por virus como herpesvirus, virus de la hepatitis A, B, C, E, o virus respiratorios (influenza, parainfluenza, rinovirus, enterovirus, adenovirus, bocavirus, virus respiratorio sincitial o metapneumovirus) en ocasiones en coinfección, etc., el "virus de la hepatitis de la marmota" (WHV), el "virus de la hepatitis de la ardilla de tierra" (GSHV), el "virus de la hepatitis de la ardilla de árbol" (TSHV) o el "virus de la
35 hepatitis del pato" (DHBV). No obstante, en una realización particular del método de

diagnóstico de la invención, la infección vírica es la COVID-19, síndrome respiratorio severo agudo (SARS), el síndrome respiratorio de oriente medio (MERS), o infecciones respiratorias por coronavirus en humanos como los coronavirus 229E, NL63, OC43 o HKU1.

5

La puesta en práctica del método de diagnóstico de la invención, comprende una primera etapa (a) dirigida a añadir a una muestra biológica aislada del sujeto no diluida un colorante de unión a ácidos nucleicos. Los términos “muestra biológica” y “colorante de unión a ácidos nucleicos” han sido definidos previamente en esta descripción y son aplicables al presente aspecto inventivo. Así, en una realización particular, la muestra la muestra biológica es una muestra de la mucosa nasofaríngea, una muestra de sangre, una muestra de orina, una muestra de saliva o una muestra de sangre. La metodología sobre como extraer de un sujeto los distintos tipos de muestras es ampliamente conocido en el estado de la técnica y práctica de rutina para el experto en la materia.

15

En otra realización particular, el colorante de unión a ácidos nucleicos se selecciona de la lista que consiste en monoazida de etidio (EMA), monoazida de propidio (PMA) y derivados, tales como PMAxxTM, cloruro de platino (PtCl₄), y dicloruro de diamina platino (CDDP).

20

Tal como se ha explicado en anteriores aspectos inventivos, la cantidad de colorante a utilizar en la etapa (a) del método de detección de la invención depende del colorante utilizado. Así, en una realización particular del método de diagnóstico de la invención, la concentración del colorante de unión a ácidos nucleicos es entre 50 y 2.000 µM. En otra realización más particular, la concentración del colorante de unión a ácidos nucleicos es entre 100 y 1.500 µM, que en otra realización todavía más particular es entre 200 y 1.000 µM, e incluso más aún más particular, entre 300 y 500 µM.

Aunque el método de diagnóstico de la invención puede llevarse a cabo empleando cualquiera de las concentraciones anteriores del colorante de unión a ácidos nucleicos, en otra realización todavía más particular, si el colorante empleado es un derivado de PMA, tal como PMAxxTM, la concentración óptima a la cual se alcanzan los mejores resultados es de entre 50 y 350 µM, más en particular, a 100, 200 y 300 µM, todavía más en particular, a 300 µM; o alternativamente, si el colorante empleado es PtCl₄, la concentración óptima a la cual se alcanzan los mejores resultados es de entre 450 y

35

2.500 μM , más en particular, a 500, 1.000 y 1.500 μM , todavía más en particular, a 500 μM .

Tras la finalización de la etapa (a) del método de diagnóstico de la invención, se procede a la etapa (b) que comprende aislar en ácido nucleico de la muestra que ha sido incubada con el colorante de unión a ácidos nucleicos y llevar a cabo una PCR empleando cebadores específicos para el ácido nucleico de la partícula viral. Todo la metodología y términos empleado en esta etapa (b) del método de diagnóstico de la invención ya han sido explicados y definidos para el método de detección de la invención y son igualmente aplicables al presente aspecto inventivo. Así, en una realización particular, la PCR es la reacción en cadena de la polimerasa con reverso transcripción (RT-PCR).

Finalmente, y en función de los resultados obtenidos tras la realización de la PCR, se puede concluir que si la PCR es positiva, entonces el sujeto comprende partículas virales infectivas, y si la PCR es negativa, entonces el sujeto comprende partículas virales no infectivas. Todo este proceso de conclusión ha sido explicado previamente en la presente descripción.

20 EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

25 METODOLOGÍA

Técnica 1 – Tratamiento con cloruro de platino (PtCl_4)

Las muestras procedentes de hisopo nasofaríngeo, que se encuentran diluidas en un buffer, son tratadas con cloruro de platino(IV), en un rango de concentración final (100nM – 50mM) en el volumen de la muestra de hisopo nasofaríngeo, tras lo cual la muestra se agita fuertemente en un vortex o similar, y se incuba durante un tiempo (de 0 a 60 minutos) en un agitador orbital, para que el cloruro de platino pueda llegar y unirse a las partículas de ARN que se encuentran libre en el medio (y que proceden de partículas víricas dañadas, por eso están libres, ya que si hay partículas víricas íntegras el cloruro de platino no es capaz de atravesar la envuelta del virus). De esta forma, el

cloruro de platino se une de forma covalente al ARN libre, pero no es capaz de unirse al ARN que está en las partículas víricas infectivas. En el paso posterior de extracción del ARN, el ARN procedente de partículas víricas íntegras es "sacado" de la "envuelta vírica" y liberado en el medio, donde se mezcla con el ARN que ya estaba libre, pero el

5 ARN que ya estaba libre está unido a partículas de cloruro de platino, hay ARN procedente de partículas víricas infecciosas, y procedente de partículas dañadas con cloruro de platino unido. Asimismo, durante la fase de extracción de ARN los restos de cloruro de platino libre en el medio son retirados, impidiendo que se unan posteriormente al ARN liberado durante esta fase. Esto permite que en la parte de detección mediante

10 RT-qPCR se detecte únicamente el ARN procedente de partículas víricas íntegras, ya que el ARN que tiene unido partículas de cloruro de platino inhibe la reacción de PCR, es decir, impide que la PCR amplifique y detecte los fragmentos de ARN que tienen unido cloruro de platino.

15 Técnica 2 - Tratamiento con PMAxx™ (Biotium Inc. California)

Las muestras procedentes de hisopo nasofaríngeo, que se encuentran diluidas en un buffer, son tratadas con PMAxx™ en un rango de concentración final (100nM – 50mM) en el volumen de la muestra de hisopo nasofaríngeo, tras lo cual la muestra se agita fuertemente en un vortex o similar, y se incuba durante un tiempo (de 0 a 20 minutos)

20 en un agitador orbital en oscuridad (la agitación es para poner en contacto las moléculas del colorante con el ARN libre de la muestra), y posteriormente necesita un tratamiento de fotoactivación de 0-30 minutos, en un dispositivo en el que se colocan las muestras y que emite luz a una longitud de onda determinada. La exposición a la luz hace que el PMAxx™ se una de forma covalente a las partículas de ARN que se encuentran libres

25 en el medio (y que proceden de partículas víricas dañadas, por eso están libres, ya que si hay partículas víricas íntegras el PMAxx™ no es capaz de atravesar la envuelta del virus). De esta forma, el PMAxx™ se une de forma covalente al ARN libre, pero no es capaz de unirse al ARN que está en las partículas víricas infectivas. En el paso posterior de extracción del ARN, el ARN procedente de partículas víricas íntegras es "sacado" de

30 la "envuelta vírica" y liberado en el medio, donde se mezcla con el ARN que ya estaba libre, pero el ARN que ya estaba libre está unido a partículas de PMAxx™. Asimismo, durante la fase de extracción de ARN los restos de PMAxx™ libre en el medio son retirados, impidiendo que se unan posteriormente al ARN liberado durante esta fase. Esto permite que en la parte de detección mediante RT-qPCR se detecte únicamente el

35 ARN procedente de partículas víricas íntegras, ya que el ARN que tiene unido partículas

de PMAxx™ inhibe la reacción de PCR, es decir, impide que la PCR amplifique y detecte los fragmentos de ARN que tienen unido PMAxx™.

RESULTADOS

5

Desarrollo del procedimiento diagnóstico exclusivo de partículas infecciosas de SARS-CoV-2.

El estudio de las condiciones del pretratamiento se realizó en dos fases diferenciadas. En una primera fase se empleó RNA extraído de muestras clínicas con una elevada carga viral (con C_T de RT-qPCR de en torno a 20) para comprobar las condiciones de concentración y tiempo de exposición/incubación más adecuadas; y una segunda fase en la que se empleó muestras clínicas reales con una elevada carga viral (con C_T de RT-qPCR de en torno a 20) para validar las condiciones óptimas obtenidas en la fase 1. En cada una de las fases se empleó una serie de replicados y muestras significativas (hasta 6 muestras clínicas por condición).

1ª FASE: Empleo de RNA de muestras clínicas.

En una primera instancia RNAs extraídos de muestras clínicas con una elevada carga viral (con C_T de RT-qPCR de en torno a 20) se dividieron en alícuotas iguales y mientras que una de las mismas se utilizó para la detección de SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR directamente, el resto de alícuotas se sometieron a un pretratamiento con 100 µM de PMAxx™ o PMA con una incubación en agitación de 10 minutos y una fotoactivación a diferentes tiempos: 15, 20 y 30 minutos. Se comprobó que no había diferencias significativas en el empleo de dichos tiempos por lo que seleccionó el tratamiento de fotactivación más corto; 15 minutos. Sin embargo, se observó que la reducción obtenida por PMA no era muy elevada, y se decidió sustituirlo por un colorante no fotoactivable que había demostrado previamente buenos resultados para la determinación de la integridad en otros coronavirus; el cloruro de platino (IV) – PtCl₄.

A continuación, se analizaron las concentraciones de los dos colorantes, PMAxx™ y PtCl₄. Para ello se emplearon concentraciones crecientes de ambos: 100, 200 y 300 µM y 500, 1.000 y 1.500 µM de PMAxx™ y PtCl₄, respectivamente. RNAs extraídos de muestras clínicas con una elevada carga viral (con C_T de RT-qPCR de en torno a 20) se dividieron en alícuotas iguales y mientras que una de las mismas se utilizó para la detección de SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR directamente, el resto de alícuotas se

sometieron a un pretratamiento con las concentraciones indicadas de PMAxx™ y PtCl₄, con una incubación en agitación de 10 minutos y una fotoactivación de 15 minutos para las muestras tratadas con PMAxx™ y con una incubación en agitación de 30 minutos en el caso de las muestras tratadas con PtCl₄. Los resultados están resumidos en la tabla 1.

Tabla 1: Capacidad de los pretratamientos con colorantes para determinar la viabilidad de SARS-CoV-2

| | PMAxx™ (μM) | | | | PtCl ₄ (μM) | |
|-------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|------------------------|--------------|
| | 100 | 200 | 300 | 500 | 1.000 | 1.500 |
| ΔC _T * | 9,22 ± 0,12 | 10,16 ± 0,16 | 12,06 ± 0,17 | 12,63 ± 0,36 | 12,16 ± 0,29 | 10,73 ± 0,17 |

*ΔC_T: Diferencia de valores de C_T entre la misma alícuota de RNA a la que se le ha aplicado directamente una extracción de RNA viral y una RT-qPCR para detectar SARS-CoV-2 y a la que se le ha sometido a un pretratamiento con colorantes previo a la extracción de RNA y a la RT-qPCR.

De los resultados obtenidos se seleccionaron las concentraciones de 300 y 500 μM para los pretratamientos con PMAxx™ y PtCl₄, respectivamente.

2ª FASE: Validación de las condiciones de pretratamiento mediante el empleo de muestras clínicas.

Las condiciones obtenidas en la prima fase se validaron en muestras clínicas reales. Para ello, se emplearon 6 muestras clínicas con alta carga viral (con CT de RT-qPCR de en torno a 20). Alícuotas idénticas se sometieron a los siguientes procesos:

1. Extracción de RNA viral directa y RT-qPCR para SARS-CoV-2
2. Pretratamiento de la muestra con 300 μM de PMAxx™ y extracción de RNA viral y RT-qPCR para SARS-CoV-2
3. Pretratamiento de la muestra con 500 μM de PtCl₄ y extracción de RNA viral y RT-qPCR para SARS-CoV-2
4. Inactivación del SARS-CoV-2 presente en la muestra a 90°C durante 30 minutos, pretratamiento de la muestra con 300 μM de PMAxx™ y extracción de RNA viral y RT-qPCR para SARS-CoV-2
5. Inactivación del SARS-CoV-2 presente en la muestra a 90°C durante 30 minutos, pretratamiento de la muestra con 500 μM de PtCl₄ y extracción de RNA viral y RT-

qPCR para SARS-CoV-2

En todos los procesos, la extracción de RNA viral se realizó con el kit Indimag (Indical Bioscience) y la RT-qPCR con el kit SARS-CoV-2 REALTIME PCR KIT de Vircell, siguiendo las indicaciones del fabricante. Los resultados se representan en la Tabla 2.

Tabla 2: Reducción de los valores de CT en muestras pretratadas por colorantes previamente inactivadas

| | PMAxxTM ¹ | Pt Cl ₄ ² | Inact + PMAxxTM ³ | Inact + Pt Cl ₄ ⁴ |
|----------------|----------------------|---------------------------------|------------------------------|---|
| ΔC_T^* | 1,00 ± 0,27 | 1,35 ± 0,58 | 10,29 ± 0,32 | 9,37 ± 0,77 |

* ΔC_T : Diferencia de valores de C_T entre la misma alícuota de muestra clínica a la que se le ha aplicado directamente una extracción de RNA viral y una RT-qPCR para detectar SARS-CoV-2 y a la que se le ha sometido a un pretratamiento con colorantes previo a la extracción de RNA y a la RT-qPCR.

¹ El pretratamiento de la muestra consistió en 300 μ M de PMAxxTM y extracción de RNA viral y RT-qPCR para SARS-CoV-2

² El pretratamiento de la muestra consistió en 500 μ M de PtCl₄ y extracción de RNA viral y RT-qPCR para SARS-CoV-2

³ Tratamiento de inactivación de la muestra a 90°C durante 30 minutos y el pretratamiento de la muestra consistió en 300 μ M de PMAxxTM y extracción de RNA viral y RT-qPCR para SARS-CoV-2

⁴ Tratamiento de inactivación de la muestra a 90°C durante 30 minutos y el pretratamiento de la muestra consistió en 500 μ M de PtCl₄ y extracción de RNA viral y RT-qPCR para SARS-CoV-2

Se observa que existe un ligero efecto sobre la muestra cuando se realizaron un pretratamiento con los colorantes a las condiciones optimizadas; valores de ΔC_T de 1,00 ± 0,27 y 1,35 ± 0,58 para el pretratamiento con PMAxxTM y PtCl₄, respectivamente. Por otro lado, se comprueba una reducción de los valores de C_T cuando las muestras fueron tratadas con un tratamiento severo de calor (90°C y 30 minutos) que garantizaba la inactivación de las partículas víricas de SARS-CoV-2; valores de ΔC_T de 10,29 ± 0,32 y 9,37 ± 0,77 para el pretratamiento con PMAxxTM y PtCl₄, respectivamente. Teniendo en

cuenta que un tratamiento por calor debe conseguir una reducción muy severa de la carga vírica y que los valores de ΔC_T fueron similares a los observados cuando se empleaba RNA desnudo, esos valores de en torno a 10 serían la máxima capacidad de discriminación que se podría observar. Por consiguiente, y teniendo en cuenta que la mayoría de los sistemas de RT-qPCR para SARS-CoV-2 usan 40 ciclos de RT-qPCR se puede considerar como umbral para la determinación de la integridad vírica de los viriones de SARs-CoV-2 ese valor de C_T de 30.

10 **Comparación de la eficacia de determinación de la integridad usando diferentes sistemas de extracción de ARN viral y detección de SARS- CoV-2.**

Las condiciones obtenidas en la prima fase se validaron en muestras clínicas reales empleando tres sistemas de detección: los sistemas automatizados integrados de extracción de ARN viral y detección de específica de SARS-CoV-2 por RTq-PCR Alinity^m de Abbott y Starlet-Allplex 2019-nCoV de Seegene, y un sistema de detección que combina la extracción de RNA viral con el kit Indimag de Indical y la RT-qPCR con el kit SARS-COV-2 REALTIME PCR KIT de Vircell (siguiendo las instrucciones del fabricante). Para ello, se emplearon 6 muestras clínicas con alta carga viral (con C_T de RT-qPCR de en torno a 20). Alícuotas idénticas se sometieron a los siguientes procesos:

1. Extracción de RNA viral directa y RT-qPCR para SARS-CoV-2
- 20 2. Inactivación del SARS-CoV-2 presente en la muestra a 90°C durante 30 minutos, pretratamiento de la muestra con 300 μ M de PMAxxTM y extracción de RNA viral y RT-qPCR para SARS-CoV-2
3. Inactivación del SARS-CoV-2 presente en la muestra a 90°C durante 30 minutos, pretratamiento de la muestra con 500 μ M de PtCl₄ y extracción de RNA viral y RT-qPCR para SARS-CoV-2
- 25

Los resultados se representan en la Tabla 3:

30 Tabla 3: Comparación de la determinación de la integridad empleando diferentes kits de extracción viral y RT-qPCR.

| | Alinity de Abbott | | Starlet | | Indimag+Vircell | |
|----------------|--|---|--|---|--|---|
| | Inact + PMAxx TM ¹ | Inact + Pt Cl ₄ ² | Inact + PMAxx TM ¹ | Inact + Pt Cl ₄ ² | Inact + PMAxx TM ¹ | Inact + Pt Cl ₄ ² |
| ΔC_T^* | 4,66± 0,72 | 5,42± 0,49 | 4,91± 0,55 | N/A | 11,69± 0,52 | 11,70± 0,42 |

* ΔC_T : Diferencia de valores de C_T entre la misma alícuota de muestra clínica a la que se

le ha aplicado directamente una extracción de RNA viral y una RT-qPCR para detectar SARS-CoV-2 y a la que se le ha sometido a un pretratamiento con colorantes previo a la extracción de RNA y a la RT-qPCR.

¹ Tratamiento de inactivación de la muestra a 90°C durante 30 minutos y el pretratamiento de la muestra consintió en 300 µM de PMAxxTM y extracción de RNA viral y RT-qPCR para SARS-CoV-2

² Tratamiento de inactivación de la muestra a 90°C durante 30 minutos y el pretratamiento de la muestra consintió en 500 µM de PtCl₄ y extracción de RNA viral y RT-qPCR para SARS-CoV-2

10

Los resultados obtenidos indican que esta estrategia de evaluación de evaluación de la integridad de los virones de SARS-CoV-2 funciona independientemente de los sistemas de detección empleado. Sin embargo, sí se ha observado una diferente eficacia dependiendo del sistema de detección empleado y colorante de integridad; así los valores varían desde una reducción de $4,66 \pm 0,72$ (sistema de detección Abbott y colorante de integridad PMAxxTM) hasta la inactivación total (sistema de detección STARLET y colorante Cloruro de Platino (IV)).

Evaluación en un panel de muestras clínicas

Las condiciones obtenidas para cada uno de los colorantes se evaluaron en un panel de muestras clínicas con resultados de RT-qPCR (C_T) dudosos, y que en la rutina de los laboratorios de los servicios de Microbiología hospitalarios requieren una revisión exhaustiva o una repetición de los mismos, y en general y dado la capacidad de discriminación obtenida en las condiciones optimizadas, muestras clínicas con resultados de RT-qPCR con valores de $C_T \geq 30$. Para ello, se realizaron alícuotas idénticas de cada una de las muestras del panel, y se realizó lo siguiente:

1. Extracción de ARN viral (mediante el kit Indimag de Indical) y detección de SARS-CoV-2 por RT-qPCR (kit SARS-COV-2 REALTIME PCR KIT de Vircell).
2. Adicción a la muestra de 300 µM de PMAxxTM, incubación de 10 minutos y fotoactivación en oscuridad durante 15 minutos, y extracción viral y detección como en el apartado 1.
3. Adicción a la muestra de 500 µM de PtCl₄, incubación de 30 minutos, y extracción viral y detección como indicado anteriormente (etapas 1 y 2).

35

En la tabla 4 se observan los resultados totales obtenidos de una manera cualitativa (integridad/infecciosidad o no de los viriones de SARS-CoV-2 presentes en las muestras). Los resultados obtenidos indican que el 60% de las muestras analizadas que previamente habían dado positivas a SARS-CoV-2 por RT-qPCR, hecho que se ha repetido en la extracción viral y detección SARS-CoV-2 por RT-qPCR, fueron negativas tras el tratamiento con alguno de los colorantes en las condiciones optimizadas. Esto quiere decir que el 60% de las muestras testadas portaban únicamente partículas víricas con su integridad afectada y por tanto sin capacidad infectiva. Es decir que, aunque los resultados de RT-qPCR iniciales, y repetidos de nuevo en el momento de realización de los tratamientos con los colorantes, indicaban que las muestras eran positivas por RT-qPCR, el ARN amplificado provenía de viriones no infectivos.

Tabla 4: Resultados generales de evaluación de la integridad de un panel de muestras clínicas previamente positivas a SARS-CoV-2 mediante de RT-qPCR, y con valores de $C_T \geq 30$.

| Interpretación | Resultado | Gene N (%) | Gene E (%) |
|----------------------------------|---|------------|------------|
| SARS-CoV-2 íntegro/infeccioso | RTqPCR directa + / pretratamiento y RT-qPCR + ^{*1} | 40 | 40 |
| SARS-CoV-2 no íntegro/infeccioso | RTqPCR directa + / con al menos un pretratamiento - ^{*2} | 60 | 60 |

^{*1} RTqPCR directa + / pretratamiento y RT-qPCR +^{*1}: indica que la RTq-PCR obtenida tras una extracción viral directa sin tratamiento con colorantes fue positiva, así como en la RTq-PCR tras un pretratamiento ^{*2} RTqPCR directa + / con al menos un pretratamiento-: indica que la RTq-PCR obtenida tras una extracción viral directa sin tratamiento con colorantes fue positiva, mientras que la RTq-PCR de al menos uno de los pretratamientos con colorantes antes de la extracción viral fue negativa.

Una vez obtenidos estos resultados, se analizó por separado y con detalle la eficacia de cada uno de los pretratamientos con colorantes, tal como puede verse en la tabla 5. Así se comprobó que en todos los casos (60% de las muestras del panel), la RT-qPCR tras el pretratamiento con PMAxxTM fue negativa, mientras que en tan sólo un 1/3 de las muestras con un resultado negativo los dos tratamientos con colorantes (PMAxxTM, y PtCl4) produjeron una señal de RT-qPCR negativa. De estos resultados se puede deducir que el tratamiento con el colorante fotoactivo PMAxxTM discriminó de una manera más significativa muestras clínicas con viriones de SARS-CoV-2 no íntegros

(hasta tres veces más 60% vs 20%). Por lo tanto, aunque la capacidad de discriminación de ambos colorantes se había comprobado similar en los ensayos de optimización, al analizar muestras clínicas reales se pudo comprobar que el pretratamiento con el colorante fotoactivo PMAxx™ fue más eficaz.

5

Tabla 5: Eficacia de cada uno de los pretratamientos con colorantes para determinar la integridad de un panel de muestras clínicas previamente positivas a SARS-CoV-2.

| Interpretación | Resultado | Gene N (%) | Gene E (%) |
|----------------------------------|--|------------|------------|
| SARS-CoV-2 no íntegro/infeccioso | Directa + / con al menos un pretratamiento - | 60 | 60 |
| | Directa + / Pt - / PMAxx - | 20 | 30 |
| | Directa + / Pt + / PMAxx - | 40 | 30 |

Estos resultados obtenidos tienen una gran relevancia clínica y plantea una serie de nuevas aproximaciones que pueden ayudar a la determinación de las prioridades asistenciales, particularmente en momento en los que recursos asistenciales en el ámbito hospitalario están sometidos a una elevada presión. En el panel de muestras ensayadas, elegidas de una manera aleatoria entre aquellas muestras que puede considerarse como dudosas o “complicadas” dentro de la rutina de análisis, un porcentaje significativo de las mismas (hasta el 60% en nuestro panel de muestras clínicas) no portaban virones de SARS-CoV-2 potencialmente infecciosos, con lo que podrían no representar un problema sanitario.

CONCLUSIONES

20

se han validado las condiciones de tratamiento previo a la RT-qPCR con colorantes fotoactivables (y uno no fotoactivable de más fácil aplicación) que permite verificar la integridad (infecciosidad) de los virones de SARS-CoV-2. La eficacia es tal que permite discernir entre la integridad/infecciosidad de resultados de RT-QPCR tan bajas como aquellas con C_T de 30, carga viral que el CDC ha considerado de difícil cultivo y que indica como de especial seguimiento. En este contexto resultados de RT-qPCR de virones no íntegros/infecciosos con valores de ≥ 30 , darían un resultado con el tratamiento con colorantes acoplado al RT-qPCR negativo, pudiendo de una manera robusta discernir si el paciente porta por tanto virus infecciosos o no. Las condiciones de tratamiento requieren un tratamiento muy sencillo de tan sólo 30 minutos, y han sido

30

validadas para los diferentes sistemas de extracción de RNA viral y detección específica de SARS-CoV-2 por RT-qPCR más ampliamente usado en los Laboratorios de Microbiología de los hospitales públicos de Castilla y León.

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para detectar partículas virales infectivas en una muestra que comprende
- 5 a) añadir a la muestra no diluida un colorante de unión a ácidos nucleicos;
- b) extraer el ácido nucleico de la muestra resultante de llevar a cabo la etapa (a), y
- c) realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sobre el ácido nucleico extraído en la etapa (b) empleando cebadores específicos para el ácido nucleico de la partícula viral,
- 10 en donde
- si la PCR es positiva, entonces la muestra aislada contiene partículas virales infectivas, y si la PCR es negativa, entonces la muestra aislada comprende partículas virales no infectivas; y
- la muestra no es una muestra de aguas residuales.
- 15
2. Método según la reivindicación 1, en donde la partícula viral es un coronavirus.
3. Método según la reivindicación 2, en donde el coronavirus es MERS-CoV, SARS-CoV, SARS-CoV-2, 229E, NL63, OC43 o HKU1..
- 20
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la muestra aislada es una muestra biológica, una muestra alimentaria o una muestra ambiental.
5. Método según la reivindicación 4, en donde la muestra biológica es una muestra de
- 25 la mucosa nasofaríngea, una muestra de sangre, una muestra de orina, una muestra de saliva o una muestra de heces.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el colorante de unión a ácidos nucleicos se selecciona de la lista que consiste en monoazida de etidio,
- 30 monoazida de propidio (PMA) y derivados, cloruro de platino (PtCl₄), y dicloruro de diamina platino (CDDP).
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la concentración del colorante de unión a ácidos nucleicos es entre 50 y 2.500 μ M.
- 35

8. Método según la reivindicación 7, en donde la concentración del colorante de unión a ácidos nucleicos es entre 100 y 1.500 μM .
9. Método según la reivindicación 8, en donde la concentración del colorante de unión a ácidos nucleicos es entre 200 y 1.000 μM .
10. Método según la reivindicación 8, en donde la concentración del colorante de unión a ácidos nucleicos es entre 300 y 500 μM .
11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la PCR es la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).
12. Uso *in vitro* de un kit que comprende
- (i) un colorante de unión a ácidos nucleicos y
- (ii) cebadores específicos para el ácido nucleico de la partícula viral,
- en una RT-PCR para detectar partículas virales infectivas en una muestra no diluida, en donde la muestra no es una muestra de aguas residuales.
13. Uso según la reivindicación 12, en donde el colorante de unión a ácidos nucleicos se selecciona de la lista que consiste en monoazida de etidio, monoazida de propidio y derivados, cloruro de platino (PtCl_4), y dicloruro de diamina platino (CDDP).
14. Uso según la reivindicación 12 o 13, en donde la concentración del colorante de unión a ácidos nucleicos es entre 50 y 2.500 μM .
15. Uso según la reivindicación 14, en donde la concentración del colorante de unión a ácidos nucleicos es entre 100 y 1.500 μM .
16. Uso según la reivindicación 15, en donde la concentración del colorante de unión a ácidos nucleicos es entre 200 y 1.000 μM .
17. Uso según la reivindicación 16, en donde la concentración del colorante de unión a ácidos nucleicos es entre 300 y 500 μM .
18. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, en donde la partícula viral

es un coronavirus.

19. Uso según la reivindicación 18, en donde el coronavirus es MERS-CoV, SARS-CoV, SARS-CoV-2, 229E, NL63, OC43 o HKU1.

5

20. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 19, en donde la muestra aislada es una muestra biológica, una muestra alimentaria o una muestra ambiental.

21. Uso según la reivindicación 20, en donde la muestra biológica es una muestra de la mucosa nasofaríngea, una muestra de sangre, una muestra de orina, una muestra de saliva o una muestra de sangre.

10

22. Método *in vitro* para determinar y/o diagnosticar si un sujeto que sufre una infección vírica comprende partículas virales infectivas, que comprende

15

a) añadir a una muestra biológica aislada del sujeto no diluida un colorante de unión a ácidos nucleicos;

b) extraer el ácido nucleico de la muestra resultante de llevar a cabo la etapa (a), y

c) realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sobre el ácido nucleico extraído en la etapa (b) empleando cebadores específicos para el ácido nucleico de

20

la partícula viral,

en donde

- si la PCR es positiva, entonces el sujeto comprende partículas virales infectivas, y si la PCR es negativa, entonces el sujeto comprende partículas virales no infectivas.

25

23. Método según la reivindicación 22, en donde la infección vírica es COVID-19, síndrome respiratorio severo agudo (SARS), síndrome respiratorio de oriente medio (MERS), e infecciones respiratorias por coronavirus en humanos.

30

24. Método según la reivindicación 22 o 23, en donde la muestra biológica es una muestra de la mucosa nasofaríngea, una muestra de sangre, una muestra de orina, una muestra de saliva o una muestra de sangre.

35

25. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, en donde el colorante de unión a ácidos nucleicos se selecciona de la lista que consiste en monoazida de

etidio, monoazida de propidio y sus derivados, cloruro de platino (PtCl₄), y dicloruro de diamina platino (CDDP).

26. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, en donde la
5 concentración del colorante de unión a ácidos nucleicos es entre 50 y 2.500 µM.

27. Método según la reivindicación 26, en donde la concentración del colorante de unión
a ácidos nucleicos es entre 100 y 1.500 µM.

10 28. Método según la reivindicación 27, en donde la concentración del colorante de unión
a ácidos nucleicos es entre 200 y 1.000 µM.

29. Método según la reivindicación 28, en donde la concentración del colorante de unión
a ácidos nucleicos es entre 300 y 500 µM.
15

30. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 29, en donde la PCR es
la reacción en cadena de la polimerasa con reverso transcripción (RT-PCR).



- ②① N.º solicitud: 202130632
②② Fecha de presentación de la solicitud: 06.07.2021
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| X | ENRIC CUEVAS-FERRANDO <i>et al.</i> medRxiv, 26/03/2021 [en línea][recuperado el 29/12/2021]. Recuperado de Internet <URL: https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.03.22.21253818v1 >, <DOI: https://doi.org/10.1101/2021.03.22.21253818 >. Página 3, líneas 86-108 | 1-30 |
| X | M. LEIFELS, D. CHENG, E. SOZZI <i>et al.</i> Water Research X, 9/12/2020, Vol. 100080 [en línea][recuperado el 29/12/2021]. Recuperado de Internet <URL: https://doi.org/10.1016/j.wroa.2020.100080 >. Abstract | 1-30 |
| A | KR 20160017277 A (UNIV CHUNG ANG IND <i>et al.</i>) 16/02/2016, Párrafo [0085] y Reivindicación 1 | 1-30 |
| A | CN 110894556 A (WUHAN INST VIROLOGY CAS) 20/03/2020, Abstract | 1-30 |
| A | RAWSTHORNE <i>et al.</i> APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 25/02/2009, Vol. 75, Nº 9, Páginas 2936-2939 [en línea][recuperado el 29/12/2021]. , <DOI: 10.1128/AEM.02524-08>. página 2936 | 1-30 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
29.12.2021

Examinador
C. González Valdespino

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q1/686 (2018.01)**C12N15/11** (2006.01)**C12Q1/70** (2006.01)

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

C12Q, C12N

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

EPODOC, INVENES, WPI, EBASE, MEDLINE, PUBMED, BIOSIS