

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 N.º de publicación: **ES 2 093 554**

21 Número de solicitud: 9500320

51 Int. Cl.⁶: C12Q 1/68

C12Q 1/70

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **17.02.95**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.12.96**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.12.96

71 Solicitante/s: **Instituto de Salud Carlos III
C/ Sinesio Delgado, 6
28029 Madrid, ES**

72 Inventor/es: **Casas Flecha, Inmaculada;
Tenorio Matanzo, Antonio;
Echevarría Mayo, José Manuel;
Klappler, Paul E. y
Cleator, Graham M.**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Procedimientos de amplificación de genoma y mezclas de oligonucleótidos iniciadores para la detección y la identificación de agentes infecciosos relacionados.**

57 Resumen:

Procedimientos de amplificación de genoma y mezclas de oligonucleótidos iniciadores para la detección y la identificación de agentes infecciosos relacionados.

Se utiliza para la reacción de detección una combinación de mezclas de oligonucleótidos iniciadores, estando cada una de dichas mezclas específicamente diseñada para una familia de agentes infecciosos con secuencias genómicamente relacionadas y obteniéndose como suma simple de oligonucleótidos homólogos en su extremo (3'). La reacción de amplificación puede realizarse igualmente con la inclusión de un control de amplificación interno. Los productos de la amplificación pueden discriminarse posteriormente por hibridación o por una segunda reacción de amplificación. Los procedimientos y mezclas de la invención son especialmente útiles para realizar el diagnóstico diferencial de agentes infecciosos que producen patologías similares, especialmente los virus herpes y enterovirus humanos.

ES 2 093 554 A1

DESCRIPCION

Procedimientos de amplificación de genoma y mezclas de oligonucleótidos iniciadores para la detección y la identificación de agentes infecciosos relacionados.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a nuevas mezclas de iniciadores de reacción y a nuevos procedimientos de amplificación genómica útiles para la detección e identificación específica de agentes infecciosos relacionados, especialmente de agentes infecciosos capaces de producir enfermedad neurológica y más especialmente para detección e identificación específica de virus herpes y enterovirus humanos.

Estado de la técnica

La detección y caracterización de los diferentes agentes infecciosos es uno de los objetivos de trabajo de un laboratorio de diagnóstico que con frecuencia tiene que plantearse la necesidad de establecer un diagnóstico diferencial, tal como sucede, entre otros, en el diagnóstico de infección neurológica aguda. Las infecciones neurológicas y más concretamente, las de origen vírico se producen, entre otros, por virus pertenecientes a dos Familias taxonómicamente no relacionadas: *Herpesviridae* y *Picornaviridae*. En primer lugar, los virus Herpes son agentes infecciosos que tras la primoinfección establecen latencia produciendo en determinadas condiciones recurrencias periódicas. Son virus envueltos cuyo genoma consiste en una molécula de ADN bicatenario. Fundamentalmente, la patología neurológica se asocia a recurrencias de los virus Herpes simplex tipo 1 (HSV1), Herpes simplex tipo 2 (HSV2) y Virus de la varicela zóster (VZV). Además, Citomegalovirus (CMV), Herpesvirus humano 6 (HHV6) y el Virus de Epstein-Barr (EBV) son posibles agentes directamente relacionados con determinados síndromes que conllevan una alteración neurológica. Meningitis aséptica, encefalitis, meningoencefalitis y polirradiculitis son las manifestaciones clínicas más comunes de las infecciones del sistema nervioso central asociadas a este grupo de virus. En segundo lugar, incluido dentro de la familia Picornaviridae se encuadra al grupo de los enterovirus, género conocido ya desde el siglo XIV a.C. por la producción de epidemias de poliomielitis. La infección por estos virus de pequeño tamaño no envueltos y cuyo genoma está constituido por una molécula de ARN monocatenaria de polaridad positiva, tiene mayor incidencia en los primeros años de vida y genera un amplio espectro de síndromes clínicos. En los países desarrollados son los agentes etiológicos más frecuentes de casos de meningitis aséptica, síndrome neurológico que en España se asocia con los enterovirus en un 90% del total de los casos dependiendo del año y de los brotes epidémicos producidos.

Tanto los enterovirus como los virus herpes son capaces de producir síndromes neurológicos tanto en pacientes inmunocompetentes como en inmunodeprimidos. La meningitis aséptica, por su elevada frecuencia, además de encefalitis y meningoencefalitis, por su peor evolución clínica, son motivo de diferentes estudios que tienen como fin el hallazgo de los virus implicados en su producción.

El control de las enfermedades neurológicas agudas puede realizarse mediante el establecimiento de un diagnóstico eficaz que permita el hallazgo y la identificación del agente etiológico asociado a un determinado cuadro neurológico. La detección e identificación de estos agentes infecciosos es una de las necesidades fundamentales de un laboratorio de diagnóstico microbiológico. En la actualidad, el diagnóstico de laboratorio se basa en el aislamiento de los diferentes virus en cultivos celulares. Esta técnica es lenta y además requiere un esfuerzo adicional para mantener líneas celulares distintas con el fin de abarcar el número mayor de serotipos de enterovirus, además de los diferentes virus herpes. Un resultado positivo en aislamiento puede ser establecido en un período de tiempo entre 4 y 15 días. Sin embargo, determinados enterovirus son incapaces de crecer en cultivos celulares lo que impide su detección en este tipo de sistemas de diagnóstico.

Con respecto a las técnicas serológicas, los sistemas indirectos de análisis de anticuerpos específicos producidos frente a un determinado virus herpes son de gran utilidad cuando se analizan muestras en donde el título de anticuerpos es elevado. Esta situación es diferente en aquellos casos de infección neurológica, en donde la muestra que se analiza es, principalmente, líquido cefalorraquídeo (LCR). En este tipo de muestras el título de anticuerpos específicos frente a un virus puede ser muy bajo y apenas detectable. Por otra parte los métodos indirectos de análisis de anticuerpos específicos frente a enterovirus no tienen un valor diagnóstico debido a su libre circulación como patógenos normales entre la población sana. Además, la gran diversidad antigénica de los enterovirus no permite desarrollar técnicas serológicas suficientemente sensibles y específicas para identificar todos sus tipos.

La introducción de técnicas de amplificación genómica (PCR) de agentes infecciosos víricos en muestras clínicas, ha supuesto uno de los mayores avances a la hora de detectar el agente etiológico de nu-

merosas enfermedades infecciosas y por ello a la hora de establecer un diagnóstico etiológico diferencial. Así, los procedimientos de amplificación genómica de herpesvirus y enterovirus en muestras clínicas están ampliamente documentados en la literatura. Concretamente en el proceso de amplificación de ARN es necesario llevar a cabo una primera fase inicial en la que se debe de producir una molécula de ADN complementario específico mediante un proceso de transcripción inversa. Particularmente, son importantes aquellos protocolos en los que se han diseñado conjuntamente la amplificación de diferentes virus en una única reacción (multiplex-PCR) como es el caso de los virus herpes (Patente Española P9201174). Virus pertenecientes a una misma familia y que están intrínsecamente relacionados entre sí, presentan un elevado grado de homología de determinadas zonas genómicas; por ejemplo, la región 5' no codificante, en el caso de los enterovirus y la región que codifica para el gen de la ADN polimerasa, en el caso de los virus Herpes. Estas zonas genómicas altamente conservadas, son motivo de estudios moleculares y en ellas se diseñan iniciadores comunes y específicos que serán utilizados en la técnica de PCR para poder detectar e identificar cada uno de los virus en un solo ensayo. La principal ventaja de este tipo de ensayos es el ahorro de muestra clínica y de tiempo para establecer un diagnóstico etiológico diferencial.

El uso de técnicas de amplificación múltiple no sólo permite detectar cualquier enterovirus o herpesvirus incluyendo los difícilmente cultivables, sino que permite en el caso de los virus herpes su identificación específica aunque estén presentes en cantidades tan pequeñas como en LCR. Hay que destacar, que una técnica de amplificación múltiple presenta también una serie de inconvenientes y problemas de difícil solución. Los problemas de inespecificidad, reproducibilidad y falta de sensibilidad son, entre otros, cuestiones que a priori, son necesarias considerar, sobre todo en el momento del diseño de los iniciadores específicos de cada uno de los virus a amplificar. Una vez diseñados los iniciadores, la fase de estandarización de la técnica de amplificación múltiple es esencial, y es en este período en donde se presentan los mayores problemas de incompatibilidad a todos los niveles. Interacciones entre los iniciadores específicos de los correspondientes virus a detectar y el genoma humano, molécula que presenta un elevado grado de complejidad, generan amplificaciones inespecíficas no deseables. Hay que tener en cuenta, que la molécula de ADN humano está presente en todo tipo de muestra clínica en donde se realiza la detección específica de los agentes víricos implicados en una determinada enfermedad infecciosa. Además, la presencia en una misma muestra de agentes radicalmente diferentes como los virus herpes y los enterovirus puede suponer un fallo del sistema en cuanto a la reproducibilidad de los resultados obtenidos. Otro factor a tener en cuenta es la fase inicial de transcripción inversa de las moléculas de ARN enterovírico ya que puede representar una pérdida de la disponibilidad de las moléculas de ADN de herpesvirus a ser amplificadas en la segunda fase de polimerización (PCR).

Otro de los problemas que se puede encontrar cuando se utiliza la técnica de PCR en el laboratorio de diagnóstico, se deben incluir una serie de controles específicos que excluyan los falsos negativos, debidos a la presencia de inhibidores de la reacción de amplificación. Así, es muy recomendable el desarrollo y uso de controles internos de amplificación en cada tubo de reacción.

La aplicación de la tecnología de PCR y las posibles combinaciones de iniciadores para poder amplificar secuencias genómicas de virus asociados con la producción de infección neurológica, cubriría una de las necesidades que se plantean en el diagnóstico de laboratorio.

Descripción de la invención

La presente invención tiene por objeto describir nuevas mezclas de iniciadores de reacción y nuevos procedimientos de amplificación genómica útiles para la detección e identificación específica de agentes infecciosos relacionados, especialmente de agentes infecciosos capaces de producir enfermedad neurológica y más especialmente para detección e identificación específica de herpesvirus y enterovirus humanos, virus sin ninguna homología significativa a nivel genómico.

Un aspecto de la invención es un procedimiento de amplificación de genoma para la detección de agentes infecciosos relacionados en una única mezcla de reacción, caracterizado por

1 Utilizar una combinación de mezclas de oligonucleótidos iniciadores, estando cada mezcla específicamente diseñada para una familia de agentes infecciosos con secuencias genómicamente relacionadas y caracterizada a su vez por:

- i) obtenerse como suma simple de oligonucleótidos,
- ii) por incluir, cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla, preferentemente en su extremo 3', secuencias homólogas seleccionadas de entre las secuencias relacionadas que se quieren amplificar,

iii) por poder incluir además, cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla, preferentemente en su extremo 5', secuencias no homólogas seleccionadas de entre las secuencias relacionadas que se quieren amplificar, y

5 iv) porque uno o más de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla pueden diferenciarse de las secuencias conocidas que se quieren amplificar en al menos un nucleótido, y

2 porque todas las mezclas diseñadas según las características anteriores se combinan en una única mezcla que será utilizada para la reacción de amplificación genómica.

10 Otro aspecto de la invención son mezclas como las descritas para el procedimiento anterior.

El uso de los procedimientos y mezclas anteriormente descritos suma, a las ventajas logradas por el uso individual de las mezclas descritas y que esencialmente son una mejora en la especificidad y sensibilidad de reacción, la ventaja añadida de poder detectar, en un única reacción de amplificación, agentes infecciosos que producen patologías similares pero que no están genómicamente relacionados entre sí, tal como sucede con los virus pertenecientes a las familias *Herpesviridae* y *Picornaviridae*. Para cada una de las familias, la mejora en la sensibilidad se logra disminuyendo al máximo el grado de degeneración de los iniciadores, diseñados sobre una zona con secuencias relativamente conservadas entre los diferentes miembros de la familia. La mejora en la especificidad se logra aumentando, si fuera necesario, la longitud de los iniciadores y extendiéndolos en su extremo 5' hacia zonas no conservadas entre los diferentes miembros de la familia y logrando así una longitud de iniciador suficiente como para evitar la hibridación inespecífica con secuencias similares que puedan estar presentes en genomas con elevada complejidad, como el humano.

25 Las mezclas y procedimientos anteriormente descritos son útiles para la detección de agentes infecciosos que producen patologías similares pero que no están genómicamente relacionadas entre sí, especialmente los que producen patología en humanos, como son los pertenecientes a las familias *Herpesviridae* y *Picornaviridae*.

30 Otro aspecto de la invención es un procedimiento de detección e identificación de secuencias genómicas relacionadas, caracterizado por

i) hacerse una primera reacción de amplificación de genoma en la que el menos uno de los iniciadores utilizados es en una mezcla como la utilizada en el primer procedimiento descrito.

35 ii) tomando como substrato el producto de la primera reacción, realizar la identificación específica mediante hibridación con oligonucleótidos específicos de cada una de las especies que se quiere edentificar.

40 Este procedimiento permite realizar tanto la detección como la identificación de agentes infecciosos relacionados en dos reacciones consecutivas, la primera de amplificación genómica y la segunda de hibridación específica, posibilitando así tanto la detección como la identificación de agentes infecciosos relacionados.

45 Otro aspecto de la invención es un procedimiento de amplificación de genoma para la detección y la identificación de agentes infecciosos relacionados en una única mezcla de reacción, caracterizado porque al menos uno de los iniciadores utilizados es una mezcla caracterizada

i) por obtenerse como suma simple de oligonucleótidos,

50 ii) por incluir, cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla, preferentemente en su extremo 3', secuencias específicas de cada una de las secuencias que se quieren tipificar en la reacción de amplificación.

iii) por estar diseñada de manera que los fragmentos específicos amplificados son diferentes entre sí por tamaño o por diferente marcaje físico o químico de cada uno de los oligonucleótidos componentes de la mezcla, y

55 iv) porque uno o más de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla pueden diferenciarse de las secuencias conocidas que se quieren amplificar en al menos un nucleótido.

60 Otro aspecto de la invención son mezclas como las descritas para el procedimiento anterior.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento de detección e identificación de secuencias genómicas relacionadas, caracterizado por

i) hacerse una primera reacción de amplificación de genoma en la que al menos uno de los iniciadores utilizados es en una mezcla como la utilizada en el primer procedimiento descrito y

ii) tomando como sustrato el producto de la primera reacción, realizar una segunda reacción de amplificación en la que se utiliza una mezcla como la descrita en el procedimiento anterior.

Este procedimiento permite igualmente realizar tanto la detección como la identificación de agentes infecciosos relacionados, en dos reacciones consecutivas.

Además, según la invención, la mezcla compleja de iniciadores utilizada en la segunda reacción no produce las amplificaciones inespecíficas debidas a su uso en presencia de un genoma complejo. Esto se logra utilizando como sustrato de la segunda reacción el producto de reacción obtenido en la primera reacción de amplificación.

Las mezclas y los procedimientos anteriormente descritos son especialmente útiles para la detección y la identificación específica de diferentes agentes infecciosos relacionados por producir patología similar, especialmente en el hombre.

Otro aspecto de la invención es la inclusión de un control interno de amplificación en los procedimientos y mezclas anteriores que se utilizan para la detección e identificación de agentes infecciosos relacionados. Así, según la invención, los procedimientos y mezclas anteriores pueden incluir en la propia mezcla de reacción cantidades concretas de un genoma que no cabe esperar en una muestra clínica, además de los iniciadores de reacción u otros reactivos específicos que permitan su detección si la reacción de amplificación se ha desarrollado en ausencia de inhibidores. La inclusión del control interno de amplificación permitirá detectar las muestras que contienen inhibidores de la amplificación, identificando así fácilmente los resultados falsos negativos.

Un último aspecto de la invención son mezclas de oligonucleótidos diseñadas para ser utilizadas como iniciadores de la reacción de amplificación, caracterizadas porque al menos uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla se diferencia de las secuencias conocidas que se quieren amplificar en al menos un nucleótido.

La alteración de la secuencia según la invención, tiene como principal objetivo lograr que las mezclas complejas de iniciadores sean compatibles entre sí; es decir, que no se produzcan hibridaciones entre los diferentes componentes de las mezclas de oligonucleótidos presentes en la mezcla de reacción de amplificación. Las hibridaciones entre oligonucleótidos frecuentes en mezclas complejas, producen durante la reacción de amplificación secuestro del reactivo necesario y, frecuentemente la formación de dímeros de iniciadores.

Una realización de la invención es la aplicación de las mezclas y procedimientos anteriormente descritos para la detección e identificación de agentes infecciosos relacionados por ser capaces de producir patología similar, especialmente aquéllas capaces de producir patología similar en el hombre, más especialmente aquéllos capaces de producir enfermedad neurológica en el hombre, concretamente los pertenecientes a las familias *Herpesviridae* y *Picornaviridae*.

Los siguientes ejemplos y figuras ilustran, pero no limitan, algunos de los modos de llevar a cabo la invención.

Descripción de las figuras

Figura 1

Alineamiento de las secuencias de nucleótidos correspondientes a los fragmentos 5' no codificantes (5'NCR) de los enterovirus de secuencia conocida. Los nombres de los virus y su procedencia se describe a continuación, así como el código de reconocimiento de secuencia en la base de datos de donde se han obtenido (GenBank), entre corchetes, y su identificación en la figura, entre paréntesis. Poliovirus tipo 1, cepa Mahoney [POL1] (POL1A); Poliovirus tipo 1, cepa Mahoney versión A [POLIO1A] (POL1B); Poliovirus tipo 1, cepa Mahoney versión B [POLIO1B] (POL1C); Poliovirus tipo 1, cepa Sabin 1 [POLIOS] (POL1D); Poliovirus tipo 2, cepa Sabin 2 [PIPOL2] (POL2A); Poliovirus tipo 2 [POL2CG1] (POL2B); Poliovirus tipo 2, cepa Lansing [POL2LAN] (POL2C); Poliovirus tipo 3, cepa Sabin 3 [PIPOL3] (POL3A); Poliovirus tipo 3, cepa 23127 [PIPO3XX] (POL3B); Poliovirus tipo 3, cepa León 37 [POL3L37] (POL3E); Poliovirus tipo 3, cepa P3/119 [PIPO3119] (POL3C); Poliovirus tipo 3, cepa León 12a1b [POL3L12C] (POL3D); Coxsackievirus A21 [CXA21CG] (CA21); Coxsackievirus B1 [CXA1g] (CB1);

ES 2 093 554 A1

Coxsackievirus B3 [CXA3CG] (CB3); Coxsackievirus B4 [PICOXB4] (CB4); Coxsackievirus B4 [CXB4S] (CB4S); Coxsackievirus B5 [CSB5CGA] (CB5); Coxsackievirus A13 [CAU05876] (CA16); Coxsackievirus A9 [CXA9CG] (CA9); Coxsackievirus A24 [CXA24CG] (CA24); Echovirus 12 [EC12TCG] (E12); Echovirus 12, prototipo Travis salvaje [EC12TCGW] (E12W). Se identifican con el código de secuencia (SEQ ID No:) las correspondiente secuencias de los iniciadores de enterovirus. Los guiones representan ausencia del correspondiente nucleótido en los alineamientos.

Figura 2

10 Alineamiento de las secuencias de aminoácidos (A) y nucleótidos (B) correspondientes a los genes de la ADN polimerasa de los 6 herpesvirus humanos: Herpes simplex tipo 1 (HSV1); Herpes simplex tipo 2 (HSV2); Virus Varicela-zóster (VZV); Citomegalovirus (CMV); Herpesvirus humano 6 (HHV6); virus Epstein-Barr (EBV); ADN polimerasa humana α (HPOL α); Virus de la Pseudorrabia Porcina (PRV). Alineamientos de los iniciadores de reacción de la primera (C) y de la segunda (D) amplificación. Los
15 guiones representan posiciones idénticas a las de HSV1.

Figura 3

20 Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de amplificación generados en el Ejemplo 2. Marcador de peso molecular (M); Coxsackievirus A 16 (carril 1); HSV1 (carril 2); HSV2 (carril 3); VZV (carril 4); CMV (carril 5); HHV6 (carril 6); EBV (carril 7); Mezcla de todos los herpesvirus (carril 8); Fibroblastos fetales humanos (carriles 9 y 17); Coxsackievirus A16 y HSV1 (carril 10); Coxsackievirus A16 y HSV2 (carril 11); Coxsackievirus A16 y VZV (carril 12); Coxsackievirus A16 y CMV (carril 13); Coxsackievirus A16 y HHV6 (carril 14); Coxsackievirus A16 y EBV (carril 15); Coxsackievirus A16 y mezcla de todos los herpesvirus (carril 16). El fragmento de 500 bp corresponde a los enterovirus y el de
25 194 bp a los herpesvirus.

Figura 4

30 Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de amplificación generados en el Ejemplo 4. Marcador de peso molecular (M); marcador de peso molecular de los fragmentos amplificados; 120 bp HSV1 y HSV2, 98 bp VZV, 78 bp CMV, 66 bp HHV6 y 54 bp EBV (carriles 1, 10 y 19). HSV1, HSV2, VZV, CMV, HHV6, EBV (carriles 2, 3, 4, 5, 6 y 7 sin ARN de Coxsackievirus A16 respectivamente, carriles 11, 12, 13, 14, 15 y 16 en presencia de ARN de Coxsackievirus A16 respectivamente). Mezcla de todos los
35 herpesvirus (carril 8 y 17 con y sin ARN de Coxsackievirus A16 respectivamente); Fibroblastos humanos (carriles 9 y 18).

Figura 5

40 Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de amplificación generados en la primera y en la segunda amplificación según el Ejemplo 6. Marcador de peso molecular (M), fragmento de 500 bp corresponde a la amplificación de Coxsackievirus A16 (carriles 1, 3 y 4), el fragmento de 194 bp corresponde a primera amplificación de PRV (carriles 2, 3 y 4). Marcador de peso molecular de herpesvirus (carril 6), Coxsackievirus A16 en segunda amplificación (carril 7), identificación de PRV sin enterovirus (carril 8),
45 con enterovirus (carril 9), en una mezcla de todos los herpesvirus (carril 10), Fibroblastos fetales humanos (carriles 5 y 11).

Figura 6

50 Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de amplificación generados en segunda amplificación de los virus herpes con o sin control interno de amplificación según el Ejemplo 7. Marcador de peso molecular (M); mezcla de todos los herpesvirus, HSV1, HSV2, VZV, CMV, HHV6, EBV Y Fibroblastos fetales humanos con iniciadores del segunda reacción de amplificación múltiple de herpesvirus (carriles 1 al 8 respectivamente), con iniciadores de PRV además de los de amplificación múltiple de herpesvirus
55 (carriles 9 al 16 respectivamente), con iniciadores de PRV y ADN de PRV (carriles 17 al 24 respectivamente).

Figura 7

60 1 Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de amplificación generados en la primera y en la segunda amplificación según el Ejemplo 10. Marcador de peso molecular (M), fragmento de 500 bp para Coxsackievirus A16 (carril 1) y los fragmentos de 194 bp para HSV1 (carriles 2 y 3) y HSV2 (carril 4). Después de la tipificación se observa amplificación específica de HSV1 (carril 5) y HSV2

ES 2 093 554 A1

(carril 6).

2 Electroforesis en gel de agarosa de cuatro muestras clínicas en las que se identificó previamente a la
amplificación genómica HSV1 (carriles 1 y 2) y HSV2 (carriles 3 y 4). Fibroblastos fetales humanos
5 (carriles 5 y 6). Marcador de peso molecular (M).

Ejemplos

Ejemplo 1

10 *Diseño de iniciadores para la detección de enterovirus humanos con objeto de obtener un método múltiple
de amplificación de enterovirus y/o herpesvirus*

15 El género enterovirus engloba a un número muy elevado de virus de los que en sólo una minoría se ha
podido obtener secuencias completas de su genoma. Se ha destacado la región 5' no codificante (5'NCR)
por la enorme homología que presentan los enterovirus secuenciados y cuyas secuencias están disponibles
hasta la fecha en la base de datos GENBANK. La región 5'NCR presenta un enorme interés biológico por
su participación en el inicio de la replicación de este grupo de virus. Excepcionalmente enterovirus 22 y
20 Coxsackievirus A2 que no presentan homología en esta zona del genoma, han sido excluidos del bloque
génico conservado de la región 5'NCR de los enterovirus disponibles, que se representan en la Figura 1.

A partir de los análisis comparativos de cada uno de los genomas estudiados se han diseñado los
siguientes iniciadores:

25 POLARIDAD POSITIVA: SEQ ID No: 1
SEQ ID No: 2

POLARIDAD NEGATIVA: SEQ ID No: 3

30 Como se puede apreciar en la Figura 1, el grado de homología entre los dos iniciadores diseñados y la
correspondiente secuencia específica de cada uno de los enterovirus cuyo genoma ha sido secuenciado, es
muy elevada llegando a ser exactamente igual en la mayoría de los virus. Este grado de homología tan
elevado permite realizar reacciones de amplificación de enterovirus muy específicas y altamente sensibles.

35 Una vez diseñados los iniciadores de enterovirus, se ha de compatibilizar el sistema para poder am-
plificar en una primera reacción de amplificación ARN procedente de los enterovirus, además de ADN
procedente de los herpesvirus. Para ello se ha diseñado una mezcla de reacción que contiene los inicia-
dores de primera reacción de amplificación de enterovirus y herpesvirus. Los iniciadores de herpesvirus
fueron diseñados y descritos en la Patente Española P9201174.

40 A partir de las secuencias reflejadas en las Figuras 1 y 2 y según el Ejemplo 2 y los procedimientos
descritos en la Patente Española P9201174 se ha diseñado una mezcla de amplificación de enterovirus y
herpesvirus en una única reacción de amplificación. La mezcla de iniciadores consiste en:

45 POLARIDAD POSITIVA POLARIDAD NEGATIVA

SEQ ID. No: 1	SEQ ID No: 3
SEQ ID. No: 2	SEQ ID No: 9
SEQ ID. No: 4	SEQ ID No: 10
SEQ ID. No: 5	SEQ ID No: 11
SEQ ID. No: 6	SEQ ID No: 12
SEQ ID. No: 7	SEQ ID No: 13
SEQ ID. No: 8	

55 Ejemplo 2.

Detección de enterovirus y/o herpesvirus humanos en una primera reacción de amplificación

60 Para realizar un primer ensayo de amplificación las muestras para analizar contienen diferentes di-
luciones de enterovirus mezclados con una cantidad determinada de fibroblastos humanos. El método
de preparación del ARN viral ha sido descrito anteriormente (Casas, I. Powell L., Klapper P.E., Cleator

ES 2 093 554 A1

G.M. A new extraction method for RNA and DNA by precipitation in clinical samples. J. Virol. Methods 1994, en prensa). Una vez precipitados los ácidos nucleicos (ADN y ARN) presentes en la muestra a analizar se diluyen en 10 μ l de agua. El ARN presente en 5 μ l de la anterior dilución se transforma en cDNA mediante una transcripción inversa de 30 minutos de duración a una temperatura de 37°C, en las condiciones que recomienda el fabricante de la transcriptasa inversa, enzima vital para este proceso. Se utilizan 100 pmol de iniciador de polaridad negativa, ya que la hebra de ARN presenta una polaridad positiva.

El cDNA se someterá a una amplificación de 40 ciclos, con una temperatura de hibridación de los iniciadores de 60°C. El rango de la temperatura de desnaturalización se fija entre 92°C y 95°C, aunque preferentemente se ha elegido 94°C. La temperatura de extensión de ADN polimerasa se fija entre 60°C y 80°C, aunque preferiblemente es 72°C. La mezcla de reacción está constituida por una mezcla de los dos iniciadores en una concentración elegida de 100 pmol de cada uno de ellos. El volumen total elegido de la reacción es 50 μ l.

Utilizando los iniciadores diseñados en el Ejemplo 1, se ensayan muestras contenidas 30 tipos diferentes de enterovirus procedentes de aislados clínicos obtenidos en nuestro laboratorio:

	Polio 1, salvaje y vacunal	Echovirus 7
	Polio 2, salvaje y vacunal	Echovirus 9
	Polio 3, salvaje y vacunal	Echovirus 11
	Coxsackievirus B1	Echovirus 14
	Coxsackievirus B2	Echovirus 17
	Coxsackievirus B4	Echovirus 19
	Coxsackievirus B5	Echovirus 20
	Coxsackievirus B6	Echovirus 21
	Coxsackievirus A9	Echovirus 24
	Coxsackievirus A16	Echovirus 25
	Echovirus 2	Echovirus 27
	Echovirus 3	Echovirus 30
	Echovirus 4	Echovirus 31
	Echovirus 5	Echovirus 33
	Echovirus 6	Echovirus 70

Utilizando los iniciadores diseñados en el Ejemplo 1, se ensayan muestras conteniendo 100 TCID₅₀ de Coxsackievirus A16 con HSV1, HSV2, VZV, CMV, HHV6 y EBV. El análisis de los fragmentos generados se muestra en la Figura 3. Todos los enterovirus generan fragmentos de amplificación entre 500 y 487 bp y los herpesvirus lo generan de 194 bp.

Ejemplo 3

Diseño de iniciadores para la detección específica de enterovirus y/o herpesvirus en los que el marcaje es el peso molecular del fragmento amplificado

Para la identificación de los fragmentos generados en el Ejemplo 2, se han diseñado los iniciadores para una segunda reacción de amplificación que utilice como molécula diana el fragmento obtenido en la primera reacción de amplificación. De esta forma se aumenta la sensibilidad y la especificidad de la reacción de identificación. A partir de las secuencias relacionadas y comparadas en la Figura 1 se han seleccionado inicialmente los siguientes iniciadores comunes para todos los enterovirus.

POLARIDAD POSITIVA: SEQ ID No: 14

POLARIDAD NEGATIVA: SEQ ID No: 15

Después de la segunda reacción de amplificación se generan fragmentos de amplificación de 272 bp.

A partir de la comparación de secuencias de las Figuras 1 y 2 y según los procedimientos descritos en la Patente Española P9201174 se ha diseñado una mezcla para una segunda amplificación que utilizará como sustrato los fragmentos de amplificación obtenidos en el Ejemplo 2 de enterovirus y herpesvirus.

ES 2 093 554 A1

Dicha mezcla consiste en:

POLARIDAD POSITIVA POLARIDAD NEGATIVA

5	SEQ ID No: 14	SEQ ID No: 15
	SEQ ID No: 16	SEQ ID No: 21
	SEQ ID No: 17	SEQ ID No: 22
	SEQ ID No: 18	SEQ ID No: 23
10	SEQ ID No: 19	SEQ ID No: 24
	SEQ ID No: 20	SEQ ID No: 25

Ejemplo 4

15 *Detección e identificación por el peso molecular del fragmento amplificado de herpesvirus humanos en presencia de enterovirus*

Utilizando las mezclas de iniciadores definidas para una segunda reacción de amplificación de herpesvirus diseñadas en la Patente Española P9201174, se reamplificaron, en las condiciones descritas en dicha patente, diluciones 1:1000 de los fragmentos de 194 bp generados en la reacción primera de amplificación Ejemplo 2. Como se puede apreciar en la Figura 4, se puede determinar e identificar el virus herpes que está presente en la muestra sin que ésta amplificación se vea afectada por la presencia de fragmentos de amplificación procedentes de ARN de enterovirus. Todos los herpesvirus humanos generaron un fragmento de amplificación del peso molecular esperado.

Ejemplo 5

Diseño de sonda común y específica para la identificación de enterovirus humanos

30 Para la identificación de los fragmentos generados en el Ejemplo 2, se ha diseñado una sonda específica a partir de las secuencias relacionadas y comparadas en la Figura 1. La zona elegida en el interior del fragmento de amplificación presenta una elevada homología siendo prácticamente la misma para todos los enterovirus comparados. La secuencia de nucleótidos es la siguiente:

35 PRIORIDAD POSITIVA: SEQ ID No: 26

Ejemplo 6

40 *Diseño de los iniciadores para la detección de un control interno de amplificación en cada tubo de reacción*

Se ha tomado como base del diseño el método múltiple de amplificación de herpesvirus ya descrito en la Patente Española P9201174. Se basa en la amplificación múltiple de los herpesvirus HSV1, HSV2, VZV, CMV, HHV6 y EBV utilizando una mezcla de iniciadores caracterizados en dicha patente porque sus extremos 3' son zonas conservadas entre los genes de la ADN polimerasa de los herpesvirus humanos.

45 Como control de amplificación interno se ha diseñado el uso de un fragmento clonado del gen de la ADN polimerasa del herpesvirus porcino PRV (virus de la pseudorrabia porcina o enfermedad de Aujeszki). Este fragmento de ADN añadido se forma sistemática en todos los tubos será amplificado por iniciadores específicos que han sido diseñados de igual forma que el resto de los herpesvirus en la patente anteriormente mencionada. En la Figura 2 se presentan las secuencias de nucleótidos de los fragmentos seleccionados de la ADN polimerasa y las mezclas de polaridad positiva y de polaridad negativa de los herpesvirus.

55 Las secuencias de los iniciadores específicos del control interno o del fragmento clonado del virus PRV son las siguientes:

POLARIDAD POSITIVA. SEQ ID No: 27

60 POLARIDAD NEGATIVA. SEQ ID No: 28

Se han diseñado iniciadores específicos capaces de reamplificar el fragmento generado en la primera reacción de amplificación de PRV como control interno de amplificación. Para la segunda reacción de

ES 2 093 554 A1

amplificación se han diseñado los siguientes iniciadores:

POLARIDAD POSITIVA. SEQ ID No: 29

5 POLARIDAD NEGATIVA. SEQ ID No: 30

El fragmento específico de PRV tendría un tamaño de 140 bp tras la segunda amplificación por lo que es fácilmente detectable.

10 Ejemplo 7

Detección de herpesvirus en presencia de los iniciadores específicos del virus PRV utilizado como control interno de primera y segunda amplificación

15 Según el procedimiento descrito en el Ejemplo 4, se ha utilizado una nueva mezcla de iniciadores específicos de los virus herpes que contienen además los iniciadores específicos de PRV, utilizado como control interno de amplificación. En primer lugar se han sometido a una primera reacción de amplificación ADN de cada uno de los virus herpes según los procedimientos descritos en el Ejemplo 1 y utilizando la mezcla de iniciadores compuesta por:

20	POLARIDAD POSITIVA	POLARIDAD NEGATIVA
	SEQ ID No: 27	SEQ ID No: 28
	SEQ ID No: 4	SEQ ID No: 9
25	SEQ ID No: 5	SEQ ID No: 10
	SEQ ID No: 6	SEQ ID No: 11
	SEQ ID No: 7	SEQ ID No: 12
	SEQ ID No: 8	SEQ ID No: 13

30 A continuación tras una segunda reacción de amplificación según el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 se han amplificado los fragmentos de ADN procedentes de la primera reacción de amplificación correspondiente a cada uno de los virus herpes (HSV1, HSV2, VZV, CMV, HHV6 y EBV). Se ha podido detectar ADN específico de cada uno de los virus herpes y de PRV tras la segunda reacción de amplificación utilizando la mezcla de iniciadores específicos compuesta por:

35	POLARIDAD POSITIVA	POLARIDAD NEGATIVA
	SEQ ID No: 29	SEQ ID No: 30
40	SEQ ID No: 16	SEQ ID No: 21
	SEQ ID No: 17	SEQ ID No: 22
	SEQ ID No: 18	SEQ ID No: 23
	SEQ ID No: 19	SEQ ID No: 24
45	SEQ ID No: 20	SEQ ID No: 25

Cada virus se identifican en función del peso molecular de los fragmentos amplificados Figura 6.

Ejemplo 8

50 *Detección de enterovirus y herpesvirus en presencia de los iniciadores específicos del virus PRV como control interno de primera y de segunda reacción de amplificación*

55 Como control de amplificación internos se ha utilizado el diseño en el Ejemplo 6. La mezcla de iniciadores constituida por aquellos específicos de enterovirus y por los de herpesvirus se enriquece por la presencia de los iniciadores del control interno, que consiste en un fragmento clonado del gen de la ADN polimerasa del virus PRV.

60 Utilizando las mezclas de iniciadores de amplificación general de enterovirus y herpesvirus diseñadas en le Ejemplo 1 y reamplificadas en las condiciones definidas en el Ejemplo 4, se han obtenido fragmentos de amplificación de 500 bp específicos de enterovirus y de 194 bp específicos de herpesvirus cuando se realiza la primera reacción de amplificación. Con respecto a la segunda reacción de amplificación se pueden tipificar todos los herpesvirus y se demuestra la presencia de un fragmento de amplificación de 140

bp de tamaño coincidente con los fragmentos generados en el Ejemplo 6. Los fragmentos de amplificación de primera y segunda reacción y amplificación pueden ser observados en la Figura 5.

Ejemplo 9

5

Diseño de la mezcla de iniciadores específicos de HSV1 y HSV2

La homología existente entre el virus herpes simplex tipo 1 y el virus herpes simplex tipo 2 es muy elevada. De manera similar a como se ha realizado el diseño de los iniciadores del Ejemplo 6, se han determinado las secuencias de nucleótidos de los iniciadores específicos de HSV1 y HSV2 para una segunda reacción de amplificación en la que la molécula diana es el fragmento de amplificación resultado de una primera reacción de amplificación previamente desarrollada y descrita en la Patente Española P9201174.

A partir de las secuencias alineadas y comparadas de los herpesvirus humanos de la Figura 2 se ha diseñado unos iniciadores específicos para estos dos virus tan homólogos.

POLARIDAD POSITIVA: SEQ ID No: 31

POLARIDAD NEGATIVA: SEQ ID No: 32

20

La amplificación utilizando las mezclas diseñadas debería generar fragmentos de 93 bp para HSV1 y de 138 para HSV2.

Ejemplo 10

25

Detección de secuencias específicas de HSV1 o HSV2 en muestras que contienen o no ARN de enterovirus.

Utilizando las mezclas de iniciadores de primera reacción de amplificación y de tipificación de los Ejemplos 1 y 8 y los procedimientos descritos en los Ejemplos 2 y 4 se ha podido identificar específicamente fragmentos de amplificación de HSV1 o de HSV2. Como en Ejemplos anteriores 4 y 7 la presencia de enterovirus en la mezcla de reacción de la primera amplificación, así como de la segunda reacción de amplificación, no influye para poder caracterizar los fragmentos de amplificación específicos de 93 bp y de 138 bp en el caso de ser HSV1 o HSV 2 respectivamente.

35

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

40

(i) APPLICANT:

- (A) NAME: INSTITUTO DE SALUD CARLOS III
- (B) STREET: Sinesio Delgado, 6 / Pabellon 3
- (C) CITY: Madrid
- (D) STATE: Madrid
- (E) COUNTRY: Spain
- (F) POSTAL CODE (ZIP): E-28029
- (G) TELEPHONE: + 34 1 3230141
- (H) TELEFAX: + 34 1 3231943

45

50

(ii) TITLE OF INVENTION: PROCEDIMIENTOS DE AMPLIFICACION DE GENOMA Y MEZCLAS DE OLIGONUCLEOTIDOS INICIADORES PARA LA DETECCION Y LA IDENTIFICACION DE SECUENCIAS GENOMICAS RELACIONADAS

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 32

55

(iv) COMPUTER READABLE FORM:

- (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

60

ES 2 093 554 A1

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 24 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA to mRNA
- (iii) HYPOTHETICAL: YES
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 - (A) ORGANISM: Enterovirus
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:

20 CGGTACCTTT GTGCGCCTGT TTTA 24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 24 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA to mRNA
- (iii) HYPOTHETICAL: YES
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 - (A) ORGANISM: Enterovirus
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:

40 CGGTACCTTT GTACGCCTGT TTTA 24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 25 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA to mRNA
- (iii) HYPOTHETICAL: YES
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 - (A) ORGANISM: Enterovirus
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3:

60 GAAACACGGA CACCCAAAGT AGTCG 25

ES 2 093 554 A1

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 23 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Herpes simplex virus

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 4:

CGCATCATCT ACGGGGACAC GGA

23

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 23 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Varicella-zoster virus

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 5:

AAGGTTATAT ATGGAGATAC GGA

23

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 23 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Human cytomegalovirus

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 6:

CGGGTCATCT ACGGGGACAC GGA

23

ES 2 093 554 A1

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 23 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
- (iii) HYPOTHETICAL: YES
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 - (A) ORGANISM: Human herpesvirus 6
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 7:

20 GAGGTAATTT ATGGTGATAC GGA 23

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 23 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
- (iii) HYPOTHETICAL: YES
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 - (A) ORGANISM: Epstein-Barr virus
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 8:

40 CGAGTCATCT ACGGGGACAC GGA 23

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 23 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
- (iii) HYPOTHETICAL: YES
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 - (A) ORGANISM: Herpes simplex virus
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 9:

60 ATGACGCCGA TGTACTTTTT CTT 23

ES 2 093 554 A1

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 10:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 23 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Varicella-zoster virus

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 10:

ATTACCCCAA TGTACTTTTT CTT

23

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 11:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 23 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Human cytomegalovirus

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 11:

ACTTTACCAA TGTATCTTTT CTT

23

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 12:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 23 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Human herpesvirus 6

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 12:

TGTCTACCAA TGTATCTTTT TTT

23

ES 2 093 554 A1

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 13:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 23 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
- (iii) HYPOTHETICAL: YES
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 - (A) ORGANISM: Epstein-Barr virus
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 13:

20 AGCACCCCA CATATCTCTT CTT 23

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 14:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 21 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA to mRNA
- (iii) HYPOTHETICAL: YES
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 - (A) ORGANISM: Enterovirus
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 14:

40 CAAGCACTTC TGTTTCCCG G 21

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 15:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 23 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA to mRNA
- (iii) HYPOTHETICAL: YES
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 - (A) ORGANISM: Enterovirus

60

ES 2 093 554 A1

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 15:

TAGCTCAATA GGCTCTTCAC ACC

23

5 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 20 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
10 (C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

15 (iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

20 (A) ORGANISM: Herpes simplex virus

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 16:

GTGTTGTGCC GCGGTCGCAC

20

25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 20 base pairs
30 (B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

35

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

40

(A) ORGANISM: Varicella-zoster virus

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 17:

45 TGAGGGGATA GCTAAAATCG

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 20 base pairs
50 (B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

55

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

60

(A) ORGANISM: Human cytomegalovirus

ES 2 093 554 A1

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 18:

GGGCCCAGCC TGGCGCACTA

20

5 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 20 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
10 (C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

15 (iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

20 (A) ORGANISM: Human herpesvirus 6

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 19:

GCCAAACATA TCACAGATCG

20

25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 20 base pairs
30 (B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

35

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

40

(A) ORGANISM: Epstein-Barr virus

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 20:

45

ACCCGGAGCC TGTTGTAGC

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 21:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 21 base pairs
50 (B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

55

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

60

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Herpes simplex virus

ES 2 093 554 A1

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 21:

GGTGAACGTC TTTTCGAACT C

21

5 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 22:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 21 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

10 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

15 (iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

20 (A) ORGANISM: Varicella-zoster virus

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 22:

TATAAAAGTT TTTTCACACT C

21

25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 23:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 21 base pairs

30 (B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

35

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

40 (A) ORGANISM: Human cytomegalovirus

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 23:

45 GACGAAGACC TTTTCAAAC C

21

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 24:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 21 base pairs

50 (B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

55

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

60 (A) ORGANISM: Human herpesvirus 6

ES 2 093 554 A1

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 24:

ACATAAAATC TTTTCAAAC T C

21

5 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 25:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 21 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
10 (C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

15 (iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

20 (A) ORGANISM: Epstein-Barr virus

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 25:

GGAGAAGGTC TTCTCGGCCT C

21

25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 26:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 25 base pairs
30 (B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA to mRNA

35

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

40

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Enterovirus

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 26:

45

CCTCCGGCCC CTGAATGCGG CTAAT

25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 27:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 23 base pairs
50 (B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

55

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

60

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Pseudorabies virus

ES 2 093 554 A1

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 27:

CGCGTGGTCT ACGGGGACAC GGA

23

5 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 28:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 23 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
10 (C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

15 (iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

20 (A) ORGANISM: Pseudorabies virus

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 28:

ATGACGCCGA TGTATTCTT CTT

23

25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 29:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 20 base pairs
30 (B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

35

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

40

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Pseudorabies virus

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 29:

45 GGGACACGGA CTCGGTCTTC

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 30:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 21 base pairs
50 (B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

55

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

60

ES 2 093 554 A1

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Pseudorabies virus

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 30:

5

CCGGAAGGTC TTCTCGCACT C

21

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 31:

10

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 24 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

15

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: YES

20

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Herpes simplex virus type 1

25

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 31:

GGGCTCACGG CCGCCGGGCT GACG

24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 32:

30

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 22 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

35

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: YES

40

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Herpes simplex virus type 2

45

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 32:

GACACGGACT CCATTTTCGT TT

22

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de amplificación de genoma para la detección de agentes infecciosos relacionados por su capacidad de producir patología similar, que utiliza, para cada familia de agentes infecciosos con secuencias genómicamente relacionadas que se quieren amplificar, una mezcla.

- i) que se obtiene como suma simple de oligonucleótidos,
- ii) que incluye, cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla, preferentemente en su extremo 3', secuencias homólogas seleccionadas de entre la secuencias genómicamente relacionadas que se quieren amplificar,
- iii) que puede incluir además, para cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla, preferentemente en su extremo 5', secuencias no homólogas seleccionadas de entre las secuencias genómicamente relacionadas que se quieren amplificar, y
- iv) cuyos oligonucleótidos componentes pueden diferenciarse de las secuencias conocidas que se quieren amplificar en al menos un nucleótido.

y que está **caracterizado** porque para llevar a cabo la reacción de amplificación y detección, se combinan mezclas como las descritas anteriormente y que fueron específicamente diseñadas para cada una de las familias de agentes infecciosos que se quieren detectar y porque dicha combinación de mezclas se utiliza como iniciador de la reacción de amplificación.

2. Una combinación de mezclas de oligonucleótidos para ser utilizada como iniciador de una reacción de amplificación de genoma para la detección de agentes infecciosos relacionados por su capacidad de producir patología similar, estando cada una de dichas mezclas específicamente diseñada para cada una de las familias de agentes infecciosos que se quieren detectar y diseñada de manera:

- i) que se obtiene como suma simple de oligonucleótidos,
- ii) que incluye, cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla, preferentemente en su extremo 3', secuencias homólogas seleccionadas de entre las secuencias genómicamente relacionadas que se quieren amplificar.
- iii) que pueden incluir además, para cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla preferentemente en su extremo 5', secuencias no homólogas seleccionadas de entre las secuencias genómicamente relacionadas que se quieren amplificar, y
- iv) cuyos oligonucleótidos componentes pueden diferenciarse de las secuencias conocidas que se quieren amplificar en al menos un nucleótido,

y que está **caracterizada** porque cada una de las mezclas obtenidas se combinan entre sí de manera que son útiles para su uso como iniciador de la reacción de amplificación y detección.

3. Procedimientos según la reivindicación 1, **caracterizado** además

- i) por incluir en la mezcla de reacción cantidades concretas de un genoma que no debe estar presente en la muestra a estudiar,
- ii) por incluir además iniciadores de reacción específicos de dicha secuencia y
- iii) porque tales inclusiones se utilizan para lograr un control interno de la reacción de amplificación.

4. Procedimientos según las reivindicaciones 1 y 3, **caracterizados** además porque el genoma introducido deriva de una especie vírica perteneciente a alguna de las familias de virus que se quieren identificar.

5. Procedimientos según las reivindicaciones 1, 3 y 4, **caracterizados** además porque el genoma introducido corresponde a un virus que no es capaz de infectar a la especie animal sobre la que se realiza el diagnóstico, especialmente porque corresponde a un virus que no es capaz de infectar a humanos.

6. Procedimientos según las reivindicaciones 1 y 3 a 5, **caracterizados** además porque entre los agentes infecciosos que se quieren detectar están los herpesvirus humanos y porque el genoma introducido es

el de un herpesvirus que no puede infectar al hombre y especialmente es el herpesvirus porcino 1.

7. Procedimientos según las reivindicaciones 1 y 3 a 6, **caracterizados** además porque posteriormente se identifican las secuencias amplificadas por hibridación con oligonucleótidos específicos o mezclas
5 de oligonucleótidos específicos de las especies o géneros que se quieren identificar.

8. Procedimientos según las reivindicaciones 1 y 3 a 6, **caracterizados** además porque posteriormente se identifican las secuencias amplificadas mediante una segunda reacción de amplificación que utiliza como sustrato el producto de la primera reacción de amplificación.

9. Procedimientos según la reivindicación anterior, **caracterizados** además porque para la segunda reacción de amplificación se utiliza como iniciador de la reacción una mezcla **caracterizada**

i) por obtenerse como suma simple de oligonucleótidos.

ii) por incluir, cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla, preferentemente en su extremo 3', secuencias específicas de cada una de las secuencias que se quieren tipificar en la reacción de amplificación,

iii) por estar diseñada de manera que los fragmentos específicos amplificados son diferentes entre sí por tamaño o por diferente marcaje físico o químico de cada uno de los oligonucleótidos componentes de la mezcla, y

iv) porque uno o más de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla pueden diferenciarse de las secuencias conocidas que se quieren amplificar en al menos un nucleótido.

10. Procedimientos según la reivindicación 1 y 3 a 9, **caracterizados** además porque se utilizan para la detección y la identificación de agentes infecciosos que están relacionados por su capacidad de producir patología similar, especialmente por ser capaces de producir patología similar en la especie humana.

11. Procedimientos según las reivindicaciones 1 y 3 a 10, **caracterizados** además porque se utilizan para la detección e identificación de virus pertenecientes a las familias *Herpesviridae* y *Picornaviridae*, especialmente para la detección e identificación de herpesvirus y enterovirus humanos.

12. Procedimientos según las reivindicaciones 1 y 3 al 11, **caracterizados** además porque se utilizan para la detección de herpesvirus y enterovirus humanos y porque para la primera reacción de amplificación se utilizan como base de la mezcla de reacción al menos uno de los siguientes oligonucleótidos o de sus homólogos en las hebras complementarias:

i) SEQ ID No: 1
SEQ ID No: 2
SEQ ID No: 4
SEQ ID No: 5
SEQ ID No: 6
SEQ ID No: 7
SEQ ID No: 8

ii) SEQ ID No: 3
SEQ ID No: 9
SEQ ID No: 10
SEQ ID No: 11
SEQ ID No: 12
SEQ ID No: 13

13. Procedimientos según las reivindicaciones 3 a 12, **caracterizados** además porque como genoma a utilizar como control interno se utiliza genoma completo o un fragmento genómico del herpesvirus porcino 1 y porque en la mezcla de reacción se incluyen iniciadores de reacción capaces de amplificar un fragmento del mismo, especialmente al menos uno de los siguientes oligonucleótidos o de sus homólogos en las hebras complementarias:

i) SEQ ID No: 27
SEQ ID No: 29

5 ii) SEQ ID No: 28
SEQ ID No: 30

14. Procedimientos según las reivindicaciones 7 a 13, **caracterizados** además porque se utilizan para detectar e identificar herpesvirus y enterovirus humanos y porque como oligonucleótido para la hibridación específica con enterovirus humanos se utiliza el siguiente o su homólogo en las hebras complementarias:

10 SEQ ID No: 26

15. Procedimientos según las reivindicaciones 7 a 13, **caracterizados** además porque se utilizan para detectar e identificar herpesvirus y enterovirus humanos y porque como oligonucleótidos para la hibridación específica con herpesvirus humanos puede utilizarse una mezcla de oligonucleótidos específicos de cada una de las especies víricas que se quieren identificar.

20. Procedimientos según la reivindicación anterior, **caracterizado** además porque tras la reacción de identificación de herpesvirus humanos, se realizan reacciones de hibridación con cada uno de los oligonucleótidos específicos de cada una de las especies víricas que se quieren identificar, permitiendo así la identificación inequívoca de la especie.

25. Procedimientos según las reivindicaciones 8 a 13, **caracterizados** además porque se utilizan para la detección y la identificación de herpesvirus y enterovirus humanos y porque para la segunda reacción de amplificación se utilizan como base de la mezcla de reacción al menos uno de los siguientes oligonucleótidos o de sus homólogos en las hebras complementarias:

30 i) SEQ ID No: 14
SEQ ID No: 16
SEQ ID No: 17
SEQ ID No: 18
SEQ ID No: 19
SEQ ID No: 20

35 ii) SEQ ID No: 15
SEQ ID No: 21
SEQ ID No: 22
SEQ ID No: 23
40 SEQ ID No: 24
SEQ ID No: 25

45. Procedimientos según la reivindicación anterior, **caracterizados** además porque, tras identificar la presencia de virus herpes simplex (tipo 1 o tipo 2), se realiza una segunda reacción de amplificación genómica para su identificación específica, reacción que utiliza como base de la mezcla de reacción al menos uno de los siguientes oligonucleótidos o de sus homólogos en las hebras complementarias:

i) SEQ ID No: 31

50 ii) SEQ ID No: 32

19. Mezclas según la reivindicación 2, **caracterizadas** además:

55 i) por incluir en la mezcla de reacción cantidades concretas de un genoma que no debe estar presente en la muestra a estudiar,

ii) por incluir además iniciadores de reacción específicos de dicha secuencia y

iii) porque tales inclusiones se utilizan para lograr un control interno de la reacción de amplificación.

60. Mezclas según las reivindicaciones 2 y 19, **caracterizadas** además porque el genoma introducido deriva de una especie vírica perteneciente a alguna de las familias de virus que se quieren identificar.

21. Mezclas según las reivindicaciones 2, 19 y 20, **caracterizadas** además porque el genoma introducido corresponde a un virus que no es capaz de infectar a la especie animal sobre la que se realiza el diagnóstico, especialmente porque corresponde a un virus que no es capaz de infectar a humanos.

5 22. Mezclas según las reivindicaciones 2 y 19 a 21, **caracterizadas** además porque entre los agentes infecciosos que se quieren detectar están los herpesvirus humanos y porque el genoma introducido es el de un herpesvirus que no puede infectar al hombre y especialmente es el herpesvirus porcino 1.

10 23. Mezclas según las reivindicaciones 2 y 19 a 22, **caracterizadas** además porque posteriormente se identifican las secuencias amplificadas por hibridación con oligonucleótidos específicos o mezclas de oligonucleótidos específicos de las especies o géneros que se quieren identificar.

15 24. Mezclas según las reivindicaciones 2 y 19 a 22, **caracterizadas** además porque posteriormente se identifican las secuencias amplificadas mediante una segunda reacción de amplificación que utiliza como substrato el producto de la primera reacción de amplificación.

25 25. Mezclas según la reivindicación anterior, **caracterizadas** además porque para la segunda reacción de amplificación se utiliza como iniciador de la reacción una mezcla **caracterizada**.

20 i) por obtenerse como suma simple de oligonucleótidos.

ii) por incluir, cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla, preferentemente en su extremo 3', secuencias específicas de cada una de las secuencias que se quieren tipificar en la reacción de amplificación,

25 iii) por estar diseñada de manera que los fragmentos específicos amplificados son diferentes entre sí por tamaño o por diferentes marcaje físico o químico de cada uno de los oligonucleótidos componentes de la mezcla, y

30 iv) porque uno o más de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla pueden diferenciarse de las secuencias conocidas que se quieren amplificar en al menos un nucleótido.

35 26. Mezclas según las reivindicaciones 2 y 19 a 25, **caracterizadas** además porque se utilizan para la detección y la identificación de agentes infecciosos que están relacionados por su capacidad de producir patología similar, especialmente por ser capaces de producir patología similar en la especie humana.

27. Mezclas según las reivindicaciones 2 y 19 a 25, **caracterizadas** además porque se utilizan para la detección e identificación de virus pertenecientes a las familias *Herpesviridae* y *Picornaviridae*, especialmente para la detección e identificación de herpesvirus y enterovirus humanos.

40 28. Mezclas según las reivindicaciones 2 y 19 a 27, **caracterizadas** además porque se utilizan para la detección de herpesvirus y enterovirus humanos y porque para la primera reacción de amplificación se utilizan como base de la mezcla de reacción al menos uno de los siguientes oligonucleótidos o de sus homólogos en las hebras complementarias:

45 i) SEQ ID No: 1
SEQ ID No: 2
SEQ ID No: 4
SEQ ID No: 5
50 SEQ ID No: 6
SEQ ID No: 7
SEQ ID No: 8

55 ii) SEQ ID No: 3
SEQ ID No: 9
SEQ ID No: 10
SEQ ID No: 11
60 SEQ ID No: 12
SEQ ID No: 13

29. Mezclas según las reivindicaciones 19 a 28, **caracterizadas** además porque como genoma a utilizar como control interno se utiliza genoma completo o un fragmento genómico del herpesvirus porcino 1

y porque en la mezcla de reacción se incluyen iniciadores de reacción capaces de amplificar un fragmento del mismo, especialmente al menos uno de los siguientes oligonucleótidos o de sus homólogos en las hebras complementarias:

5 i) SEQ ID No: 27
SEQ ID No: 29

10 ii) SEQ ID No: 28
SEQ ID No: 30

30. Mezclas según las reivindicaciones 23 a 29, **caracterizadas** además porque se utilizan para detectar e identificar herpesvirus y enterovirus humanos y porque como oligonucleótidos para la hibridación específica con enterovirus humanos se utiliza el siguiente o su homólogo en las hebras complementarias:

15 SEQ ID No: 26

31. Mezclas según las reivindicaciones 23 a 29, **caracterizadas** además porque se utilizan para detectar e identificar herpesvirus y enterovirus humanos y porque como oligonucleótido para la hibridación específica con herpesvirus humanos puede utilizarse una mezcla de oligonucleótidos específicos de cada una de las especies víricas que se quieren identificar.

32. Mezclas según la reivindicación anterior, **caracterizado** además porque tras la reacción de identificación de herpesvirus humanos, se realizan reacciones de hibridación con cada uno de los oligonucleótidos específicos de cada una de las especies víricas que se quieren identificar, permitiendo así la identificación inequívoca de la especie.

33. Mezclas según las reivindicaciones 24 a 29, **caracterizadas** además porque se utilizan para la detección y la identificación de herpesvirus y enterovirus humanos y porque para la segunda reacción de amplificación se utilizan como base de la mezcla de reacción al menos uno de los siguientes oligonucleótidos o de sus homólogos en las hebras complementarias:

35 i) SEQ ID No: 14
SEQ ID No: 16
SEQ ID No: 17
SEQ ID No: 18
SEQ ID No: 19
SEQ ID No: 20

40 ii) SEQ ID No: 15
SEQ ID No: 21
SEQ ID No: 22
SEQ ID No: 23
SEQ ID No: 24
45 SEQ ID No: 25

34. Mezclas según la reivindicación anterior, **caracterizadas** además porque, tras identificar la presencia de virus herpes simplex (tipo 1 o tipo 2), se realiza una segunda reacción de amplificación genómica para su identificación específica, reacción que utiliza como base de la mezcla de reacción al menos uno de los siguientes oligonucleótidos o de sus homólogos en las hebras complementarias.

i) SEQ ID No: 31

55 ii) SEQ ID No: 32

60

FIGURA 3

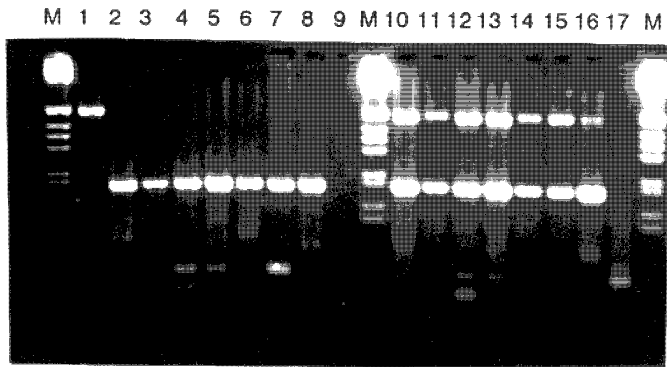


FIGURA 4

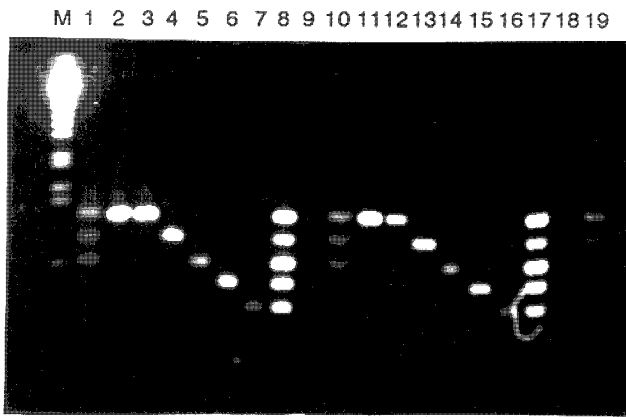


FIGURA 5

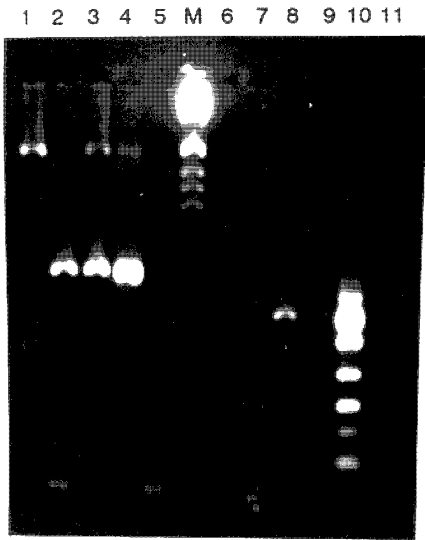


FIGURA 6

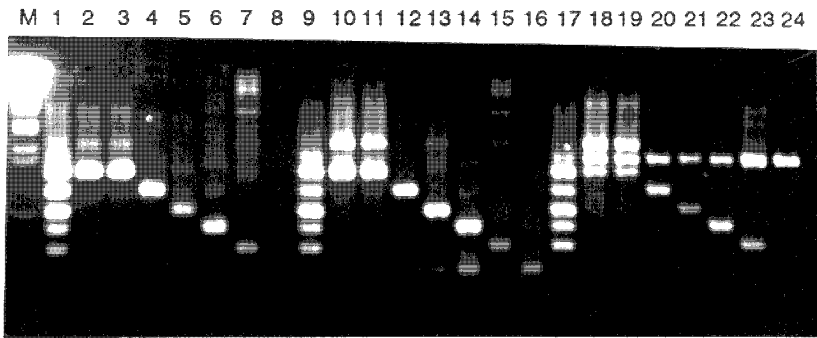
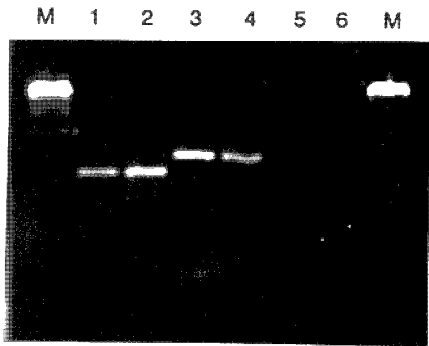
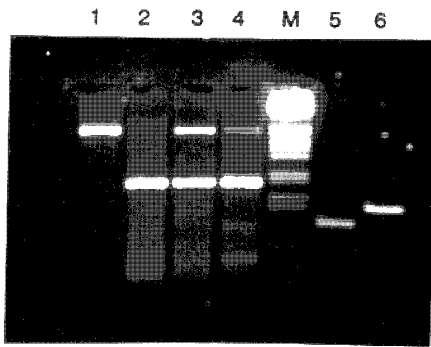
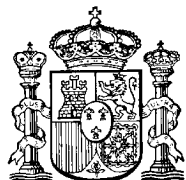


FIGURA 7





INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: C12Q1/68, 1/70

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 9325707 A (INSTITUTO DE SALUD CARLOS III) 23.12.93 *Págs. 4-8; ejemplos 4,5,9; reiv. 1, 3-5, 7-9*	1-2, 8-9
Y	*Ejemplo 1; reiv. 1, 3-5, 7-9*	10-12,14, 9-21,23-33
X	TENORIO, A. et al., Detection and typing of human herpesvirus by multiplex polymerase chain reaction, Journal of Virological Methods, 1993, Vol.44, págs. 261-269. *Ver documento completo*	1-2, 8-9
Y	*Ver documento completo*	10-12,14, 9-21,23-33
Y	US 5075212 A (ROTBART) 24.12.91 *Columna 1, líneas 38-45; columnas 4-5, reiv. 1, 5, 7*	10-12,14
X	WO 9404706 A (AKZO N.V.) 03.03.94 *Págs. 2,3; reiv. 1*	3-5
Y	*Págs. 2,3; reiv. 1*	9-21,23-33
A	WO 9102091 A (NORTHWESTERN UNIVERSITY) 21.02.91 *Ver documento completo*	
A	US 5354653 A (MATSUMOTO et al.) 11.10.94 *Ver documento completo*	

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 n.º:

Fecha de realización del informe

06.11.96

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/2



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: C12Q1/68, 1/70

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	KIMURA,H. et al. Detection and direct typing of herpes simplex virus by polymerase chain reaction, Med. Microbiol. Immunol., 1990, Vol. 179, págs. 177-184. *Ver documento completo*	
A	WO 9110675 A (STICHTING RESEARCHFONDS PATHOLOGIE) 25.07.91 *Ver documento completo*	
A	TOSHIYA, A. et al., Detection of human alpha-herpesvirus DNA using consensus primers and specific probes, Acta Otolaryngol., 1994, Vol. 514, págs. 132-134. *Ver documento completo*	
A	KÄMMERER,U. et al., Nested PCR for specific detection and rapid identification of human picornaviruses, Journal of Clinical Microbiology, 1994, Vol. 32, No. 2, págs. 285-291. *Ver documento completo*	
A	VANDELVELDE,C. et al., Fast multiplex polymerase chain reaction on boiled clinical samples for rapid viral diagnosis, Journal of Virological Methods, 1990, Vol. 30, págs. 215-227. *Ver documento completo*	
A	EP 628640 A (BECTON, DICKINSON & CO.) 14.12.94 *Ver documento completo*	

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 n.º:

Fecha de realización del informe

06.11.96

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

2/2