

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 521 018**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2011 E 11728792 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 2576841**

54 Título: **Método para la detección específica del virus de la peste porcina clásica**

30 Prioridad:

04.06.2010 EP 10164943

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

12.11.2014

73 Titular/es:

**QIAGEN LEIPZIG GMBH (100.0%)
Deutscher Platz 5A
04103 Leipzig, DE**

72 Inventor/es:

**HOFFMANN, BERND;
LEIFER, IMMANUEL;
BEER, MARTIN y
GAUNITZ, CHRISTINE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 521 018 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para la detección específica del virus de la peste porcina clásica.

Antecedentes de la invención

- 5 La peste porcina clásica (CSF; del inglés, classical swine fever) es una enfermedad infecciosa muy contagiosa y a menudo fatal en cerdos domésticos y jabalíes. Los brotes en las producciones industrializadas de cerdos son controlados mediante medidas sanitarias y el sacrificio a gran escala y causan pérdidas económicas significativas [S. Edwards, A. Fukusho, P. C. Lefevre, A. Lipowski, Z. Pejsak, P. Roehle y J. Westergaard, 2000, "Classical swine fever: the global situation", Vet. Microbiol. 73 (2-3), 103-119; C. M. Fauquet et al., 2005, "Virus Taxonomy, VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses", Elsevier / Academic Press, 2005; J. Vandeputte y G. Chappuis, 1999, "Classical swine fever: the European experience and a guide for infected areas", Rev. Sci. Tech. 18 (3), 638-647]. Los brotes de CSF han de ser comunicados a la OIE (Office International des Epizooties), y la enfermedad es controlada en la Unión Europea (UE) mediante una política de supresión sin vacunación profiláctica. A pesar de los continuos esfuerzos para su erradicación, aún se producen regularmente brotes de CSF en los cerdos domésticos europeos.
- 15 El virus de la CSF (CSFV; del inglés, classical swine fever virus) es un miembro del género *Pestivirus* de la familia *Flaviviridae* y está íntimamente relacionado con el virus de la diarrea vírica bovina (BVDV; del inglés, bovine viral diarrhoea virus) y el virus de la enfermedad de la frontera (BDV; del inglés, border disease virus) (C. M. Fauquet y D. Fargette, 2005, "International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species", Virol J. 2, 64). Los huéspedes naturales del BVDV y el BDV son los ganados bovino y ovino, respectivamente, aunque ambos virus también infectan naturalmente a los cerdos. Es importante diferenciar entre CSFV y BVDV o BDV.
- 20 Los pestivirus son pequeños virus de RNA de cadena sencilla y sentido positivo con un genoma de aproximadamente 12,3 kb (G. Meyers y H. J. Thiel, 1996, "Molecular characterization of pestiviruses", Adv. Virus Res. 47, 53-118). El genoma comprende un marco de lectura abierto que codifica una sola poliproteína de 3898 aminoácidos que está flanqueada por una región no traducida (UTR; del inglés, untranslated region) 5'-terminal y una UTR 3'-terminal. La poliproteína es cotraduccionally y postraduccionally procesada por proteasas víricas y celulares (G. Meyers y H. J. Thiel, 1996, "Molecular characterization of pestiviruses", Adv. Virus Res. 47, 53-118). Es escindida en cuatro proteínas estructurales (C, ERNS, E1 y E2) y siete proteínas no estructurales (Npro, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) [N. Tautz, K. Elbers, D. Stoll, G. Meyers y H. J. Thiel, 1997, "Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites", J. Virol. 71 (7), 5415-22].
- 30 Para un control y una prevención eficaces de la propagación del virus durante los brotes de CSF, es particularmente importante una rápida, sensible y fiable detección del CSFV. El CSFV puede ser detectado mediante protocolos de aislamiento del virus, ELISA de antígenos, RT-PCR basada en gel y RT-PCR en tiempo real [M. Agüero, J. Fernández, L. J. Romero, M. J. Zamora, C. Sánchez, S. Belák, M. Arias y J. M. Sánchez-Vizcaíno, 2004, "A highly sensitive and specific gel-based multiplex RT-PCR assay for the simultaneous and differential diagnosis of African swine fever and Classical swine fever in clinical samples", Vet. Res. 35 (5), 551-563; G. Hergarten, K. P. Hurter y R. G. Hess, 2001, "Detection of infection with classical swine fever virus in wild boar: a comparison of different laboratory diagnostic methods", Dtsch. Tierarztl. Wochenschr. 108 (2), 51-54].
- 40 Se dispone de diferentes protocolos de RT-PCR en tiempo real que se usan en los laboratorios de diagnóstico [D. Barlic-Maganja y J. Grom, 2001, "Highly sensitive one-tube RT-PCR and microplate hybridisation assay for the detection and for the discrimination of classical swine fever virus from other pestiviruses", J. Virol. Methods 95 (1-2), 101-110; B. Hoffmann, M. Beer, C. Schelp, H. Schirrmeier y K. Depner, 2005, "Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. J. Virol. Methods 130 (1-2), 36-44; B. Hoffmann, K. Depner, H. Schirrmeier y M. Beer, 2006, "A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. J. Virol. Methods 136 (1-2), 200-209; I. Leifer, K. Depner, S. Blome, M. F. Le Potier, D. M. Le, M. Beer y B. Hoffmann, 2009a, "Differentiation of C-strain "Riems" or CP7_E2alf vaccinated animals from animals infected by classical swine fever virus field strains using real-time RT-PCR", J. Virol. Methods 158 (1-2), 114-122; J. J. Zhao, D. Cheng, N. Li, Y. Sun, Z. Shi, Q. H. Zhu, C. Tu, G. Z. Tong y H. J. Qiu, 2008, "Evaluation of a multiplex real-time RT-PCR for quantitative and differential detection of wild-type viruses and C-strain vaccine of Classical swine fever virus", Vet. Microbiol. 126 (1-3), 1-10]. En todos los protocolos establecidos se usa el 5'-UTR conservado como molde para la detección de cepas de campo del CSFV. Se ha descrito recientemente un protocolo específico para la cepa C en que se usa la región genómica E^{RNS} para la detección específica del virus de vacuna de la cepa C "Riems" de CSF [I. Leifer, K. Depner, S. Blome, M. F. Le Potier, D. M. Le, M. Beer y B. Hoffmann, 2009a, "Differentiation of C-strain "Riems" or CP7_E2alf vaccinated animals from animals infected by classical swine fever virus field strains using real-time RT-PCR", J. Virol. Methods 158 (1-2), 114-122]. En situaciones con elevada producción de material de muestra positivo, la contaminación de amplicones por la propia RT-PCR en tiempo real o por otras aplicaciones de RT-PCR que se dirigen a la misma región genómica, como el análisis de secuencias, puede interferir en el diagnóstico del CSFV. Por lo tanto, existe la necesidad de otro método

específico para la detección del CSFV. El nuevo método ha de ser compatible con la detección de genes de referencia; es decir, la detección de un gen de referencia no ha de interferir en el nuevo método de detección.

5 La publicación de Haegeman et al. ["Characterisation of the discrepancy between PCR and virus isolation in relation to classical swine fever virus detection", Journal of Virological Methods, volumen 136, nº 1-2, septiembre de 2006 (2006-09), páginas 44-50] se refiere al mismo problema pero, como se esbozará más adelante y también se mostrará experimentalmente, no resuelve el problema.

10 Wong Min-Liang et al. ("Molecular cloning and nucleotide sequence of 3'-terminal region of classical swine fever virus LPC vaccine strain", Virus Gene, volumen 17, nº 3, 1998, páginas 213-218) describen dos ensayos por PCR para la detección de CSFV. Las dianas para una PCR diagnóstica son una región de 1887 pares de bases que encierra el gen NS5A completo, multiplicada con la pareja de cebadores P2/C4, y una región de 134 pares de bases que encierra parte de la región 3' de NS5A y la región 5' del gen NS5B, multiplicada con la pareja de cebadores P3/C5. Como se esbozará más adelante y también se mostrará experimentalmente, Wong Min-Liang et al. no resuelven el problema.

15 Los inventores hallaron inesperadamente que el CSFV puede ser específicamente detectado mediante la detección de la región NS5A o partes de la misma. Por consiguiente, la presente invención proporciona un nuevo método para la detección específica del CSFV. Además, los inventores fueron capaces de detectar cepas del virus de la peste porcina clásica (CSFV) de las que se desconocía la región NS5A (ID. SEC. números 37 a 41). Esto muestra inequívocamente que el método de acuerdo con la presente invención proporciona un método mediante el cual se pueden detectar todas las cepas de CSFV, siendo muy específico para el CSFV.

20 Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un método para determinar la presencia de un virus de la peste porcina clásica (CSFV) en un sujeto, que comprende la operación siguiente:

25 – detección de la región NS5A de al menos un genoma de virus de la peste porcina clásica (CSFV) en una muestra procedente de dicho sujeto; por medio de la multiplicación de ácido nucleico, en donde la multiplicación se lleva a cabo utilizando al menos un cebador para multiplicación de CSFV, en donde dicho al menos un cebador para multiplicación de CSFV comprende un extremo 3' que consiste en al menos los 6 últimos nucleótidos según la secuencia de ID. SEC. nº 3 o ID. SEC. nº 4, y en donde la detección de la región NS5A o partes de la misma del al menos un genoma de virus de la peste porcina clásica (CSFV) se atribuye a la presencia de un virus de la peste porcina clásica (CSFV) en dicho sujeto.

30 En el sentido de la invención, una "muestra" puede ser todos los tejidos biológicos y todos los fluidos tales como linfa, orina, fluido cerebral, sangre, saliva, suero, heces, plasma, y sobrenadante de cultivo celular. Los tejidos pueden ser, por ejemplo, tejidos de órganos tales como bazo, riñón, amígdala, ganglio linfático, tejido epitelial, tejido conjuntivo tal como hueso o sangre, tejido muscular tal como músculo visceral o liso y músculo esquelético, y tejido nervioso. El tejido puede ser también seleccionado del grupo que consiste en médula ósea, cartílago, piel, mucosa y pelo. La muestra es recogida del paciente o sujeto en que se determinará la presencia de CSFV de acuerdo con la invención. Cuando sea apropiado, como por ejemplo en el caso de muestras sólidas, puede que sea necesario que la muestra sea solubilizada, homogeneizada, o sometida a extracción con un disolvente antes de su uso en la presente invención con objeto de obtener una muestra líquida. Por este medio, una muestra líquida puede ser una disolución o una suspensión. Las muestras líquidas pueden ser sometidas a uno o más pretratamientos antes de su uso en la presente invención. Dichos pretratamientos incluyen, pero no se limitan a, dilución, filtración, centrifugación, concentración, sedimentación, precipitación y diálisis. Los pretratamientos pueden también incluir la adición de sustancias químicas o bioquímicas a la disolución, tales como ácidos, bases, tampones, sales, disolventes, colorantes reactivos, detergentes, agentes emulsivos y agentes quelantes.

45 Por región NS5A se quiere significar cualquier región del genoma de un virus de la peste porcina clásica que muestra una identidad secuencial de al menos 70% con respecto a la región de los nucleótidos 8423 a 9913 de la ID. SEC. nº 1, preferiblemente una identidad secuencial de al menos 80%, más preferiblemente una identidad secuencial de al menos 90%, aún más preferiblemente una identidad secuencial de al menos 95% (incluyendo, pero sin limitarse a, una identidad secuencial de al menos 96%, una identidad secuencial de al menos 97%, una identidad secuencial de al menos 98%, una identidad secuencial de al menos 99%, una identidad secuencial de al menos 99,5% y una identidad secuencial de 100%). La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede ser llevada a cabo por diferentes métodos y algoritmos conocidos por quienes tienen experiencia en la técnica, por ejemplo, usando el algoritmo matemático de Karlin y Altschul (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877. Dicho algoritmo está incorporado a los programas BLASTN y BLAST de Altschul et al. (1990), J. Mol. Biol. 215: 403-410. Las búsquedas nucleotídicas BLAST se llevan a cabo con el programa BLASTN, puntuación = 55 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos que muestran una identidad secuencial dada con respecto a la región de genomas de virus de la peste porcina clásica (CSFV) citados en esta memoria. Para obtener alineamientos con huecos con fines comparativos, se utiliza Gapped BLAST del modo descrito por Altschul

et al. (1997), *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se emplean los parámetros por omisión de los respectivos programas.

5 En otra realización preferida, la región NS5A del genoma del al menos un virus de la peste porcina clásica es la región NS5A de al menos uno de los genomas de la cepa de virus de la peste porcina clásica (CSFV) seleccionada del grupo que consiste en las conocidas cepas AY072924 "Paderborn", EU490425 "Thiverval", EU497410 "JL1(06)", AY775178 "Shimen/HVRI", AY646427 "IL/94/TWN", AY805221 "C/HVRI", DQ127910 "SWH", X8793 "Alfort/187", J04358 "Alfort/Tueb", X96550 "CAP", AY578688 "RUCSFPLUM", AY578687 "BRESCIAX", AY55439796 "TD", AY663656 "China", AY259122 "Riems", AF326963 "Eystrup" (ID. SEC. nº 1), AY382481 "China vacc.", AY568569 "CH/01/TWN", AY367767 "GXWZ02", AF531433 "HCLV", AF407339 "cepa 39", AF333000 "cF114", AF099102
10 "Russian vacc.", AF092448 "Shimen", AF091507 "HCLV", AF091661 "Brescia", U90951 "Alfort A19", U45478 "Glentorf, y U45477 "Riems", así como las cepas CSFV Koslov, CSFV Hennef, CSFV Borken, CSFV Roesrath y CSFV Bergen con la región NS5A recién identificada y secuenciada.

15 En una realización de la invención, se detecta la región NS5A detectando una o más de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las ID. SEC. números 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 y 41, o fragmentos de las mismas. En otra realización, dicho fragmento comprende al menos la secuencia según la ID. SEC. nº 2.

20 Los métodos y medios para la detección específica de secuencias en una muestra que comprende una mezcla de ácidos nucleicos son bien conocidos por quienes tienen experiencia en la técnica. Dicho método puede comprender métodos de secuenciación {incluyendo el método de Sanger [F. Sanger *et al.* (1977): "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors", *Proc. Natl. Acad. Sciences US* 74, 5463-5467], la secuenciación aleatoria y la pirosecuenciación [M. Ronaghi (2001): "Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing", *Genome Research* 11, 3-11; A. T. Bankier (2001), "Shotgun DNA sequencing", *Methods Mol. Biol.* 167, 89-100], y la pirosecuenciación GS FLX [M. Droege y B. Hill (2008): "The Genome Sequencer FLX System-longer reads, more applications, straight forward bioinformatics and more complete data sets", *J. Biotechnol.* 136, 3-10]}, y otras tecnologías de secuenciación
25 de próxima generación como Illumina/Solexa, ABI/Solid [O. Morozova y M. A. Marra (2008): "Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics", *Genomics* 92, 255-64], hibridación *in situ*, transferencia Northern, reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés, *polymerase chain reaction*), PCR cuantitativa (qPCR; del inglés, *quantitative PCR*), PCR en tiempo real, PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR; del inglés, *reverse transcriptase PCR*), RT-PCR en tiempo real, y análisis con micromatrices.

30 En una realización, la detección de la región NS5A comprende el uso de una sonda de ácido nucleico que se hibrida con la región NS5A de al menos un genoma del virus de la peste porcina clásica (CSFV) y/o con un ácido nucleico complementario de la al menos una región NS5A del al menos un genoma del virus de la peste porcina clásica (CSFV).

35 De acuerdo con la presente invención, "ácido nucleico" incluye DNA, tal como cDNA o DNA genómico, y RNA. Se entiende que, como se emplea en esta memoria, el término "RNA" comprende todas las formas de RNA, incluyendo mRNA así como RNA genómico (gRNA) de virus. Preferiblemente, las realizaciones en que se cita "RNA" se dirigen a gRNA del virus. En relación con el DNA, se usan las reglas de nomenclatura de la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), que son las siguientes: A es adenina, C es citosina, G es guanina, T es timina, R es G o A, Y es T o C, K es G o T, M es A o C, S es G o C, W es A o T, B es G o T o C (todos salvo A), D es G o A o T (todos salvo C), H es A o C o T (todos salvo G), V es G o C o A (todos salvo T), N es A o G o C o T (cualquiera).
40 Estos símbolos son también válidos para el RNA aunque U sustituye a T (uracilo en vez de timina).

45 De acuerdo con la presente invención, "sonda de ácido nucleico" es un oligonucleótido, ácido nucleico o fragmento de los mismos que se hibrida específicamente con una secuencia diana de una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, el gRNA de un CSFV o un cDNA o productos de multiplicación del mismo. De este modo, de acuerdo con la presente invención, una sonda de ácido nucleico es un oligonucleótido, ácido nucleico o fragmento de los mismos que es sustancialmente complementario de una secuencia diana específica. Un ácido nucleico sustancialmente complementario puede tener una secuencia completamente complementaria de la secuencia diana. Sin embargo, también se pueden permitir desapareamientos de uno o más nucleótidos con tal de que la sonda de ácido nucleico pueda hibridarse específicamente con la(s) secuencia(s) diana bajo condiciones rigurosas. Por ejemplo, la sonda de
50 ácido nucleico de la presente invención incluye oligonucleótidos que tienen una identidad secuencial con respecto a la secuencia diana de al menos 70%, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, aún más preferiblemente al menos 95% de identidad secuencial (incluyendo, pero sin limitarse a, una identidad secuencial de al menos 96%, una identidad secuencial de al menos 97%, una identidad secuencial de al menos 98%, una identidad secuencial de al menos 99%, una identidad secuencial de al menos 99,5% y una identidad secuencial de
55 100%). Puede ser también deseable que una sonda de ácido nucleico se una a una diversidad de secuencias que difieren en uno o más nucleótidos. Un modo de enfrentarse a este problema es el uso de las llamadas sondas de ácido nucleico degeneradas. Las sondas de ácido nucleico degeneradas son mezclas de oligonucleótidos cuyas secuencias difieren en una o más posiciones. Los oligonucleótidos de las sondas de ácido nucleico degeneradas

pueden diferir en cuanto a su longitud o pueden tener todos la misma longitud. En una realización de la presente invención, la sonda de ácido nucleico es una sonda de ácido nucleico degenerada y se hibrida con regiones NS5A de esencialmente todos los genomas de virus de la peste porcina clásica (CSFV).

5 En una realización de la presente invención, las sondas de ácido nucleico (para CSFV así como para ácidos nucleicos de referencia) tienen una longitud de 7 a 40 nucleótidos, preferiblemente de 12 a 30 nucleótidos, más preferiblemente de 15 a 20 nucleótidos; aún más preferiblemente, la sonda de ácido nucleico tiene una longitud de 16 nucleótidos.

10 En otra realización, la sonda de ácido nucleico se hibrida con un ácido nucleico que tiene una identidad secuencial de al menos 70% con respecto a la secuencia de los nucleótidos 8423 a 9913 según la ID. SEC. nº 1, preferiblemente una identidad secuencial de al menos 80%, más preferiblemente una identidad secuencial de al menos 90%, aún más preferiblemente una identidad secuencial de al menos 95% (incluyendo, pero sin limitarse a, una identidad secuencial de al menos 96%, una identidad secuencial de al menos 97%, una identidad secuencial de al menos 98%, una identidad secuencial de al menos 99%, una identidad secuencial de al menos 99,5% y una identidad secuencial de 100%).

15 En una realización preferida, la sonda de ácido nucleico se hibrida con un ácido nucleico que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las ID. SEC. números 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 y 41 (véase la Figura 2). En otra realización, la sonda de ácido nucleico se hibrida con un ácido nucleico que tiene cualquiera de las secuencias de acuerdo con las ID. SEC. números 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 y 41.

20 En otra realización, la sonda de ácido nucleico se hibrida con un ácido nucleico que tiene una identidad secuencial de al menos 70% con respecto a la secuencia de los nucleótidos 9400 a 9505 según la ID. SEC. nº 1, preferiblemente una identidad secuencial de al menos 80%, más preferiblemente una identidad secuencial de al menos 90%, aún más preferiblemente una identidad secuencial de al menos 95% (incluyendo, pero sin limitarse a, una identidad secuencial de al menos 96%, una identidad secuencial de al menos 97%, una identidad secuencial de al menos 98%, una identidad secuencial de al menos 99%, una identidad secuencial de al menos 99,5% y una identidad secuencial de 100%).

25 En otra realización, la sonda de ácido nucleico se hibrida con un ácido nucleico que tiene una identidad secuencial de al menos 70% con respecto a la secuencia de los nucleótidos 9440 a 9469 según la ID. SEC. nº 1, preferiblemente una identidad secuencial de al menos 80%, más preferiblemente una identidad secuencial de al menos 90%, aún más preferiblemente una identidad secuencial de al menos 95% (incluyendo, pero sin limitarse a, una identidad secuencial de al menos 96%, una identidad secuencial de al menos 97%, una identidad secuencial de al menos 98%, una identidad secuencial de al menos 99%, una identidad secuencial de al menos 99,5% y una identidad secuencial de 100%).

30 En otra realización, la sonda de ácido nucleico se hibrida con un ácido nucleico que tiene una identidad secuencial de al menos 70% con respecto a la secuencia de los nucleótidos 9447 a 9462 según la ID. SEC. nº 1, preferiblemente una identidad secuencial de al menos 80%, más preferiblemente una identidad secuencial de al menos 90%, aún más preferiblemente una identidad secuencial de al menos 95% (incluyendo, pero sin limitarse a, una identidad secuencial de al menos 96%, una identidad secuencial de al menos 97%, una identidad secuencial de al menos 98%, una identidad secuencial de al menos 99%, una identidad secuencial de al menos 99,5% y una identidad secuencial de 100%).

35 En una realización de la presente invención, la sonda de ácido nucleico tiene entre 16 y 40 nucleótidos y comprende la secuencia de acuerdo con la ID. SEC. nº 2.

40 Como se esbozó anteriormente, podría ser deseable que se detectara específicamente el virus de la peste porcina clásica (CSFV). De este modo, en una realización de la presente invención, la sonda de ácido nucleico no se hibrida con un virus de la diarrea vírica bovina (BVDV) y no se hibrida con un virus de la enfermedad de la frontera (BDV) bajo condiciones rigurosas.

45 La hibridación de una sonda de ácido nucleico con DNA o RNA de una muestra es una indicación de la presencia del DNA o RNA pertinente en la muestra. Las condiciones de hibridación son conocidas por quienes tienen experiencia en la técnica y se pueden hallar en "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 6.3.1-6.3.6, 1991. En una realización de la presente invención, la sonda de ácido nucleico se hibrida con la región NS5A de al menos un virus de la peste porcina clásica (CSFV) pero no con ácidos nucleicos de BVDV y BDV ni con ácidos nucleicos complementarios de los mismos bajo condiciones rigurosas. Las condiciones rigurosas se definen como equivalentes a una hibridación en cloruro sódico/citrato sódico (SSC) 6X a 45 °C, seguida de un lavado en SSC 0,2 X, SDS al 0,1%, a 65 °C.

En una realización preferida, la sonda de ácido nucleico no se hibrida con un virus de la diarrea vírica bovina (BVDV) y no se hibrida con un virus de la enfermedad de la frontera (BDV). El técnico experto reconocerá que es deseable que la sonda de ácido nucleico no se hibride con BVDV ni BDV bajo condiciones rigurosas. Sin embargo, el técnico experto es consciente del hecho de que bajo ciertas circunstancias se puede producir una hibridación inespecífica de ácidos nucleicos bajo condiciones no rigurosas y/o a causa de una elevada concentración de ácidos nucleicos diana "inespecíficos". Por lo tanto, la sonda de ácido nucleico de acuerdo con la invención se podría hibridar inespecíficamente con el ácido nucleico de BVDV o BDV bajo condiciones desfavorables, por ejemplo, elevadas concentraciones de ácidos nucleicos de BVDV y/o BDV como las que se podrían encontrar, por ejemplo, bajo condiciones de cultivo celular. No obstante, la sonda de ácido nucleico de acuerdo con la invención no se hibrida con ácidos nucleicos de BVDV ni BDV bajo las condiciones del método de acuerdo con la invención, es decir, con concentraciones de ácidos nucleicos de BVDV y/o BDV como las que se encuentran en muestras de sujetos o con concentraciones de ácidos nucleicos de BVDV y/o BDV como las que se encuentran después de la multiplicación de la región NS5A de un CSFV, o fragmentos de la misma, con cebadores específicos para multiplicación de CSFV de acuerdo con la presente invención.

Se incluyen además moléculas que remedan ácido nucleico conocidas en la técnica, tales como derivados sintéticos o semisintéticos de DNA o RNA y polímeros mixtos, de cadenas tanto sentido como antisentido. Pueden contener bases nucleotídicas artificiales o derivatizadas adicionales, como apreciarán rápidamente los expertos en la técnica. Dichas moléculas que remedan ácido nucleico o dichos derivados de ácido nucleico de acuerdo con la invención incluyen ácido nucleico peptídico, ácido nucleico de fosforotioato, ácido nucleico de fosforamidato, ácido 2'-O-metoxietil-ribonucleico, ácido nucleico de morfolino, ácido nucleico de hexitol (HNA; del inglés, *hexitol nucleic acid*), productos de conjugación de oligodesoxinucleótidos con ligandos 3' del surco menor (MGB-ODN; del inglés, *3'-minor groove binder oligodeoxynucleotide*), y ácido nucleico bloqueado (LNA; del inglés, *locked nucleic acid*) [véanse, por ejemplo, Braasch y Corey, *Chemistry & Biology* 8, 1-7 (2001); y Kutuyavin, Afonina, Mills et al., *Nucleic Acids Research* 28 (2), 655-661 (2000)]. El LNA es un derivado de RNA en que el anillo de ribosa está forzado por un enlace metilénico entre el oxígeno 2' y el carbono 4'.

En una realización de la presente invención, la sonda de ácido nucleico comprende al menos una modificación para aumentar la estabilidad del híbrido de sonda-diana. Dichas modificaciones son conocidas por los expertos en la técnica. En una realización de la presente invención, los oligonucleótidos de la sonda de ácido nucleico comprenden al menos una modificación seleccionada del grupo que consiste en ácidos nucleicos bloqueados (LNA), ácido nucleico peptídico (PNA) y ligando 3' del surco menor (MGB).

Para los fines de la presente invención, un ácido nucleico peptídico (PNA) es un tipo poliamídico de compuesto análogo de DNA con una cadena principal amídica en lugar de la cadena principal de azúcar-fosfato del DNA. Como consecuencia, ciertos componentes del DNA, tales como el fósforo, óxidos de fósforo o derivados de desoxirribosa, no están presentes en los PNAs. Como describen Nielsen et al., *Science* 254: 1497 (1991), y Egholm et al., *Nature* 365: 666 (1993), los PNAs se unen específica y fuertemente a cadenas de DNA complementarias y no son degradados por nucleasas. Además, son estables bajo condiciones ácidas y resistentes a las proteasas [Demidov et al. (1994), *Biochem. Pharmacol.* 48, 1310-1313]. Su cadena principal electrostáticamente neutra aumenta la fuerza de unión a DNA complementario en comparación con la estabilidad del correspondiente dúplex de DNA-DNA [Wittung et al. (1994), *Nature* 368, 561-563; Ray y Norden (2000), *Faseb J.* 14, 1041-1060].

Para los fines de la presente invención, los nucleósidos de ácido nucleico bloqueado (LNA) son una clase de compuestos análogos de ácido nucleico en que el anillo de ribosa está "bloqueado" por un puente metilénico que conecta el átomo de 2'-O y el átomo de 4'-C. Los nucleósidos de LNA contienen las nucleobases comunes (T, C, G, A, U y mC) y son capaces de formar pares de bases de acuerdo con las reglas estándares de apareamiento de bases de Watson-Crick. Por lo tanto, cuando se incorpora a un oligonucleótido de DNA, el LNA se hibrida más rápidamente con una cadena nucleotídica complementaria y aumenta la estabilidad del dúplex resultante. Como resultado, la temperatura de fusión (T_m) del dúplex puede aumentar hasta 8 °C por sustitución de monómero de LNA [véase, por ejemplo, M. Peterson y J. Wengel (2003), "LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics", *Trends Biotechnol.* 21, 74-81].

Para los fines de la presente invención, una sonda de ligando 3' del surco menor es una sonda de ácido nucleico que se une covalentemente a un producto de conjugación de unión al surco menor por el extremo 3' de dicha sonda de ácido nucleico. Los productos de conjugación de unión al surco menor son bien conocidos por los expertos en la técnica [véase, por ejemplo, Kutuyavin, Afonina, Mills et al., *Nucleic Acids Research* 28 (2), 655-661 (2000)]. Pueden ser seleccionados de entre, por ejemplo, DPI₃ y CDPI₃. Además, será fácilmente reconocido por los expertos en la técnica que los productos de conjugación de unión al surco menor se pueden unir directamente al extremo 3' de la sonda de ácido nucleico o se pueden unir indirectamente al extremo 3' de la sonda de ácido nucleico a través de un conector. Dichos conectores son bien conocidos por el técnico experto [véase, por ejemplo, Kutuyavin, Afonina, Mills et al., *Nucleic Acids Research* 28 (2), 655-661 (2000)]. Son ejemplos de dichos conectores los conectores de aminopropilo y de alquilamina. En una realización, el producto de conjugación de unión al surco menor se une al surco menor formado por los de 5 a 6 pares de bases 3'-terminales del dúplex de sonda de ácido nucleico/sonda de

ácido nucleico diana.

En realidad, el PNA, el LNA o el MGB-sondas de ácido nucleico se unen más fuertemente al DNA que el propio DNA. A causa de esto, los dúplex de PNA/DNA, LNA/DNA y MGB-sondas de ácido nucleico/DNA se unen bajo una mayor variedad de condiciones de rigor que los dúplex de DNA/DNA, lo que hace más sencillo llevar a cabo una hibridación multiplex. Se pueden emplear sondas más pequeñas que con el DNA a causa de la fuerte unión. Además, es más probable que se puedan determinar desapareamientos de una sola base con la hibridación de PNA/DNA, LNA/DNA y MGB-sondas de ácido nucleico/DNA porque un solo desapareamiento en 15 monómeros de PNA/DNA, LNA/DNA y MGB-sondas de ácido nucleico/DNA reduce el punto de fusión (T_m) en 8-20 °C frente a los 4-16 °C en el caso del dúplex de 15 monómeros de DNA/DNA. Por ello está aumentada la estabilidad del híbrido de sonda-diana. Esto también mejora la discriminación entre desapareamientos y apareamientos perfectos. El PNA, el LNA y el MGB-sondas de ácido nucleico también permiten la hibridación de muestras de DNA en condiciones de bajo contenido de sal o de ausencia de sal. Como consecuencia, el DNA diana tiene menos estructuras secundarias bajo las condiciones de hibridación y es más accesible a las moléculas de sonda.

En una realización, la sonda de ácido nucleico comprende al menos 4 modificaciones para aumentar la estabilidad del híbrido de sonda-diana, más preferiblemente al menos 5, aún más preferiblemente 7.

En una realización, la sonda de ácido nucleico tiene la secuencia de ID. SEC. nº 2. En otra realización, la sonda de ácido nucleico tiene la secuencia de ID. SEC. nº 2 y tiene 7 LNAs. En otra realización, la sonda de ácido nucleico comprende al menos 4 modificaciones para aumentar la estabilidad del híbrido de sonda-diana, en donde dichas modificaciones son en cuatro posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 2, 4, 7, 9, 11, 13 y 15 de la ID. SEC. nº 2. En aún otra realización, la sonda de ácido nucleico comprende al menos 5 modificaciones para aumentar la estabilidad del híbrido de sonda-diana, en donde dichas modificaciones son en cinco posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 2, 4, 7, 9, 11, 13 y 15 de la ID. SEC. nº 2. En una más preferida, el ácido nucleico tiene la secuencia de acuerdo con la ID. SEC. nº 2 y tiene LNAs en las posiciones 2, 4, 7, 9, 11, 13 y 15.

En algunos casos, la concentración del virus de la peste porcina clásica (CSFV) presente en un sujeto puede estar por debajo de niveles detectables. En tal caso, es deseable multiplicar el genoma de al menos un virus de la peste porcina clásica (CSFV) o fragmentos del mismo. De esta manera, en una realización de la presente invención, antes de la detección de la región NS5A del al menos un genoma del virus de la peste porcina clásica (CSFV), se multiplica dicho genoma del al menos un virus de la peste porcina clásica (CSFV) o partes del mismo. El técnico experto reconocerá inequívocamente que la región que ha de ser detectada debe ser parte de la parte multiplicada del al menos un genoma del virus de la peste porcina clásica (CSFV); es decir, la región con la que se hibrida específicamente la sonda de ácido nucleico ha de ser parte de la región multiplicada.

La multiplicación de ácido nucleico puede ser llevada a cabo mediante cualquiera de los diversos métodos de multiplicación de ácido nucleico conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR; del inglés, *ligase chain reaction*) [tal como en Landegren et al., "A Ligase-Mediated Gene Detection Technique", *Science* 241: 1077-1080, 1988, o en Wiedmann et al., "Ligase Chain Reaction (LCR)--Overview and Applications", *PCR Methods and Applications* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1994, páginas S51-S64)], el sistema de multiplicación basado en transcripción (TAS; del inglés, *transcription-based amplification system*), la multiplicación basada en secuencias de ácido nucleico (NASBA; del inglés, *nucleic acid sequence based amplification*), la multiplicación por círculo rodante (RCA; del inglés, *rolling circle amplification*), la multiplicación mediada por transcripción (TMA; del inglés, *transcription-mediated amplification*), la replicación de secuencias autosostenida (3SR), la multiplicación isotérmica [tal como en Walker et al., "Strand displacement amplification--an isothermal, in vitro DNA amplification technique", *Nucleic Acids Res.* 20 (7): 1691-6 (1992)] y la multiplicación Q β . Se prefiere la multiplicación mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

En una realización de la presente invención, se multiplica la región NS5A del genoma de al menos un virus de la peste porcina clásica (CSFV) o fragmentos de la misma antes de la detección.

En una realización, el producto de multiplicación comprende al menos una secuencia que tiene una identidad secuencial de al menos 70% con respecto a la región de los nucleótidos 9447 a 9462 según la ID. SEC. nº 1; preferiblemente la región tiene una identidad secuencial superior a 80%, más preferiblemente superior a 90%, aún más preferiblemente superior a 95% (incluyendo, pero sin limitarse a, una identidad secuencial superior a 96%, superior a 97%, superior a 98%, superior a 99%, superior a 99,5%, y de 100%). En una realización preferida, la región multiplicada comprende al menos la secuencia según la ID. SEC. nº 2.

En una realización preferida, el producto de multiplicación tiene una identidad secuencial de al menos 70% con respecto a los nucleótidos 8423 a 9913 según la ID. SEC. nº 1; preferiblemente dicha región tiene una identidad secuencial de al menos 80% con respecto a los nucleótidos 9400 a 9505 según la ID. SEC. nº 1, más preferiblemente una identidad secuencial de al menos 90%, aún más preferiblemente una identidad secuencial de al

ES 2 521 018 T3

menos 95% (incluyendo, pero sin limitarse a, una identidad secuencial de al menos 96%, una identidad secuencial de al menos 97%, una identidad secuencial de al menos 98%, una identidad secuencial de al menos 99%, una identidad secuencial de al menos 99,5% y una identidad secuencial de 100%).

5 En otra realización, el producto de multiplicación tiene una identidad secuencial de al menos 70% con respecto a los nucleótidos 9388 a 9507 según la ID. SEC. nº 1, preferiblemente una identidad secuencial de al menos 80% con respecto a los nucleótidos 9400 a 9505 según la ID. SEC. nº 1, más preferiblemente una identidad secuencial de al menos 90%, aún más preferiblemente una identidad secuencial de al menos 95% (incluyendo, pero sin limitarse a, una identidad secuencial de al menos 96%, una identidad secuencial de al menos 97%, una identidad secuencial de al menos 98%, una identidad secuencial de al menos 99%, una identidad secuencial de al menos 99,5% y una
10 identidad secuencial de 100%).

En una realización preferida más, el producto de multiplicación tiene una identidad secuencial de al menos 70% con respecto a los nucleótidos 9400 a 9505 según la ID. SEC. nº 1; preferiblemente dicha región tiene una identidad secuencial de al menos 80% con respecto a los nucleótidos 9400 a 9505 según la ID. SEC. nº 1, más preferiblemente una identidad secuencial de al menos 90%, aún más preferiblemente una identidad secuencial de al menos 95% (incluyendo, pero sin limitarse a, una identidad secuencial de al menos 96%, una identidad secuencial de al menos 97%, una identidad secuencial de al menos 98%, una identidad secuencial de al menos 99%, una
15 identidad secuencial de al menos 99,5% y una identidad secuencial de 100%).

En una realización preferida más, al menos una de las regiones seleccionadas del grupo de secuencias que consiste en las ID. SEC. números 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 y 41 es multiplicada antes de la detección. En otra realización, al menos una región multiplicada comprende al menos una secuencia seleccionada del grupo de secuencias de los nucleótidos 13 a 118 de cualesquiera de las secuencias de acuerdo con las ID. SEC. números 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 y 40, y los nucleótidos 1 a 107 de la ID. SEC. nº 41.
20

25 En una realización, el producto de multiplicación tiene una longitud de 20 a 1500 nucleótidos, preferiblemente de 40 a 1000 nucleótidos, más preferiblemente de 50 a 500 nucleótidos, aún más preferiblemente de 80 a 150 nucleótidos; lo más preferiblemente, el producto de multiplicación tiene una longitud de 90 a 120 nucleótidos.

La persona experta en la técnica sabe cómo diseñar y fabricar cebadores adecuados para una multiplicación como la anteriormente esbozada, es decir, cebadores oligonucleotídicos. Se pueden preparar cebadores oligonucleotídicos usando cualquier método adecuado, tal como, por ejemplo, los métodos del fosfotriéster y el fosfodiéster o realizaciones automatizadas de los mismos. En una de dichas realizaciones automatizadas se usan dietilfosforamiditas como materiales de partida, que se pueden sintetizar del modo descrito por Beaucage et al., Tetrahedron Letters 22: 1859-1862 (1981). En la Patente de EE.UU. nº 4.458.006 se describe un método para sintetizar oligonucleótidos sobre un soporte sólido modificado. También es posible usar un cebador que haya sido aislado de una fuente biológica (tal como una digestión con endonucleasas de restricción).
30
35

En una realización más, el al menos un cebador para multiplicación de CSFV es adecuado para multiplicar una región de un genoma del virus de la peste porcina clásica (CSFV), en donde el producto de multiplicación tiene una identidad secuencial de al menos 70% con respecto a cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en los nucleótidos 8423 a 9913 de acuerdo con la ID. SEC. nº 1, los nucleótidos 9388 a 9507 de acuerdo con la ID. SEC. nº 1, los nucleótidos 9400 a 9505 de acuerdo con la ID. SEC. nº 1, y los nucleótidos 9447 a 9462 de acuerdo con la ID. SEC. nº 1. Preferiblemente, dicho ácido nucleico tiene una identidad secuencial de al menos 80% con respecto a cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en los nucleótidos 8423 a 9913 de acuerdo con la ID. SEC. nº 1, los nucleótidos 9388 a 9507 de acuerdo con la ID. SEC. nº 1, los nucleótidos 9400 a 9505 de acuerdo con la ID. SEC. nº 1, y los nucleótidos 9447 a 9462 de acuerdo con la ID. SEC. nº 1, más preferiblemente una identidad secuencial de al menos 90%, aún más preferiblemente una identidad secuencial de al menos 95% (incluyendo, pero sin limitarse a, una identidad secuencial de al menos 96%, de al menos 97%, de al menos 98%, de al menos 99%, de al menos 99,5%, y de 100%).
40
45

Los cebadores para multiplicación preferidos tienen una longitud de aproximadamente 15-100, más preferiblemente de aproximadamente 20-50, lo más preferiblemente de aproximadamente 20-40, bases. También hay que tener en cuenta la posibilidad de diseñar un cebador degenerado con objeto de permitir la hibridación del cebador con una diversidad de secuencias que difieren en una o más posiciones. El técnico experto reconoce fácilmente que en el método de acuerdo con la presente invención se pueden usar cualesquier cebadores que sean adecuados para la multiplicación de fragmentos del genoma de un virus de la peste porcina clásica (CSFV) del modo anteriormente esbozado.
50

55 En una realización preferida, los cebadores para multiplicación (cebador para multiplicación de CSFV) comprenden un extremo 3' que consiste en al menos los 6 últimos nucleótidos de acuerdo con la secuencia de ID. SEC. nº 3 o ID. SEC. nº 4, respectivamente, preferiblemente en al menos los 8 últimos nucleótidos, más preferiblemente en al

menos los 10 últimos nucleótidos. En una realización preferida más, los extremos 3' de los al menos dos cebadores para multiplicación de CSFV consisten en la secuencia de acuerdo con la secuencia de ID. SEC. nº 3 o ID. SEC. nº 4, respectivamente. En aún otra realización preferida, los al menos dos cebadores para multiplicación de CSFV tienen la secuencia de acuerdo con la ID. SEC. nº 3 o la ID. SEC. nº 4, respectivamente. Sin embargo, en una realización no restrictiva de la presente invención, la multiplicación se lleva a cabo usando cebadores para multiplicación que tienen las secuencias de ID. SEC. nº 3 e ID. SEC. nº 4.

En ciertos casos podría ser necesario no sólo determinar la presencia de un virus de la peste porcina clásica (CSFV) sino verificar también el aislamiento del ácido nucleico de la muestra o determinar la cantidad relativa de virus de la peste porcina clásica (CSFV) en un sujeto o una muestra de un sujeto, respectivamente. Para un diagnóstico rutinario es de suma importancia la integración de testigos que permitan verificar la operación de aislamiento de RNA así como la RT-PCR. En 2005 se describió un ensayo de RT-PCR multiplex en tiempo real con un testigo interno heterólogo [B. Hoffmann, K. Depner, H. Schirrmeyer y M. Beer, 2006, "A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. J. Virol. Methods 136 (1-2), 200-209]. Sin embargo, para analizar el estado de la muestra, se prefiere la multiplicación de ácidos nucleicos procedentes de testigos internos, por ejemplo, genes domésticos. Por lo tanto, en una realización preferida de la presente invención se incluyen ácidos nucleicos de referencia. Dicho ácido nucleico de referencia puede ser añadido externamente, o ácidos nucleicos contenidos en la muestra del sujeto pueden servir como un ácido nucleico de referencia. En el último caso se prefieren ácidos nucleicos de los llamados genes domésticos ya que es más probable que sean abundantes por todas las muestras y se expresen de forma sustancialmente constante, y, por lo tanto, son bien adecuados como ácidos nucleicos de referencia. Puesto que el genoma de los virus de la peste porcina clásica (CSFV) consiste en RNA, los ácidos nucleicos de referencia consisten preferiblemente en RNA, por ejemplo, mRNA de dichos genes domésticos. No obstante, el ácido nucleico de referencia puede consistir también en DNA o en cualquier otro ácido nucleico como el anteriormente esbozado. En otra realización, el ácido nucleico de referencia consiste en RNA y es inversamente transcrito a cDNA. En una realización preferida, el ácido nucleico de referencia es un mRNA de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en β -actina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), rRNA 18S y β -2-microglobulina. En una realización preferida más de la presente invención, dicho ácido nucleico de referencia es el mRNA de β -actina (ID. SEC. nº 42).

Para la detección del ácido nucleico de referencia podrían ser necesarios sondas de ácido nucleico de referencia y/o cebadores para multiplicación de referencia. El técnico experto sabe cómo diseñar cebadores y/o sondas adecuados. Diferentes regiones del ácido nucleico de referencia pueden servir para la detección, y los expertos en la técnica pueden diseñar los respectivos cebadores para multiplicación de referencia y/o sondas de ácido nucleico de referencia. En una realización preferida, se determina el mRNA de β -actina usando los cebadores para multiplicación de referencia, cebadores para multiplicación de referencia que comprenden extremos 3' que consisten en al menos los 6 últimos nucleótidos de las secuencias de acuerdo con la ID. SEC. nº 5 y la ID. SEC. nº 6, respectivamente. En una realización preferida, los cebadores para multiplicación de referencia tienen extremos 3' que consisten en las secuencias de acuerdo con la ID. SEC. nº 5 y la ID. SEC. nº 6, respectivamente. En una realización, la sonda de ácido nucleico de referencia comprende la secuencia de acuerdo con la ID. SEC. nº 7 y tiene una longitud de entre 5 y 40 nucleótidos. En una realización preferida, la sonda de ácido nucleico de referencia tiene la secuencia de acuerdo con la ID. SEC. nº 7.

En una realización más, la sonda de ácido nucleico y/o uno o más cebadores para multiplicación de CSFV y/o sondas de ácido nucleico de referencia y/o cebadores para multiplicación de referencia pueden ser etiquetados con colorantes fluorescentes. En el contexto de la presente invención, los colorantes fluorescentes pueden ser, por ejemplo, FAM (5- o 6-carboxifluoresceína), VIC, NED, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC; del inglés, fluorescein isothiocyanate), IRD-700/800, colorantes de cianina, también como CY3, CY5, CY3.5, CY5.5, Cy7, xanteno, 6-carboxi-2',4',7',4,7-hexaclorofluoresceína (HEX), TET, 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE), N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 5-carboxirrodamina-6G (R6G5), 6-carboxirrodamina-6G (RG6), rodamina, Verde Rodamina, Rojo Rodamina, Rodamina 110, colorantes BODIPY, tal como BODIPY TMR, Verde Oregon, cumarinas tales como umbeliferona, benzimidazoles tales como Hoechst 33258, fenantridinas tales como Rojo Texas, Amarillo Yakima, Alexa Fluor, PET, bromuro de etidio, colorantes de acridinio, colorantes de carbazol, colorantes de fenoxazina, colorantes de porfirina, colorantes de polimetina, y similares.

Los expertos en la técnica conocen diferentes métodos para la multiplicación y/o detección de ácidos nucleicos. Se puede aplicar cualquier método mediante el cual se puedan detectar específicamente ácidos nucleicos, es decir, detectar secuencias específicas en dicho ácido nucleico. En una realización preferida de la presente invención, la detección y/o multiplicación de la región NS5A y/o el ácido nucleico de referencia se llevan a cabo mediante uno o más de los métodos seleccionados de un grupo que consiste en secuenciación (incluyendo el método de Sanger, la secuenciación aleatoria y la pirosecuenciación), hibridación *in situ*, transferencia Northern, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR cuantitativa (qPCR), PCR en tiempo real, PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR), RT-PCR en tiempo real, y análisis con micromatrices).

La PCR en tiempo real es un método para multiplicar y cuantificar simultáneamente ácidos nucleicos usando una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR con transcripción inversa (RT-PCR) en tiempo real es un método de PCR en tiempo real que comprende además una transcripción inversa de RNA en DNA, por ejemplo, de mRNA en cDNA. En métodos de qPCR, el ácido nucleico multiplicado es cuantificado conforme se acumula. Típicamente, para la detección y/o cuantificación en métodos basados en PCR se usan colorantes fluorescentes que se interponen en el DNA de doble cadena (por ejemplo, bromuro de etidio o SYBR[®] Green I) o sondas de ácido nucleico etiquetadas ("sondas informadoras") que emiten fluorescencia cuando se hibridan con un ácido nucleico complementario (por ejemplo, el DNA que se acumula). Particularmente, como sondas informadoras se pueden usar cebadores fluorogénicos, sondas de hibridación [por ejemplo, sondas LightCycler (Roche)], sondas de hidrólisis [por ejemplo, sondas TaqMan (Roche)], o sondas en horquilla, tales como balizas moleculares, cebadores Scorpion (DxS), cebadores Sunrise (Oncor), cebadores LUX (Invitrogen), cebadores Amplifluor (Intergen) o similares. De acuerdo con la presente invención, los cebadores o sondas fluorogénicos pueden ser, por ejemplo, cebadores o sondas a los que se han fijado, por ejemplo, se han fijado covalentemente, colorantes de fluorescencia. Dichos colorantes de fluorescencia pueden ser, por ejemplo, FAM (5-o 6-carboxifluoresceína), VIC, NED, fluoresceína, FITC, IRD-700/800, CY3, CY5, CY3.5, CY5.5, HEX, TET, TAMRA, JOE, ROX, BODIPY TMR, Verde Oregon, Verde Rodamina, Rojo Rodamina, Rojo Texas, Amarillo Yakima, Alexa Fluor, PET Biosearch Blue[™], Marina Blue[®], Bothell Blue[®], CAL Fluor[®] Gold, CAL Fluor[®] Red 610, Quasar[™] 670, LightCycler Red640[®], Quasar[™] 705, LightCycler Red705[®] y similares. Sondas informadoras particulares pueden comprender además supresores de la fluorescencia.

En realizaciones particulares de la invención, la polimerasa utilizada para los métodos basados en PCR es una polimerasa de un organismo termófilo o una polimerasa termoestable o es seleccionada del grupo que consiste en DNA polimerasa de *Thermus thermophilus* (Tth), DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq), DNA polimerasa de *Thermotoga maritima* (Tma), DNA polimerasa de *Thermococcus litoralis* (Tli), DNA polimerasa de *Pyrococcus furiosus* (Pfu), DNA polimerasa de *Pyrococcus woesei* (Pwo), DNA polimerasa de *Pyrococcus kodakaraensis* (KOD), DNA polimerasa de *Thermus filiformis* (Tfi), DNA polimerasa de *Sulfolobus solfataricus* (Dpo4), DNA polimerasa de *Thermus pacificus* (Tpac), DNA polimerasa de *Thermus eggertssonii* (Teg), DNA polimerasa de *Thermus brockianus* (Tbr) y DNA polimerasa de *Thermus flavus* (Tfl).

El huésped para el virus de la peste porcina clásica (CSFV) es el cerdo. Sin embargo, podría ser necesario determinar la presencia del virus en cualquier otra especie, por ejemplo, en seres humanos que entran en contacto con cerdos. Por lo tanto, en una realización, el sujeto de acuerdo con la presente invención es un mamífero, por ejemplo, un ser humano, una vaca, un gato, un perro, un caballo o un cerdo. En una realización preferida, el sujeto es un cerdo.

La presente invención se refiere además a un kit para determinar la presencia de un virus de la peste porcina clásica (CSFV) en un sujeto, que comprende:

- una sonda de ácido nucleico que es capaz de hibridarse con la región NS5A de un virus de la peste porcina clásica (CSFV) o partes de la misma y/o con un ácido nucleico complementario de la región NS5A del virus de la peste porcina clásica (CSFV) o partes de la misma y/o al menos un cebador para la secuenciación de la región NS5A del al menos un virus de la peste porcina clásica (CSFV) o partes de la misma.

Opcionalmente, el kit puede comprender además al menos un cebador para la multiplicación del genoma de un virus de la peste porcina clásica (cebador para la multiplicación de CSFV). En una realización preferida, el kit comprende al menos un cebador para la multiplicación de CSFV, para la multiplicación del genoma de un CSFV o partes del mismo. Adicional y opcionalmente, el kit puede comprender sondas de ácido nucleico de referencia y cebadores para multiplicación de referencia de acuerdo con la presente invención.

La sonda de ácido nucleico, el cebador para la multiplicación de CSFV, las sondas de ácido nucleico de referencia y los cebadores para multiplicación de referencia del kit tienen las mismas materializaciones y características que las esbozadas anteriormente en esta memoria.

En una realización, el kit es un kit para llevar a cabo una RT-PCR en tiempo real. De este modo, en esta realización, el kit de acuerdo con la presente invención comprende además reactivos para llevar a cabo una RT-PCR en tiempo real. Dichos reactivos incluyen tampones, dNTPs y enzimas (tales como polimerasas) para llevar a cabo la RT-PCR en tiempo real. El técnico experto está al tanto de los reactivos necesarios para llevar a cabo la RT-PCR en tiempo real.

El término "polimerasa" se refiere a una enzima que sintetiza cadenas de ácido nucleico (por ejemplo, RNA o DNA) a partir de ribonucleósidos-trifosfato o desoxinucleósidos-trifosfato.

Una diversidad de polipéptidos que tienen actividad polimerasa es útil de acuerdo con la presente invención. Entre estos polipéptidos se incluyen enzimas tales como ácido nucleico polimerasas (incluyendo DNA polimerasas y RNA polimerasas). Dichas polimerasas incluyen, pero no se limitan a, DNA polimerasa de *Thermus thermophilus* (Tth), DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq), DNA polimerasa de *Thermotoga neopolitana* (Tne), DNA polimerasa

de *Thermotoga maritima* (Tma), DNA polimerasa de *Thermococcus litoralis* (Tli o VENT™), DNA polimerasa de *Pyrococcus furiosus* (Pfu), DNA polimerasa DEEPVENT™, DNA polimerasa de *Pyrococcus woosii* (Pwo), DNA polimerasa de *Pyrococcus sp* KDD2 (KOD), DNA polimerasa de *Bacillus sterothermophilus* (Bst), DNA polimerasa de *Bacillus caldophilus* (Bca), DNA polimerasa de *Sulfolobus acidocaldarius* (Sac), DNA polimerasa de *Thermus eggertssonii* (Teg), DNA polimerasa de *Thermoplasma acidophilum* (Tac), DNA polimerasa de *Thermus flavus* (Tfl/Tub), DNA polimerasa de *Thermus ruber* (Tru), DNA polimerasa de *Thermus brockianus* (DYNAZYME), DNA polimerasa de *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Mth), DNA polimerasa de micobacteria (Mtb, Mlep), y mutantes, variantes y derivados de las mismas. De acuerdo con la invención también se pueden emplear RNA polimerasas tales como T3, T5 y SP6 y mutantes, variantes y derivados de las mismas.

Las ácido nucleico polimerasas utilizadas en la presente invención pueden ser mesófilas o termófilas y son preferiblemente termófilas. Las DNA polimerasas mesófilas preferidas incluyen DNA polimerasa de T7, DNA polimerasa de T5, el fragmento de Klenow de DNA polimerasa, DNA polimerasa III y similares. Las DNA polimerasas termoestables preferidas que se pueden utilizar en los métodos y kits de la invención incluyen las DNA polimerasas Teg, Taq, Tne, Tma, Pfu, Tfl, Tth, fragmento Stoffel, VENT™ y DEEPVENT™, y mutantes, variantes y derivados de las mismas [Patente de EE.UU. nº 5.436.149; Patente de EE.UU. nº 4.889.818; Patente de EE.UU. nº 4.965.188; Patente de EE.UU. nº 5.079.352; Patente de EE.UU. nº 5.614.365; Patente de EE.UU. nº 5.374.553; Patente de EE.UU. nº 5.270.179; Patente de EE.UU. nº 5.047.342; Patente de EE.UU. nº 5.512.462; Documento WO 92/06188; Documento WO 92/06200; Documento WO 96/10640; W. M. Barnes, *Gene* 112: 29-35 (1992); F. C. Lawyer *et al.*, *PCR Meth. Appl.* 2: 275-287 (1993); J.-M. Flaman *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 22 (15): 3259-3260 (1994)]. Los ejemplos de DNA polimerasas que carecen sustancialmente de actividad 3'-exonucleasa incluyen, pero no se limitan a, las DNA polimerasas Taq, Tne^{exo-}, Tma^{exo-}, Pfu^{exo-}, Pwo^{exo-} y Tth, y mutantes, variantes y derivados de las mismas.

Los polipéptidos que tienen actividad transcriptasa inversa para uso en la invención incluyen cualquier polipéptido que tenga actividad transcriptasa inversa. Dichas enzimas incluyen, pero no se limitan a, transcriptasa inversa retroviral, transcriptasa inversa de retrotransposón, transcriptasa inversa del virus de la hepatitis B, transcriptasa inversa del virus del mosaico de la coliflor, transcriptasa inversa bacteriana, DNA polimerasa Tth, DNA polimerasa Taq [R. K. Saiki *et al.*, *Science* 239: 487-491 (1988); Patentes de EE.UU. números 4.889.818 y 4.965.188], DNA polimerasa Tne (Documento WO 96/10640), DNA polimerasa Tma (Patente de EE.UU. nº 5.374.553) y mutantes, variantes o derivados de las mismas (véanse, por ejemplo, las solicitudes de patente de EE.UU. en tramitación con la presente números de serie 08/706.702 y 08/706.706, de A. John Hughes y Deb K. Chattedee, ambas presentadas el 9 de septiembre de 1996, que se incorporan en sus totalidades en esta memoria por referencia). Las enzimas preferidas para uso en la invención incluyen aquellas que tienen una actividad RNasa H reducida o sustancialmente reducida. Por una enzima "con actividad RNasa H sustancialmente reducida" se quiere significar que la enzima tiene menos de aproximadamente el 20%, más preferiblemente menos de aproximadamente el 15%, el 10% o el 5%, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente el 2%, de la actividad RNasa H del correspondiente tipo silvestre o de enzimas RNasa H⁺ tales como las transcriptasas inversas del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV; del inglés, Moloney murine leukemia virus), el virus de la mieloblastosis aviar (AMV; del inglés, avian myeloblastosis virus) y el virus del sarcoma de Rous (RSV; del inglés, Rous sarcoma virus) de tipos silvestres. La actividad RNasa H de cualquier enzima puede ser determinada mediante una diversidad de ensayos, tales como los descritos, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. nº 5.244.797, en M. L. Kotewicz *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 16: 265 (1988), y en G. F. Gerard *et al.*, *FOCUS* 14 (5): 91 (1992), las descripciones de todos los cuales se incorporan en su totalidad en esta memoria por referencia. Dichos polipéptidos particularmente preferidos para uso en la invención incluyen, pero no se limitan a, la transcriptasa inversa H de M-MLV, la transcriptasa inversa H⁺ de RSV, la transcriptasa inversa H⁻ de AMV, la transcriptasa inversa H⁻ de virus asociado a Rous (RAV; del inglés, Rous-associated virus), la transcriptasa inversa H⁻ de virus asociado a mieloblastosis (MAV; del inglés, myeloblastosis-associated virus) y la transcriptasa inversa H⁻ de HIV. Sin embargo, quien tiene una experiencia ordinaria entenderá que cualquier enzima capaz de producir una molécula de DNA a partir de una molécula de ácido ribonucleico (es decir, una enzima que tiene actividad transcriptasa inversa) y que tenga una actividad RNasa H sustancialmente reducida puede ser equivalentemente empleada en las composiciones, métodos y kits de la invención.

Las DNA y RNA polimerasas para uso en la invención se pueden obtener comercialmente de, por ejemplo, QIAGEN (Hilden, Alemania), Life Technologies, Inc. (Rockville, Maryland, EE.UU.), New England BioLabs (Beverly, Massachusetts, EE.UU.) o ROCHE Biochemicals. Los polipéptidos que tienen actividad transcriptasa inversa para uso en la invención se pueden obtener comercialmente de, por ejemplo, QIAGEN (Hilden, Alemania), Life Technologies, Inc. (Rockville, Maryland, EE.UU.), Pharmacia (Piscataway, New Jersey, EE.UU.), Sigma (Saint Louis, Missouri, EE.UU.) o ROCHE (Penzberg, Alemania). Alternativamente, los polipéptidos que tienen actividad transcriptasa inversa pueden ser aislados de sus fuentes víricas o bacterianas naturales de acuerdo con procedimientos estándares para aislar y purificar proteínas naturales que son bien conocidos por quien tiene una experiencia ordinaria en la técnica [véase, por ejemplo, G. E. Houts *et al.*, *J. Virol.* 29: 517 (1979)]. Además, los polipéptidos que tienen actividad transcriptasa inversa pueden ser preparados mediante técnicas de DNA recombinante que resultan familiares a quien tiene una experiencia ordinaria en la técnica [véanse, por ejemplo, M. L. Kotewicz *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 16: 265 (1988); y D. A. Soltis y A. M. Skalka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3372-3376 (1988)].

Como se emplea en esta memoria, el término "dNTP" se refiere a desoxirribonucleósidos-trifosfato. dATP, dGTP, dCTP, dTTP y dUTP son ejemplos no restrictivos de tales dNTPs, que también pueden estar presentes en forma de derivados etiquetados que comprenden, por ejemplo, una etiqueta de fluorescencia, una etiqueta radiactiva o una etiqueta de biotina. También están incluidos los dNTPs con bases nucleotídicas modificadas, en donde las bases nucleotídicas son, por ejemplo, hipoxantina, xantina, 7-metilguanina, inosina, xantinosina, 7-metilguanosina, 5,6-dihidouracilo, 5-metilcitosina, pseudouridina, dihidouridina y 5-metilcitolina. Además, los ddNTPs de las moléculas anteriormente descritas están incluidos en la presente invención.

En una realización, el kit de acuerdo con la presente invención incluye un ácido nucleico testigo positivo, adecuado para demostrar la eficacia de los cebadores para multiplicación de CSFV y las sondas de ácido nucleico. En una realización, dicho ácido nucleico testigo positivo comprende una primera secuencia ligante de cebador, una segunda secuencia ligante de cebador y una secuencia ligante de sonda, en donde las secuencias ligantes de cebador primera y segunda son seleccionadas y orientadas de modo que la secuencia situada entre ellas pueda ser multiplicada por los al menos dos cebadores para multiplicación de CSFV; en donde la secuencia ligante de sonda comprende una parte de la región NS5A de un virus de la peste porcina clásica (CSFV) con la que se hibrida dicha sonda de ácido nucleico; y en donde la secuencia ligante de sonda está situada entre lo que comprenden las secuencias ligantes de cebador primera y segunda. En una realización preferida de la presente invención, el ácido nucleico testigo positivo es RNA o DNA.

En una realización preferida más, el ácido nucleico testigo positivo contenido en el kit de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de iniciación de la transcripción. En el contexto de la presente invención, una "secuencia de iniciación de la transcripción" es una secuencia que promueve la transcripción o transcripción inversa de DNA a RNA o de RNA a DNA por una enzima, respectivamente. En una realización de la presente invención, el ácido nucleico testigo positivo contenido en el kit de acuerdo con la presente invención consiste en DNA y es transcrito a RNA. El RNA transcrito se utiliza luego como un testigo positivo en la reacción RT-PCR en tiempo real. De esta manera, en una realización preferida, el ácido nucleico testigo positivo contenido en el kit de acuerdo con la presente invención consiste en DNA y comprende una secuencia de iniciación de la transcripción que promueve la transcripción de DNA a RNA. Las secuencias de iniciación de la transcripción son bien conocidas por los expertos en la técnica. Los promotores génicos son ejemplos de dichas secuencias de iniciación de la transcripción. Los promotores génicos contienen secuencias de DNA específicas y/o elementos de respuesta que proporcionan un sitio ligante para la RNA polimerasa y/o factores de transcripción que reclutan la RNA polimerasa. En una realización preferida, la secuencia de iniciación de la transcripción es seleccionada del grupo que consiste en el promotor de T7, el promotor de T3 y el promotor de SP6. La secuencia de iniciación de la transcripción está situada y dispuesta en el ácido nucleico testigo positivo de tal modo que, después de la transcripción o la transcripción inversa con una enzima, se puede obtener un ácido nucleico testigo positivo transcrito o inversamente transcrito que comprende dicha primera secuencia ligante de cebador, dicha segunda secuencia ligante de cebador y dicha secuencia ligante de sonda, en donde las secuencias ligantes de cebador primera y segunda son seleccionadas y orientadas de modo que la secuencia situada entre ellas puede ser multiplicada por los al menos dos cebadores para multiplicación de CSFV; en donde la secuencia ligante de sonda comprende una parte de la región NS5A de un virus de la peste porcina clásica (CSFV) con la que se hibrida dicha sonda de ácido nucleico; y en donde la secuencia ligante de sonda está situada entre lo que comprenden las secuencias primera y segunda.

En una realización preferida de la presente invención, el ácido nucleico testigo positivo comprende la secuencia de ID. SEC. nº 43. En otra realización, el ácido nucleico testigo positivo tiene la secuencia de ID. SEC. nº 43.

La presente invención se refiere además a un ácido nucleico aislado que comprende un extremo 3' que consiste en al menos los 6 últimos nucleótidos de acuerdo con la secuencia de ID. SEC. nº 3 o ID. SEC. nº 4, respectivamente, preferiblemente en al menos los 8 últimos nucleótidos, más preferiblemente en al menos los 10 últimos nucleótidos. En una realización preferida más, los extremos 3' del ácido nucleico consisten en la secuencia de acuerdo con la secuencia de ID. SEC. nº 3 o la ID. SEC. nº 4.

La presente invención también se refiere a un ácido nucleico aislado con una longitud de 16 a 40 nucleótidos, en donde el ácido nucleico comprende la secuencia de acuerdo con la ID. SEC. nº 2. En una realización preferida, el ácido nucleico tiene la secuencia de acuerdo con la ID. SEC. nº 2. En una realización preferida, el ácido nucleico aislado tiene las materializaciones de la sonda de ácido nucleico para la detección de CSFV como la esbozada anteriormente en esta memoria.

La presente invención se refiere además a un ácido nucleico que comprende la secuencia de acuerdo con la ID. SEC. nº 43. Preferiblemente, el ácido nucleico tiene la secuencia de acuerdo con la ID. SEC. nº 43.

Como se esbozó anteriormente, los inventores fueron capaces de identificar nuevas y desconocidas cepas del virus de la peste porcina clásica (CSFV) usando el método de acuerdo con la presente invención. En las ID. SEC. números 37 a 41 se proporcionan regiones preferidas de dichos nuevos y desconocidos virus de la peste porcina clásica (CSFV). De esta manera, la presente invención se refiere además a un ácido nucleico aislado que

comprende una secuencia de acuerdo con cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las ID. SEC. números 37, 38, 39, 40 y 41.

Tabla 1: Secuencias empleadas en esta memoria

| ID. SEC. Nº | SECUENCIA | NOMBRE |
|-------------------|--|---|
| 1 | GTATACGAGG TTAGTTCATT CTCGTATGCA TGATTGGACA AATCAAAATT TCAATTTGGT TCAGGGCCTC CCTCCAGCGA CGGCCGAACT GGGCTAGCCA TGCCCACAGT AGGACTAGCA AACGGAGGGA CTAGCCGTAG TGGCGAGCTC CCTGGGTGGT CTAAGTCCTG AGTACAGGAC AGTCGTCAGT AGTTCGACGT GAGCAGAAGC CCACCTCGAG ATGCTATGTG GACGAGGGCA TGCCCAAGAC ACACCTTAAC CCTAGCGGGG GTCGCTAGGG TGAAATCACA CCACGTGATG GGAGTACGAC CTGATAGGGC GCTGCAGAGG CCCACTATTA GGCTAGTATA AAAATCTCTG CTGTACATGG CACATGGAGT TGAATCATTT TGAACTTTTA TACAAAACAA ACAAAACAAA ACCAATGGGA GTGGAGGAAC CGGTATACGA TGCCACGGGG AGGCCATTGT TTGGAGACCC GAGTGAGGTA CACCCACAAT CAACACTGAA GCTACCACAT GATAGGGGGA GAGGTAACAT CAAAACAACA CTGAAGAACC TACCTAGGAA AGGCGACTGC AGGAGTGGCA ACCATCTAGG CCCGGTTAGT GGGATATATG TAAAGCCCGG CCCTGTCTTT TATCAGGACT ACATGGGCCC GGTCTACCAT AGAGCCCCTC TAGAGTTTTT TAACGAAGCG CAGTTTTGCG AGGTGACCAA AAGGATAGGT AGGGTGACAG GTAGTGACGG AAAGCTTTAC CATATATATG TGTGCATCGA TGGTTGCATA CTGCTGAAGC TAGCCAAGAG GGACGAGCCA AGAACCTGA AGTGGATTAG AAATTTACC GACTGTCCAT TGTGGGTAC CAGTTGCTCT GATGATGGCG CAAGTGGAAG TAAAGAGAAG AAGCCAGATA GGATCAACAA AGGCAAATTA AAAATAGCCC CAAAAGAGCA TGAGAAGGAC AGCAGAATA AGCCACCTGA CGCTACGATT GTAGTGAAG GAGTAAAATA CCAGGTAAA AAGAAGGGTA AAGTTAAAGG AAAGAGTACC CAAGACGGCC TGTACCACAA CAAGAATAAA CCACCAGAAT CTAGGAAGAA ATTAGAAAAA GCCCTATTGG CATGGGCGGT AATAGCAATT ATGTTGTACC AACCAGTTGA AGCCGAAAAT ATAACTCAAT GGAACCTGAG TGACAACGGC ACTAATGGTA TCCAGCATGC TATGTACCTT AGAGGGGTTA GCAGGAGCTT GCATGGGATC TGGCCGAAA AAATATGCAA AGGAGTCCCC ACCTACCTGG CCACAGACAC GGAACTGAAA GAAATACAGG GAATGATGGA TGCCAGCGAG GGGACAACT ATACGTGCTG TAAGTTACAG AGACATGAAT GGAACAAACA TGGATGGTGT AACTGGTACA ATATAGACCC CTGGATACAG TTGATGAATA GAACCAAGC AAACCTGGCA GAAGGCCCTC CGGCCAAGGA GTGCGCTGTG ACTTGCAGGT ACGATAAAGA TGCTGACATC AACGTGGTCA CCCAGGCCAG AAACAGGCCA ACAACCCTGA CCGGTTGCAA GAAAGGAAAA AATTTTTCTT TTGCGGGTAC AGTTATAGAG GGCCCATGTA | Secuencia genómica completa de AF326963 "Eystруп" |

| | | | |
|------------|-------------|-------------|-------------|
| ATTTCAATGT | TTCCGTGGAG | GATATCTTGT | ATGGGGATCA |
| TGAGTGCGGC | AGTTTGCTTC | AGGACACGGC | TCTGTACCTA |
| GTGGATGGAA | TGACCAACAC | TATAGAGAAT | GCCAGACAGG |
| GAGCAGCGAG | GGTAACATCT | TGGCTCGGGA | GGCAACTCAG |
| CACTGCCGGG | AAGAGGTTGG | AGGGTAGAAG | CAAAACCTGG |
| TTTGGTGCCT | ATGCCCTATC | GCCTTACTGT | AATGTAACAA |
| GCAAAATAGG | GTACATATGG | TACACTAACA | ACTGCACCCC |
| GGCTTGCCTC | CCCAAAAATA | CAAAGATAAT | AGGCCCCGGA |
| AAATTTGACA | CTAACGCGGA | AGACGGAAAG | ATTCTCCATG |
| AGATGGGGGG | TCACCTATCA | GAATTTCTGC | TGCTCTCTCT |
| GGTTGTTCTG | TCTGACTTCG | CCCCTGAAAC | AGCCAGCGCG |
| TTATACCTCA | TTTTGCACTA | CATGATTCCCT | CAATCCCATG |
| AAGAACCTGA | AGGCTGCGAC | ACAAACCAGC | TGAATCTAAC |
| AGTGGAACTC | AGGACTGAAG | ACGTAATACC | GTCATCAGTC |
| TGGAATGTTG | GCAAATATGT | GTGTGTTAGA | CCAGACTGGT |
| GGCCATATGA | AACCAAGGTG | GCTTTGTTAT | TTGAAGAGGC |
| AGGACAGGTC | GTAAAATTAG | CCTTACGAGC | GCTGAGGGAT |
| TTAACCAGGG | TCTGGAATAG | CGCATCAACC | ACGGCATTCC |
| TCATCTGCTT | GATAAAAGTA | TTAAGAGGAC | AGATCGTGCA |
| AGGTGTGATA | TGGCTGCTAC | TAGTAACTGG | GGCACAAGGC |
| CGGCTAGCCT | GCAAGGAAGA | TTACAGGTAC | GCAATATCAT |
| CGACCAATGA | GATAGGGCTA | CTCGGGGCCG | AAGGTCTCAC |
| CACCACCTGG | AAAGAATACA | ACCACGATTT | GCAACTGAAAT |
| GACGGGACCG | TTAAGGCCAT | TTGCGTGGCA | GGTTCCTTTA |
| AAGTCATAGC | ACTTAATGTG | GTCAGTAGGA | GGTATTTGGC |
| ATCATTGCAT | AAGGAGGCTT | CACTCACTTC | CGTGACATTT |
| GAGTCCTGTG | TCGACGGGAC | CAACCCATCA | ACTGAGGAAA |
| TGGGAGATCA | CTTCGGGTTT | GGGCTGTGCC | CGTTCGATAC |
| GAGTCCTGTT | GTCAAGGGAA | AGTACAATAC | AACCTTGTTG |
| AACGGTAGTG | CTTTCATCTT | TGTCTGCCCA | ATAGGGTGGA |
| CGGGTGTGAT | AGAGTGCACA | GCAGTGAGCC | CAACAACCTCT |
| GAGAACAGAA | GTGGTAAAGA | CCTTCAGGAG | AGACAAGCCC |
| TTTCCGCACA | GAATGGATTG | TGCGACCACC | ACAGTGGAAA |
| ATGGAGATTT | ATTCTACTGT | AAGTTGGGGG | GCAACTGGAC |
| ATGTGTGAAA | GGTGAACCAG | TGGTCTACAC | GGGGGGGCTA |
| GTAAAACAAT | GCAGATGGTG | TGGCTTCGAC | TTCAATGAGC |
| CCGACGGACT | CCCGCACTAC | CCCATAGGTA | AGTGCATCTT |
| GGTAAATGAG | ACAGGTTACA | GAATAGTAGA | TTCAACGGAC |
| TGTAACAGAG | ATGGCGTTGT | AATCAGCACA | GATGGGAGTC |
| ATGAGTGCTT | GATCGGTAAC | ACAACGTGCA | AGGTGCATGC |
| ATCAGATGAA | AGACTGGGCC | CTATGCCATG | CAGACCCAAA |
| GAGATTGTCT | CTAGTGCAGG | ACCTGTAAGG | AAAACCTCCT |
| GTACATTCAA | CTACGCAAAA | ACTTTGAAGA | ACAAGTACTA |
| TGAGCCCAGG | GACAGCTACT | TCCAGCAATA | TATGCTTAAG |
| GGCGAGTATC | AGTACTGGTT | TGACCTGGAC | GTGACTGACC |
| GCCACTCAGA | TTACTTCGCA | GAATTTGTCT | TCTTGGTAGT |
| GGTAGCACTG | TTAGGAGGAA | GATATGTCCT | GTGGCTAATA |
| GTGACCTACA | TAGTTCCTAAC | AGAACAATC | GCCGCTGGTT |
| TACCATTGGG | CCAGGTTGAG | GTAGTGTGTA | TAGGGAACCTT |
| AATTATCCAC | ACAGACATTG | AGGTCGTAGT | ATATTTCTTA |
| CTACTCTATT | TGGTCATGAG | GGATGAGCCT | ATAAAGAAAT |
| GGATACTGCT | GCTGTTCCAT | GCTATGACTA | ACAATCCAGT |
| CAAGACCATA | ACAGTGGCAT | TGCTTATGGT | TAGTGGGGTT |
| GCCAAGGGTG | GAAAGATAGA | CGGCGGTTGG | CAGCGGCTGC |
| CAGAGACCAG | CTTTGACATC | CAACTCGCGC | TGACAGTTAT |

| | | | |
|-------------|------------|------------|-------------|
| AGTAGTCGCT | GTGATGTTAC | TGGCAAAGAG | AGATCCAAC |
| ACTGTCCCT | TGGTTATAAC | AGTGGCAACC | CTGAGAACGG |
| CTAAGATGAC | TAATGGACTT | AGCACGGATA | TAGCCATAGC |
| TACAGTGTCA | ACAGCGTTGC | TAACCTGGAC | CTACATTAGT |
| GACTATTATA | GATACAAGAC | TTGGCTACAG | TACCTTATTA |
| GCACAGTGAC | AGGTATCTTC | TTAATAAGGG | TACTGAAGGG |
| AATAGGTGAG | TTGGATTTAC | ACACTCCAAC | CTTGCCATCT |
| TACAGACCCC | TCTTCTTCAT | TCTCGTGTAC | CTCATTTCCA |
| CTGCAGTGGT | AACAAGATGG | AATCTGGACA | TAGCCGGATT |
| GCTGTTGCAG | TGTGTCCCAA | CCCTTTTGAT | GGTTTTTACG |
| ATGTGGGCAG | ACATTCTCAC | CCTGATCCTC | ATACTGCCCA |
| CTTACGAGCT | AACAAAATA | TATTACCTCA | AGGAAGTGAA |
| GACTGGGGCA | GAAAAGGGCT | GGTTATGGAA | GACCAACTTC |
| AAGAGGGTAA | ACGACATATA | CGAAGTTGAC | CAATCTGGTG |
| AAGGGGTTTA | CTTTTTCCCG | TCAAAACAAA | AGACAAGTTC |
| AATAACAGGT | ACCATGTTGC | CATTGATCAA | AGCCATACTC |
| ATCAGCTGCA | TCAGTAATAA | GTGGCAGTTC | ATATATCTAT |
| TGTACTTGAT | ATTTGAAGTG | TCTTACTACC | TCCACAAGAA |
| GATCATAGAT | GAAATAGCAG | GAGGGACCAA | CTTCATCTCA |
| AGACTTGTAG | CCGCTTTGAT | CGAAGCCAAT | TGGGCCTTTG |
| ACAACGAAGA | AGTTAGGGGT | TTAAAGAAGT | TCTTCCTGTT |
| GTCTAGTAGG | GTTAAAGAAC | TGATCATCAA | ACACAAAGTG |
| AGGAATGAAG | TAATGGTCCA | CTGGTTTGGT | GACGAAGAGG |
| TTTATGGGAT | GCCAAAGTTG | GTTGGCTTAG | TCAAGGCAGC |
| AACATTGAGT | AAAAATAAAC | ATGTATTTT | GTGCACCGTC |
| TGTGAAGACA | GAGAGTGGAG | AGGAGAAACC | TGCCCAAAT |
| GCGGGCGTTT | TGGGCCACCA | ATGACCTGTG | GTATGACCCT |
| AGCCGACTTT | GAAGAAAAAC | ATTATAAGAG | GATCTTTTTT |
| AGAGAGGATC | AATCAGAAGG | GCCGGTTAGA | GAGGAGTACG |
| CAGGGTATCT | GCAATATAGA | GCCAGAGGGC | AATTATTCCCT |
| GAGGAATCTC | CCGGTGCTAG | CAACAAAAGT | CAAGATGCTC |
| CTGGTCGGAA | ATCTTGGGAC | GGAGGTGGGA | GACTTGGAAC |
| ACCTTGGCTG | GGTCCTTAGG | GGGCCTGCCG | TTTGCAAGAA |
| GGTTACCGAA | CATGAGAAAT | GCACCACATC | CATAATGGAC |
| AAATTGACTG | CTTTTTTCGG | TGTTATGCCA | AGGGGCACCA |
| CACCTAGAGC | CCCTGTGAGA | TTCCCCACCT | CTCTCTTAAA |
| GATAAGAAGG | GGGTTGGAAA | CTGGCTGGGC | GTACACACAC |
| CAAGGTGGCA | TTAGTTCAGT | GGACCATGTC | ACTTGTGGGA |
| AAGACTTGCT | GGTATGTGAC | ACTATGGGCC | GGACAAGGGT |
| CGTTTGCCAA | TCAAATAATA | AGATGACAGA | TGAGTCTGAG |
| TATGGAGTTA | AACTGACTC | CGGATGCCCC | GAAGGAGCTA |
| GGTGTATATG | GTTCAACCCA | GAGGCAGTTA | ACATATCAGG |
| GACTAAAGGA | GCCATGGTCC | ACTTACAAA | AACTGGAGGA |
| GAATTCACCT | GTGTGACAGC | ATCAGGAACT | CCGGCCTTCT |
| TTGATCTCAA | GAACCTCAA | GGCTGGTCAG | GGCTACCGAT |
| ATTTGAGGCA | TCAAGTGGAA | GGGTAGTCGG | CAGGGTCAAG |
| GTCCGGGAAGA | ATGAGGACTC | TAAACCAACC | AAGCTTATGA |
| GTGGAATACA | AACAGTCTCC | AAAAGTACCA | CAGACTTGAC |
| AGAAATGGTA | AAGAAAATAA | CGACCATGAA | CAGGGGAGAA |
| TTCAGACAAA | TAACCCTTGC | TACAGGTGCC | GGAAAAACCA |
| CGGAACTCCC | TAGGTCAGTC | ATAGAAGAGA | TAGGGAGGCA |
| TAAGAGAGTC | TTGGTCTTGA | TCCCTCTGAG | GGCGGCAGCA |
| GAGTCAGTAT | ACCAATATAT | GAGACAAAA | CATCCAAGCA |
| TCGCATTTAA | CCTGAGGATA | GGGGAGATGA | AGGAAGGGGA |
| CATGGCCACA | GGGATAACCT | ATGCTTCATA | CGGTTACTTC |

| | | | |
|------------|------------|------------|-------------|
| TGTCAGATGC | CACAACCTAA | GTTGCGAGCC | GCGATGGTTG |
| AGTACTCCTT | CATATTTCTT | GACGAGTACC | ACTGTGCCAC |
| CCCAGAACAA | TTGGCCATCA | TGGGAAAGAT | CCACAGATTT |
| TCAGAGAACC | TGCGGGTAGT | AGCCATGACC | GCAACACCAG |
| CAGGCACAGT | AACAACCACA | GGGCAGAAAC | ACCCTATAGA |
| AGAATTCATA | GCCCCAGAAG | TGATGAAAGG | GGAAGACTTA |
| GGCTCAGAGT | ACTTGGACAT | TGCTGGACTA | AAGATACCAG |
| TAGAGGAGAT | GAAGAGCAAC | ATGCTGGTTT | TTGTGCCCCAC |
| TAGGAACATG | GCGGTGGAGA | CAGCAAAGAA | ATTGAAAGCT |
| AAGGGTTACA | ACTCAGGCTA | CTATTATAGT | GGAGAGGATC |
| CATCTAACCT | GAGGGTGGTA | ACGTCCGAGT | CCCCGTACGT |
| GGTGGTGGCA | ACCAACGCGA | TAGAATCAGG | TGTTACTCTC |
| CCGGACTTGG | ATGTGGTTGT | CGATACAGGG | CTTAAGTGTG |
| AAAAGAGAAT | ACGGCTGTCA | CCTAAGATGC | CCTTCATAGT |
| GACGGGCCTG | AAGAGAATGG | CTGTCACGAT | TGGGGAACAA |
| GCCCAGAGAA | GGGGGAGAGT | TGGGAGAGTA | AAGCCTGGGA |
| GATACTACAG | GAGTCAAGAA | ACTCCCCTTG | GTTCTAAAGA |
| TTACCATTAT | GATCTACTGC | AAGCACAGAG | GTACGGTATT |
| GAAGATGGGA | TAAACATCAC | CAAATCCTTT | AGAGAGATGA |
| ACTATGATTG | GAGCCTTTAT | GAGGAGGACA | GTCTGATGAT |
| TACACAATTG | GAAATCCTCA | ATAATTTGTT | GATATCAGAA |
| GAACTACCGA | TGGCAGTAAA | AAATATAATG | GCCAGGACTG |
| ACCACCCAGA | ACCAATTCAG | CTGGCGTACA | ACAGCTACGA |
| AACACAAGTG | CCAGTGCTAT | TCCCAAAAAT | AAAGAATGGA |
| GAGGTGACTG | ATAGTTACGA | TAACTATACC | TTCTCAACG |
| CAAGAAAATT | GGGGGATGAT | GTACCCCCTT | ACGTGTATGC |
| CACAGAGGAT | GAGGACTTAG | CGGTAGAGCT | ACTGGGCTTA |
| GACTGGCCAG | ACCCTGGAAA | CCAAGGAACC | GTAGAGGCTG |
| GCAGAGCACT | AAAACAAGTA | GTTGGTCTAT | CAACAGCTGA |
| GAATGCCCTG | TTAGTAGCCT | TATTCGGCTA | TGTAGGATAT |
| CAGGCACCTT | CAAAGAGGCA | TATACCAGTA | GTCACAGATA |
| TATATTCAAT | TGAAGATCAC | AGGTTGGAAG | ACACCACACA |
| CCTACAGTAC | GCCCCAAATG | CTATCAAGAC | GGAGGGGAAG |
| GAGACAGAAT | TGAAGGAGCT | AGCCCAGGGG | GATGTGCAGA |
| GATGTGTGGA | AGCTATGACC | AATTATGCAA | GAGAGGGTAT |
| CCAATTCATG | AAGTCTCAGG | CACTGAAGGT | GAAAGAAACC |
| CCCCTTACA | AAGAGACAAT | GAACACTGTG | ACTGACTATG |
| TAAAGAAAAT | CATGGAGGCG | CTGGCAGACA | GTAAAGAAGA |
| CATCTTAAGA | TATGGGTTGT | GGGGGACGCA | CACAGCCTTA |
| TATAAGAGCA | TCAGTGCCAG | GCTTGGGAGT | GAGACTGCCGT |
| TCGCTACCCT | GGTCGTGAAG | TGGCTGGCAT | TTGGGGGGGA |
| ATCAATAGCA | GACCATGTCA | AACAAGCGGC | CACAGACTTG |
| GTCGTCTACT | ATATCATCAA | CAGACCTCAG | TTCCCAGGAG |
| ACACAGAGAC | ACAACAGGAA | GGAAGGAAAT | TTGTGGCCAG |
| CCTACTGGTC | TCAGCTCTAG | CTACTTACAC | ATACAAAAGC |
| TGGAATTACA | ATAATCTGTC | CAAGATAGTT | GAACCGGCTT |
| TGGCCACTCT | GCCCTATGCC | GCCACAGCTC | TCAAACCTATT |
| CGCCCCCACT | CGATTGGAGA | GCGTTGTCAT | ATTGAGTACC |
| GCAATCTACA | AGACCTACCT | ATCAATCAGG | CGCGGAAAAA |
| GCGATGGTTT | GCTAGGCACA | GGGGTTAGTG | CGGCTATGGA |
| GATCATGTCA | CAAAATCCAG | TATCCGTGGG | CATAGCAGTC |
| ATGCTAGGGG | TAGGGGCCGT | GGCAGCCCAC | AATGCAATCG |
| AGGCCAGTGA | GCAGAAGAGA | ACACTACTCA | TGAAAGTTTT |
| TGTAAAGAAC | TTCTTGACC | AAGCAGCCAC | TGATGAATTA |
| GTCAAGGAGA | GTCCTGAGAA | AATAATAATG | GCTTTGTTTG |

| | | | |
|-------------|-------------|-------------|-------------|
| AAGCAGTGCA | GACAGTCGGT | AACCCTCTTA | GA CTAGTATA |
| CCACCTTTAT | GGAGTTTTCT | ATAAGGGGTG | GGAGGCAAAA |
| GAGTTGGCCC | AAAGGACAGC | CGGTAGGAAC | CTTTTCACTT |
| TGATAATGTT | CGAGGCTGTG | GA ACTACTGG | GAGTAGATAG |
| TGAAGGAAAG | ATCCGCCAGC | TATCAAGTAA | TTACATACTA |
| GAGCTCCTGT | ATAAGTTCCG | TGACAGTATC | AAGTCTAGCG |
| TGAGGGAGAT | GGCAATCAGC | TGGGCCCTG | CCCCTTTCAG |
| CTGTGATTGG | ACACCGACGG | ATGACAGAAT | AGGGCTCCCC |
| CAAGACAATT | TCCTCCAAGT | GGAGACGAAA | TGCCCCTGTG |
| GTTACAAGAT | TAAAGCAGTT | AAGAATTGTG | CTGGAGAGCT |
| GAGACTCTTG | GAGGAGGAAG | GCTCATTTCT | CTGCAGAAAT |
| AAATTCGGGA | GAGGTTACAG | GA ACTACAGG | GTGACAAAAT |
| ACTATGATGA | CAATCTATCA | GAAATAAAGC | CAGTGATAAG |
| AATGGAAGGG | CATGTGGAAC | TCTACTACAA | GGGAGCCACC |
| ATCAA ACTGG | ACTTCAACAA | CAGTAAAACA | ATACTGGCAA |
| CCGATAAATG | GGAGATTGAT | CACTCCACTC | TGGTCAGGGT |
| GCTCAAGAGG | CACACAGGGG | CTGGATATCA | TGGGGCATA C |
| CTGGGCGAGA | AACCGA ACTA | CAAACATCTG | ATAGAGAGGG |
| ACTGTGCAAC | CATCACCAA A | GATAAGGTTT | GTTTTCTCAA |
| AATGAAGAGA | GGGTGTGCAT | TTACTTATGA | CTTATCCCTT |
| CACAACCTTA | CCC GACTGAT | TGAATTGGTA | CACAAGAATA |
| ACTTGGAAGA | CAAAGAGATT | CCTGCTGTTA | CGGTTACAAC |
| CTGGCTGGCT | TACACGTTTG | TAAATGAAGA | TATAGGGACC |
| ATAAAACCAG | CCTTCGGGGA | GAAAGTAACA | CCGGAGATGC |
| AGGAGGAAAT | AACCTTGCAG | CCTGCTGTAG | TGGTGGATAC |
| AACTGACGTG | ACCGTGACTG | TGGTAGGGGA | AGCCCCTACT |
| ATGACTACAG | GGGAGACTCC | GACAGCGTTC | ACCAGCTCAG |
| GTTTCAGACCC | GAAAGGCCAA | CAAGTTTTAA | AACTGGGGGT |
| AGGTGAAGGC | CAATACCCCG | GGACTAATCC | ACAGAGGGCA |
| AGCCTGCACG | AAGCCATACA | AGGTGCAGAT | GAGAGACCCT |
| CGGTGCTGAT | ATTAGGGTCT | GATAAAGCCA | CCTCTAATAG |
| AGTGAAA ACT | GCAAAGAATG | TAAAGGTATA | CAGAGGCAGG |
| GACCCACTAG | AAGTGAGAGA | TATGATGAGG | AGGGGAAAGA |
| TCCTGGTCAT | AGCCCTGTCT | AGGGTTGATA | ATGCTCTATT |
| GAAATTTGTT | GACTACAAAG | GCACCTTTCT | AACTAGAGAG |
| ACCCTAGAGG | CATTAAGTTT | GGGTAGGCCT | AAAAAGAAAA |
| ACATAACCAA | GGCAGAAGCG | CAGTGGTTGC | TGTGCCTCGA |
| AGACCAAATG | GAAGAGCTAC | CCGATTGGTT | CGCAGCCGGG |
| GAACCCATTT | TTCTAGAGGC | TAACATTA AA | CATGACAGGT |
| ACCATCTGGT | GGGGGATATA | GCTAATATCA | AGGAAAAAGC |
| CAAACAGTTG | GGAGCTACAG | ACTCCACAAA | GATATCTAAG |
| GAGGTTGGTG | CAAAGTGTA | TTCTATGAAA | CTGAGTAATT |
| GGGTGATGCA | AGAAGAAAAT | AAACAGGGCA | ACCTGACCCC |
| CTTGTTTTGAA | GAGCTCCTGC | AACAGTGTCC | ACCCGGAGGC |
| CAGAACAAAA | CTGCACATAT | GGTCTCTGCT | TACCAACTAG |
| CTCAAGGGAA | CTGGATGCCA | ACCAGCTGCC | ATGTTTTTAT |
| GGGACCATATA | TCTGCCAGGA | GGACCAAGAC | CCATCCATAT |
| GAAGCATA CG | TCAAGTTAAG | GGAGTTGGTA | GAGGAACACA |
| AGATGAAAAC | ATTGTGTCCT | GGATCAAGCC | TGGGTAAGCA |
| CAACGAATGG | ATAATTGGTA | AAATCAAATA | CCAGGGAAAC |
| CTGAGGACCA | AACACATGTT | GAACCCCGGC | AAGGTGGCAG |
| AGCAACTGTG | CAGAGAGGGA | CACAGACACA | ATGTGTATAA |
| CAAGACAATA | GGCTCAGTAA | TGACAGCTAC | TGGTATCAGG |
| TGGAGAAGT | TGCCCGTGGT | TAGGGCCAG | ACAGACACAA |
| CCA ACTTCCA | CCAAGCAATA | AGGGATAAGA | TAGACAAGGA |

| | | |
|----|---|-------------------------------------|
| | <p>AGAGAACCTA CAAACCCCGG GTTTACATAA GAAACTAATG GAAGTTTTCA ATGCATTGAA ACGACCCGAG TTAGAGTCCT CCTACGATGC CGTGGAAATGG GAGGAACCTGG AGAGAGGAAT AAACAGGAAG GGTGCTGCTG GTTTCTTTGA ACGCAAAAAT ATAGGGGAAA TATTGGATTC AGAGAAAAAC AAAGTCGAAG AGATTATTGA CAATCTGAAA AAAGGCAGAA ACATCAAATA CTATGAAACC GCGATCCCAA AGAATGAGAA GAGGGACGTC AATGATGACT GGACTGCTGG TGACTTCGTG GAAGAGAAGA AACCCAGAGT CATACAATAC CCTGAAGCAA AAACAAGGCT GGCCATCACC AAGGTGATGT ATAAGTGGGT GAAGCAGAAG CCAGTAGTTA TACCCGGGTA TGAAGGGAAG ACACCTCTAT TCCAAATTTT TGACAAAGTA AAGAAGGAAT GGGATCAATT CCAAAATCCA GTGGCAGTGA GTTTTGACAC TAAGGCGTGG GACACCCAGG TAACCACAAA AGATTTGGAG TTGATAAAGG ACATACAAAA GTACTATTTT AAGAAGAAAT GGCATAAATT TATTGACACC CTGACCATGC ACATGTCAGA AGTACCCGTA ATCAGTGCTG ATGGGGAAGT ATACATAAGG AAAGGGCAA GAGGCAGTGG ACAACCTGAC ACAAGCGCAG GCAATAGCAT GCTAAATGTG TTAACAATGA TTTACGCCTT CTGCGAGGCC ACGGGAGTAC CCTACAAGAG CTTTCGACAGG GTGGCAAAAA TTCATGTGTG TGGGGATGAT GGTTTCCTGA TCACAGAAAG AGCTCTCGGT GAGAAATTCG CGAGTAAGGG AGTCCAGATC CTATATGAAG CTGGGAAGCC CCAGAAGATC ACTGAAGGGG ACAAGATGAA AGTGGCCTAC CAATTTGATG ATATTGAGTT TTGCTCCCAT ACACCAATAC AAGTAAGGTG GTCAGATAAC ACTTCTAGTT ACATGCCGGG GAGAAATACA ACCACAATCC TGGCTAAAAA GGCCACAAGG TTAGATTCCA GTGGTGAGAG GGTACCATA GCATATGAGA AAGCAGTAGC ATTCAGCTTC CTGCTGATGT ACTCCTGGAA CCCACTAATC AGAAGGATCT GCTTACTGGT GCTATCAACT GAAGTCAAG TGAAACCAGG GAAGTCAACC ACTTACTACT ATGAAGGGGA CCCGATATCT GCCTACAAGG AAGTCATCGG CCACAATCTT TTTGATCTTA AGAGAACAAG CTTTCGAGAAG CTGGCCAAGT TAAATCTCAG CATGTCAGTA CTCGGAGCCT GGACTAGACA CACCAGTAAA AGACTACTAC AAGACTGTGT CAATGTGGGT GTTAAAGAGG GCAACTGGCT AGTTAATGCA GATAGACTAG TAAGTAGCAA GACTGGAAAT AGGTACATAC CCGGAGAGGG CCACACCCTG CAAGGGAGAC ATTATGAAGA ACTGGTGTG GCAAGAAAAC AGATCAACAA CTTTCAAGGG ACCGACAGGT ACAATCTAGG CCAATAGTC AATATGGTGT TAAGGAGGCT GAGAGTCATG ATGATGACCC TGATAGGGAG AGGGGTATGA GCGCGGGTAA CCCGGGATCT GGACCCGCCA GTAGAACCCT GTTGATAGATA ACACATAATTT TTTTTTATTT ATTTAGATAT TACTATTTAT TTATTTATTT ATTTATTGAA TGAGTAAGAA CTGGTACAAA CTACCTCAAG TTACCACACT AACTCATT TTAACAGCAC TTTAGCTGGA AGGAAAATTC CTGACGTCCA CAGTTGGACT AAGGTAATTT CCTAACGGCC C</p> | |
| 2* | TGATAYTRGG GTCYGA | 9448-LNA-FAM |
| 3 | AATAAATCAT AAGCCTGCWY GAAGCYATAC AA | CSF-9403.1-F-flap (cebador directo) |

| | | |
|----|--|-----------------------------------|
| 4 | CTTYACATTC TTHRCRGTYT TYACYCT | CSF-9501R (cebador inverso) |
| 5 | BTCCTTCCTG GGCATGGA | β -actina 3F (directo) |
| 6 | GRGSGCGAT GATCTTGAT | β -actina 3R (inverso) |
| 7 | TCCATCATGA AGTGYGACGT SGACATCCG | β -actina 3-HEX |
| 8 | TCAGCAGAGG GCAAGCTTGC TTGAAGCTAT ACAAGGTGTG GATGAAAGGC CCTCGGTACT GATATTGGGG TCTGATAAGG CCACCTCCAA TAGGGTGAAG ACCGCAAAGA ATGTGAAGAT | AY072924 Paderborn |
| 9 | TCCACAGAGG GCAAGCCTGC ACGAAGCCAT ACAAGGTGCT GATGAGAGGC CCTCGGTGCT GATATTGGGG TCTGATAAAG CCACCTCTAA TAGAGTAAAA ACTGCAAAGA ATGTAAAGGT | EU490425 Thiverval |
| 10 | TCCACAGAGG GCAAGCCTGC ACGAAGCCAT ACAAGGTGCA GATGAGAGGC CCTCTGTGCT GATATTGGGG TCTGATAAAG CCACCTCTAA TAGAGTGAAA ACTGCAAAGA ATGTAAAGGT | EU497410 JL1(06) |
| 11 | TCCACAGAGG GCAAGCCTGC ACGAAGCCAT ACAAGGTGCA GATGAGAGGC CCTCTGTGCT GATATTGGGG TCTGATAAAG CCACCTCTAA TAGAGTGAAA ACTGCAAAGA ATGTAAAGGT | AY775178 Shimen/HVRI |
| 12 | CCAGCAGAGG GCAAGTCTGC ACGAAGCCAT ACAAGGGGCA GATGAAAGGC CCTCAGTACT GATACTGGGG TCTGATAAAG CCACCTCCAA TAGAGTAAAA ACAGCAAAAA ATGTGAAGAT | AY646427 IL/94/TWN |
| 13 | TCCACAGAGG GCAAGCCTGC ACGAAGCCAT ACAAGGTGCA GATGAGAGGC CCTCGGTGCT GATATTGGGG TCTGATAAAG CCACCTCTAA TAGAGTGAAG ACTGCAAAGA ATGTAAAGGT | AY805221 C/HVRI |
| 14 | TCCACAGAGG GCAAGCCTGC ACGAAGCCAT ACAAGGTGCA GATGAGAGGC CTTTCGGTGCT GATATTGGGG TCTGATAAAG CCACCTCTAA TAGAGTGAAA ACTGCTAAGA ATGTAAAGGT | DQ127910 SWH |
| 15 | TCCACAGAGG GCAAGCCTGC ACGAAGCCAT ACAAGGTGCT GATGAGAGGC CCTCGGTGCT GATATTGGGG TCTGATAAAG CCACCTCTAA TAGAGTAAAA ACTGCAAAGA ATGTAAAGGT | X8793 Alfort/187 |
| 16 | TCAGCAGAGA GCAAGCCTGC TCGAAGCTAT ACAAGGTGTG GATGAAAGGC CCTCGGTACT GATACTGGGG TCTGATAAAG CCACCTCCAA TAGGGTCAAG ACCGCAAAGA ATGTGAAGAT | J04358 Alfort/Tueb. |
| 17 | TCCACAGAGG GCAAGCCTGC ACGAAGCCAT ACAAGGTGCA GATGAGAGGC CTTTCGGTGCT GATATTGGGG TCTGATAAAG CCACCTCTAA TAGAGTGAAA ACTGCTAAGA ATGTAAAGGT | X96550 CAP |
| 18 | TCCACAGAGA GCAAGCCTGC ACGAAGCCAT ACAAATGCA GATGAAAGGC CCTCGGTGCT GATATTGGGG TCTGATAAAG CCACCTCTAA TAGAGTGAAA ACTGTGAAGA ATGTGAAGGT | AY578688 RUCSFPLUM |
| 19 | TCCACAGAGA GCAAGCCTGC ACGAAGCCAT ACAAAGCGCA GATGAAAGGC CCTCTGTGTT GATATTGGGG TCTGATAAAG CCACCTCTAA TAGAGTGAAA ACTGTAAAGA ATGTGAAGGT | AY578687 BRESCIA X |
| 20 | TCCACAGAGA GCAAGCTTGC TCGAAGCTAT ACAAGGTGGG GATGAAAGGC CCTCGGTACT GATATTGGGG TCTGATAAAG CCACCTCCAA TAGGGTGAAG ACCGCAAAGA ATGTGAAGAT | AY55439796 TD |

ES 2 521 018 T3

| | | | | | |
|----|--|--|--|--|---------------------------|
| 21 | TCCACAGAGG GATGAGAGGC CCACCTCTAA | GCAAGCCTGC CCTCGGTGCT TAGAGTGAAG | ACGAAGCCAT GATATTGGGG ACTGCAAAGA | ACAAGGTGCA TCTGATAAAG ATGTAAAGGT | AY663656 China |
| 22 | TCCACAGAGG GATGAGAGGC CCACCTCTAA | GCAAGCCTGC CCTCGGTGCT TAGAGTGAAG | ACGAAGCCAT GATATTGGGG ACTGCAAAGA | ACAAGGTGCA TCTGATAAAG ATGTAAAGGT | AY259122 Riems |
| 23 | TCCACAGAGG GATGAGAGAC CCACCTCTAA | GCAAGCCTGC CCTCGGTGCT TAGAGTGAAG | ACGAAGCCAT GATATTAGGG ACTGCAAAGA | ACAAGGTGCA TCTGATAAAG ATGTAAAGGT | AF326963 Eystrup |
| 24 | TCCACAGAGG GATGAGAGGC CCACCTCTAA | GCAAGCCTGC CCTCGGTGCT TAGAGTGAAG | ACGAAGCCAT GATATTGGGG ACTGCAAAGA | ACAAGGTGCA TCTGATAAAG GTGTAAAGGT | AY382481 China vacc. |
| 25 | TCAGCAGAGA GATGAAAGGC CCACCTCCAA | GCAAGCCTGC CCTCGGTACT CAGGGTGAGG | TCGAAGCTAT GATATTGGGG ACCGCAAAGA | ACAAGGTGTG TCTGATAAAG ATGTCAAGAT | AY568569 CH/01/TWN |
| 26 | TCAGCAGAGA GATGAAAGGG CCACCTCCAA | GCAAGCCTGC CCTCGGTACT CAGGGTGAGG | TCGAAGCAAT GATATTGGGG ACCGCAAAGA | ACAAGGTGTG TCTGATAAAG ATGTCAAGAT | AY367767 GXWZ02 |
| 27 | TCCACAGAGG GATGAGAGGC CCACCTCTAA | GCAAGCCTGC CCTCGGTGCT TAGAGTGAAG | ACGAAGCCAT GATATTGGGG ACTGCAAAGA | ACAAGGTGCA TCTGATAAAG ATGTAAAGGT | AF531433 HCLV |
| 28 | TCCACAGAGG GATGAGAGGC CCACCTCTAA | GCAAGCCTGC CCTCTGTGCT TAGAGTGAAG | ACGAAGCCAT GATATTGGGG ACTGCAAAGA | ACAAGGTGCA TCTGATAAAG ATGTAAAGGT | AF407339 cepa 39 |
| 29 | TCCACAGAGG GATGAGAGGC CCACCTCTAA | GCAAGCCTGC CCTCTGTGCT TAGAGTGAAG | ACGAAGCCAT GATATTGGGG ACTGCAAAGA | ACAAGGTGCA TCTGATAAAG ATGTAAAGGT | AF333000 cF114 |
| 30 | TCCACAGAGA GATGAAAGGC CCACCTCTAA | GCAAGCCTGC CCTCGGTGCT TAGAGTGAAG | ACGAAGCCAT GATATTGGGG ACTGTGAAGA | ACAAAATGCA TCTGATAAAG ATGTGAAGGT | AF099102 Russian vacc. |
| 31 | TCCACAGAGG GATGAGAGGC CCACCTCTAA | GCAAGCCTGC CCTCTGTGCT TAGAGTGAAG | ACGAAGCCAT GATATTGGGG ACTGCAAAGA | ACAAGGTGCA TCTGATAAAG ATGTAAAGGT | AF092448 Shimen |
| 32 | TCCACAGAGG GATGAGAGGC CCACCTCTAA | GCAAGCCTGC CCTCGGTGCT TAGAGTGAAG | ACGAAGCCAT GATATTGGGG ACTGCAAAGA | ACAAGGTGCA TCTGATAAAG ATGTAAAGGT | AF091507 HCLV |
| 33 | TCCACAGAGG GATGAGAGGC CCACCTCTAA | GTAAGTCTGC CCTCAGTACT TAGAGTGAAG | ACGAAGCCAT GATATTGGGG ACTGCAAAGA | ACAAGGTGCG TCTGATAAAG ATGTGAAGGT | AF091661 Brescia |
| 34 | TCCACAGAGG GATGAGAGGC CCACCTCTAA | GCAAGCCTGC CCTCGGTGCT TAGAGTAAAA | ACGAAGCCAT GATATTGGGG ACTGCAAAGA | ACAAGGTGCT TCTGATAAAG ATGTAAAGGT | U90951 Alfort A19 |
| 35 | TCCACAGAGG GATGAGAGGC CCACCTCTAA | GCAAGCCTGC CCTCGGTGCT TAGAGTGAAG | ACGAAGCCAT GATATTGGGG ACTGCTAAGA | ACAAGGTGCA TCTGATAAAG ATGTAAAGGT | U45478 Glentorf |
| 36 | TCCACAGAGG GATGAGAGGC CCACCTCTAA | GCAAGCCTGC CCTCGGTGCT TAGAGTGAAG | ACGAAGCCAT GATATTGGGG ACTGCAAAGA | ACAAGGTGCA TCTGATAAAG ATGTAAAGGT | U45477 Riems |

| | | | | | |
|-----|--|--|--|--|--|
| 37† | TCCACAGAAG GATGAGAGGC CCACCTCTAA | GCAAGCCTGC CCTCTGTGCT TAGAGTGAAA | ACGAAGCCAT GATATTGGGG ACTGCAAAGA | ACAAGGTGCA TCTGATAAAG ATGTAAAGGT | CSFV Koslov |
| 38† | TCAGCAGAGA GATGAAAGGC CCACCTCTAA | GCTAGCCTGC CCTCGGTACT TAGGGTGAAG | TCGAAGCTAT GATACTGGGG ACCGCAAAGA | ACAAGGTGTG TCTGATAAAG ATGTGAAGAT | CSFV Hennef |
| 39† | TCAGCAGAGA GATGAAAGGC CCACCTCCAA | GCTAGCCTGC CCTCGGTACT TAGGGTGAAG | TCGAAGCTAT GATACTGGGG ACCGCAAAGA | ACAAGGTGTG TCTGATAAAG ATGTGAAGAT | CSFV Borken |
| 40† | TCAGCAGAGA GATGAAAGGC CCACCTCTAA | GCTAGCCTGC CCTCGGTACT TAGGGTGAAG | TCGAAGCTAT GATACTGGGG ACCGCAAAGA | ACAAGGTGTG TCTGATAAAG ATGTGAAGAT | CSFV Roesrath |
| 41† | AATAAATCAT TGAAAGGCC ACCTCCAGTA | AAGCCTGCTC TCGGTACTGA GGGTGAAGAC | GAAGCYATAC TATTGGGGTC CGCGAAG | AAAGTGTGGA CGATAAGGCC | CSFV Bergen |
| 42 | CTCCTTCCTG ACCTTCAACT AGGACCTCTA CATGTACCCA ACGGCCCTGG CGCCTC | GGCATGGAAT CCATCATGAA CGCCAACACG GGCATCGCCG CGCCCAGCAC | CCTGCGGCAT GTGCGACGTC GTGCTGTCCG ACAGGATGCA GATGAAGATC | CCACGAAACT GACATCCGCA GTGGCACCAC GAAGGAGATC AAGATCATCG | beta-actina |
| 43 | AGCTGTAATA YGAAGCYATA TGCCTGATAY YDAAGAATGT | CGACTCACTA CAAACAGCCG TRGGGTCYGA RAAGTGATGC | TAGGGCGTGA CACGAGCTCT TATGCGCAGR | TGAGCCTGCW CGCAGCATCC GTRAARACYG | oLPC-CSF-NS5A [ácido nucleico testigo positivo para CSFV-9403.1-F-flap (cebador directo), CSFV 9501R (cebador inverso) y 9448-LNA-FAM (sonda de ácido nucleico para CSFV)] |

*Los nucleótidos de las posiciones 2, 4, 7, 9, 11, 13 y 15 de la ID. SEC. nº 2 están modificados en realizaciones preferidas de la presente invención, por ejemplo, mediante LNA.

† Secuencias de regiones NS5A recién identificadas de cepas de CSFV. Las secuencias mostradas muestran la región de dichas nuevas cepas de CSFV que muestran identidad con respecto a los nucleótidos 9388 a 9507 según la ID. SEC. nº 1; véase la Figura 2.

Ejemplos

Muestras

Se obtuvieron cepas de BDV, BVDV y CSFV de los respectivos laboratorios de referencia nacionales alemanes. Se cultivaron cepas de CSFV usando células renales porcinas (PK15) y se propagaron BVDV y BDV en células renales bovinas (MDBK) o células de timo de oveja (SFT), respectivamente, de acuerdo con los protocolos estándares [Colección de Líneas Celulares en Medicina Veterinaria, Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Insel Riems, Alemania]. Se examinaron muestras positivas y negativas recientes de jabalí de regiones positivas para CSFV de Alemania Occidental, enviadas por servicios veterinarios estatales. El grupo de RNA de referencia EPIZONE, desarrollado en el FLI, incorpora una colección representativa de muestras de RNA de CSFV de los genotipos más relevantes así como de miembros de pestivirus relacionados (BDV, BVDV y pestivirus atípicos). El grupo comprende actualmente 31 muestras de RNA pestivírico diferentes, extraídas de sobrenadantes de cultivos celulares, en una concentración de aproximadamente 1000 copias genómicas por microlitro. Este grupo fue utilizado para analizar la especificidad del sistema de NS5A para CSFV.

Desarrollo de un nuevo patrón de NS5A

Para la determinación de la sensibilidad se generó un nuevo patrón de RNA. Un oligonucleótido de 140 pares de bases de longitud (oLPC-CSF-NS5A) que contenía un promotor de T7 y las secuencias ligantes de cebador y sonda del protocolo de RT-PCR específico para NS5A en tiempo real, conectados mediante cortas secuencias espaciadoras, sirvió como molde para la transcripción in vitro de RNA de cadena sencilla y sentido positivo (Tabla 1). El producto de RNA transcrito in vitro fue tratado con DNasa y fue purificado usando el minikit RNeasy® (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania). Se determinó la concentración de RNA y se estableció una serie de diluciones 1:10.

oLPC-CSF-NS5A:

**agc tg TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG cgtgatga
GCCTGCWYGAAGCYATACAA acag CCG CAC GAG CTC TCG CAG
CAT CC tgcc TGATAYTRGGGTCYGA tatgcgc AGR GTR AAR ACY GYD
AAG AAT GTR AAG tgatgc**

10 *Secuenciación parcial de genomas de CSFV*

Para la secuenciación, se multiplicó el RNA vírico mediante una RT-PCR con el kit Super Script® III One-Step RT-PCR con Platinum® Taq (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.). Se aislaron fragmentos de DNA de los geles de agarosa con el kit QIAquick® para Extracción de Gel (Qiagen). La secuenciación se llevó a cabo con el kit BigDye® Terminator v1.1 para Secuenciación en Ciclos (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.). Se leyeron las secuencias de nucleótidos usando el Analizador Genético ABI 3130 (Applied Biosystems) y se usó la versión informática 11.0 del Genetic Computer Group (Accelrys Inc., San Diego, California, EE.UU.) para el análisis.

Diseño de una RT-PCR en tiempo real

Se examinaron diferentes regiones del genoma de CSFV (E^{RNS}, NS2, NS3, NS5A y la 3'-UTR) para la selección de cebadores y sondas (Figura 1. Con objeto de obtener más información sobre secuencias para optimizar la sensibilidad y la especificidad del sistema de RT-PCR en tiempo real para NS5A, se secuenció la región correspondiente de diversos virus de CSF con diferentes genotipos. Estos datos, junto con las secuencias de la base de datos del NCBI, se usaron para diseñar nuevos cebadores y sondas. Se examinaron un número de combinaciones de cebadores con diferentes puntos de partida, bases degeneradas o secuencias colgantes ("flap") adicionales, así como diferentes sondas [sondas de ácido nucleico sentido, antisentido y bloqueado (LNA)]. La siguiente combinación de cebadores resultó óptima y, por lo tanto, es una realización preferida de la presente invención: CSF-9403.1-F-flap (cebador directo que contiene una secuencia colgante adicional y tres bases degeneradas) y 9501R (cebador inverso con siete bases degeneradas). El tamaño del fragmento multiplicado con estos cebadores es 98 pares de bases. Para la detección se utiliza una sonda de LNA etiquetada con FAM, con tres bases degeneradas y siete nucleótidos de LNA (ID. SEC. nº 2; véanse la Tabla 2 y la Figura 2).

30 Para el protocolo de RT-PCR en tiempo real y un paso se utilizó el kit AgPath-ID™ One-Step RT-PCR (Applied Biosystems).

El volumen total de reacción de 25 µl para la RT-PCR dúplex en tiempo real consiste en: 12,5 µl de tampón 2x para RT-PCR, 2,5 µl de agua exenta de RNasa, 1 µl de mezcla 25x de enzimas para RT-PCR, 2 µl de mezcla 3 de β-actina-HEX [para la detección del ácido nucleico de referencia (mRNA de β-actina)] y 2 µl de mezcla de NS5A-FAM.

35 La mezcla de NS5A específica para CSFV-FAM contiene 12,5 picomoles/µl de cebador directo, 10 picomoles/µl de cebador inverso y 4 picomoles/µl de sonda etiquetada con FAM. La mezcla para el testigo interno (mezcla 3 de β-actina) contiene 2,5 picomoles/µl de cada uno de los cebadores directo e inverso y 1,25 picomoles/µl de sonda etiquetada con HEX. Se añadieron cinco microlitros de RNA molde a 20 µl de mezcla magistral.

40 Para la RT-PCR en tiempo real se utilizó el siguiente perfil térmico: 10 minutos a 45 °C (transcripción inversa) y 10 minutos a 95 °C (inactivación de la RT/activación de la polimerasa) seguidos de 42 ciclos de multiplicación de DNA, consistente cada uno de ellos en 15 segundos de desnaturalización a 95 °C, 30 segundos de hibridación por bases complementarias (con recogida de datos de fluorescencia en el punto final) a 57 °C, y 35 segundos de elongación a 72 °C. Para comparar la sensibilidad y la especificidad se usaron tanto un sistema de RT-PCR en tiempo real específico para CSFV como uno "panpesti" (Hoffmann et al., 2005; Hoffmann et al., 2006). La RT-PCR en tiempo real se llevó a cabo usando un termociclador Mx3005P (Stratagene, La Jolla, California, EE.UU.).

45 **Tabla 2:** Cebadores y sondas utilizados en el sistema de RT-PCR en tiempo real para NS5A específica de CSFV, con testigo interno de mezcla 3 de β-actina. Los ácidos nucleicos bloqueados (LNA) de las secuencias de sonda están marcados con letra cursiva negrita. Se enumeran también los oligonucleótidos sintéticos utilizados para la generación de un patrón de RNA de NS5A.

| Nombre del cebador | Secuencia del cebador | Informaciones adicionales |
|--|--|--|
| CSF-9403.1-F-flap (cebador directo) | AATAAATCATAAGCCTGCWYGAAGCYATAC AA | |
| CSF-9501R (cebador inverso) | CTTYACATTCTTHRCRGTYTTYACYCT | Sistema específico para NS5A |
| 9448-LNA-FAM | TGATAYTRGGGTCYGA | |
| CSF 100F (directo) | ATGCCAYAGTAGGACTAGCA | |
| CSF 192R (inverso) | CTACTGACGACTGTCCTGTAC | Publicado por Hoffmann et al., 2005 |
| CSF 1-FAM | TGGCGAGCTCCCTGGGTGGTCTAAGT | |
| β -actina 3F (directo) | BTCCTTCCTGGGCATGGA | |
| β -actina 3R (inverso) | GRGGSGCGATGATCTTGAT | Publicado por Moniwa et al., 2007 |
| β -actina 3-HEX | TCCATCATGAAGTGYGACGTSGACATCCG | |

Las letras negritas se refieren a nucleótidos de LNA

Resultados de la RT-PCR dúplex en tiempo real para NS5A, con sistema de testigo interno

5 Con objeto de examinar la especificidad del nuevo ensayo en cuanto a CSFV, se usó el grupo de RNA de referencia EPIZONE, que contenía 13 muestras de RNA de CSFV y 17 muestras de RNA de BDV o BVDV de todos los genotipos representativos. A diferencia del sistema de CSF 1 de la técnica previa, todos los virus de CSF resultaron claramente positivos al usar el sistema de NS5A (Tabla 3). Ninguno de los RNAs de pestivirus no CSFV proporcionó productos de multiplicación detectables con el sistema de NS5A, lo que muestra la especificidad del método de acuerdo con la presente invención. Además, el sistema de NS5A mostró una sensibilidad mejorada con respecto al sistema de la técnica previa.

10 También se examinaron muestras de campo alemanas actuales de brotes recientes de CSFV en jabalíes con el nuevo ensayo de NS5A, confirmándose en todos los casos el estado previamente determinado de las muestras (Hoffmann et al., 2005a) (datos no mostrados). Además, puesto que los recientes brotes de CSF en Alemania y Europa se asociaron en su mayor parte con el genotipo 2.3 de CSFV, se extrajo el RNA de 20 recientes productos de aislamiento europeos de CSFV de ese genotipo y se examinaron con el método de acuerdo con la presente invención (sistema de NS5A). Todas las muestras fueron claramente calificadas positivas. Posteriormente, se diluyeron también estos RNAs por un factor de 1000 y se examinaron en el sistema de NS5A y el sistema de CSF 1 de la técnica previa, mostrándose una reducción del valor de Cq de aproximadamente diez (Tabla 4).

20 Con objeto de examinar adicionalmente la sensibilidad del sistema de NS5A, se analizaron un patrón de RNA y dos series de diluciones 1:10 que contenían RNA de CSFV de a) el genotipo 2.3 y b) el genotipo 1.1. En ambas series de diluciones, seis pasos se puntuaron positivos con el ensayo de NS5A, y los valores de Cq estuvieron dentro de 16 y 33 (genotipo 1.1), respectivamente, y 20 y 38 (genotipo 2.3). El sistema de CSF1 de la técnica previa examinado por comparación permitió detectar seis pasos de una serie de diluciones de la cepa C "Riems" y cinco pasos de la serie de diluciones de CSF 2.3 (datos no mostrados). En ambas series de diluciones, el ensayo de NS5A fue más sensible que el sistema de CSF 1 publicado por Hoffmann et al., 2005.

25 Además, se examinó una serie de diluciones de un nuevo patrón de RNA, generado por transcripción *in vitro* de un oligonucleótido sintético. Aquí se detectaron nueve pasos de dilución de 108 a 100 copias en la RT-PCR en tiempo real para NS5A (Figuras 3a y 3b).

30 Para una diagnosis rutinaria, se examinó finalmente el sistema de NS5A en un protocolo de RT-PCR dúplex en tiempo real con un sistema de testigo interno usando β -actina (mezcla 3). No se observó influencia notable alguna en cuanto a la sensibilidad o la especificidad en los ensayos dúplex en comparación con un ensayo simple para NS5A.

Tabla 3: Resultados de una RT-PCR en tiempo real en los sistemas de NS5A y CSF1 para muestras de CSFV del grupo de RNA de referencia EPIZONE. Se muestran los valores de Cq de RNAs de muestras sin diluir y diluidas 1:100.

ES 2 521 018 T3

| Muestra de CSFV | Sistema de NS5A | | Sistema de CSF 1 | |
|-------------------|-----------------|---------------|------------------|---------------|
| | Sin diluir | Diluido 1:100 | Sin diluir | Diluido 1:100 |
| Cepa C | 25,9 | 33,4 | 28,3 | 38,0 |
| Eystrup91 | 29,4 | 38,8 | 27,7 | 38,6 |
| Alfort187 | 29,5 | 37,7 | 27,3 | 37,4 |
| Koslov1128 | 28,7 | 36,0 | 27,2 | negativo |
| Brescia | 27,6 | 36,3 | 30,5 | 36,9 |
| Schweiz II | 29,8 | 38,9 | 28,4 | 38,7 |
| Pader | 28 | 36,6 | 27,2 | negativo |
| Bergen | 29,4 | 36,2 | 28 | 41,1 |
| D4886/82/Ro | 28,1 | 36,6 | 28,1 | 39,6 |
| Uelzen | 27,5 | 37,8 | 28,8 | 36,8 |
| Spante | 27 | 34,7 | 27,8 | 37,2 |
| Temblor Congénito | 25,6 | 33,2 | 30,4 | 35,5 |
| Kanagawa | 28,1 | 36,1 | 27,4 | 36,7 |

5 **Tabla 4:** Se examinaron veinte muestras europeas diferentes de RNA de CSFV del genotipo 2.3 con el nuevo sistema de RT-PCR en tiempo real para NS5A específica de CSFV, y se compararon los resultados con los del sistema de CSF 1. Se obtuvieron muestras de RNA por extracción de RNA del sobrenadante de cultivo celular con el minikit QIAamp® para RNA Vírico y se diluyeron por un factor de 1000 en tampón RSB50. Los valores de Cq son valores medios de muestras examinadas por duplicado.

| Muestra de genotipo 2.3 de CSFV | Sistema de NS5A | | Sistema de CSF 1 | |
|---------------------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| | Muestra original | Muestra diluida 1:1000 | Muestra original | Muestra diluida 1:1000 |
| CSF 1027 | 17,8 | 27,8 | 18,3 | 28,0 |
| CSF 1024 | 17,8 | 27,9 | 18,8 | 29,1 |
| CSF 0867 | 18,6 | 28,4 | 19,6 | 29,7 |
| CSF0866 | 25,1 | 34,9 | 23,5 | 33,8 |
| CSF0864 | 20,3 | 29,6 | 19,1 | 29,1 |
| CSF 1015 | 18,3 | 28,1 | 17,9 | 27,9 |
| CSF 0852 | 18,9 | 28,4 | 17,9 | 27,8 |
| CSF 0854 | 18,5 | 28,1 | 19,1 | 29,2 |
| CSF 0848 | 31,3 | 40,3 | 29,9 | 37,9/negativo |
| CSF 0847 | 20,9 | 30,8 | 20,6 | 30,6 |
| CSF 0840 | 23,6 | 33,8 | 23,0 | 33,2 |
| CSF 0838 | 26,7 | 36,8 | 27,0 | 38,1 |
| CSF 0822 | 18,6 | 28,3 | 19,4 | 29,4 |
| CSF 0821 | 18,1 | 27,8 | 19,5 | 29,9 |
| CSF 0817 | 18,8 | 28,6 | 20,6 | 30,9 |
| CSF 0807 | 22,2 | 32,2 | 20,2 | 30,4 |
| CSF 0804 | 20,1 | 30,1 | 19,8 | 30,0 |
| CSF 0085 | 18,7 | 28,7 | 20,1 | 30,9 |
| CSF 0737 | 18,6 | 28,7 | 19,9 | 30,6 |
| CSF 0727 | 20,2 | 30,1 | 21,6 | 31,4 |

10 **Tabla 5:** Resultados de una RT-PCR en tiempo real en el sistema de NS5A de acuerdo con la presente invención y los sistemas Pan-Pesti para cepas de pestivirus no CSFV del grupo de RNA de referencia EPIZONE. Se muestran los valores de Cq.

| Genotipo de pestivirus | Cepa de pestivirus | Sistema de NS5A | Sistema Pan-Pesti Hoffmann et al., 2006 |
|------------------------|--------------------|-----------------|---|
| BDV | Moredun | neg | 34,16 |
| BDV | Rudolph | neg | 29,09 |
| BDV | Gifhorn | neg | 32,01 |
| BDV | Isard | neg | 32,01 |
| BVDV-1 | NADL | neg | 32,24 |
| BVDV-1 | Paplitz | neg | 29,19 |
| BVDV-1 | PI809 | neg | 30,55 |
| BVDV-1 | NC3807-1251/1 | neg | 30,5 |
| BVDV-1 | Egbert | neg | 34,64 |
| BVDV-1 | BO806-17 | neg | 30,14 |
| BVDV-1 | BO807-3 | neg | 29,7 |
| BVDV-1 | NC3807-8757 | neg | 31,08 |
| BVDV-2 | 8644 | neg | 32,8 |
| BVDV-2 | Bure | neg | 35,04 |
| BVDV-2 | Walter | neg | 31,78 |
| BVDV-2 | PO1600 | neg | 30,34 |
| Pestivirus | Hobi | neg | 33,57 |
| Pestivirus | Giraffe H138 | neg | 36,19 |

Haegeman et al. y Wong et al.

5 Para Haegeman et al., se examinó un grupo de RNA de 13 cepas de CSFV de todos los genotipos representativos (amablemente proporcionado por el German Federal Research Institute for Animal Health). Sólo 6 de 13 cepas de CSFV pudieron ser claramente detectadas positivas con un producto de multiplicación positivo a 322 pares de bases. Las cepas Eystруп, Pader y Bergen no mostraron los productos de multiplicación correctos, y no se pudieron multiplicar en lo más mínimo 4 cepas (Brescia, Schweiz II, D4886/82/Ro y Temblor Congénito) (véanse las figuras).

Para Wong et al., se examinó un grupo de RNA de 4 cepas de CSFV (amablemente proporcionado por el German Federal Research Institute for Animal Health) (véanse las figuras).

Leyendas de las Figuras

10 Figura 1: Vista general del genoma de CSFV con las proteínas expresadas y una escala que indica las respectivas posiciones nucleotídicas en el genoma. Las cifras y flechas negras muestran las posiciones genómicas aproximadas examinadas durante el desarrollo del nuevo sistema de RT-PCR en tiempo real, específico para CSFV.

15 Figura 2: Multialineamiento Clustalw2/BioEdit de diferentes genomas de CSFV procedentes de la base de datos del NCBI y productos de aislamiento de CSFV recién secuenciados. La numeración de los nucleótidos se refiere a la secuencia genómica completa de la cepa AF326963 "Eystруп" (ID. SEC. nº 1).

Figura 3: a) Gráfico de multiplicación de una serie de diluciones 1:10 del patrón de RNA de NS5A recién desarrollado y examinado con el sistema de RT-PCR en tiempo real para NS5A específica de CSFV. Los números en las curvas indican la cantidad inicial (número de copias) de genomas de CSFV añadidos a la mezcla de reacción. b) Gráfico de curva patrón del patrón de RNA, a partir de la RT-PCR en tiempo real específica para NS5A.

20 Figura 4: Haegeman et al. ["Characterisation of the discrepancy between PCR and virus isolation in relation to classical swine fever virus detection", Journal of Virological Methods, volumen 136, nº 1-2, septiembre de 2006 (2006-09), páginas 44-50] describen un ensayo de PCR para la detección de CSFV. La región NS5A es la diana para una PCR diagnóstica con la pareja de cebadores CSF-8581 y CSF-8902. Los autores afirmaron que esta PCR permitía detectar el CSFV, aunque sugerían examinar un grupo de diferentes sistemas de PCR para unos mejores resultados.

25 El gel muestra el examen del RNA de 13 cepas de CSFV diferentes en una PCR estándar con la pareja de cebadores CSF-8581 / CSF-8902 (kit QIAGEN One Step RT-PCR; programa de RT-PCR: 30 minutos a 45 °C, 15 minutos a 95 °C, 50 ciclos: 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 57 °C, 1 minuto a 72 °C; 10 minutos a 72 °C).

30 En la Tabla 6 siguiente se muestra una comparación del examen de 13 cepas de CSFV mediante RT-PCR en tiempo real (i) de acuerdo con la invención y, por contraste, (ii) con los cebadores CSF-8581 / CSF-8902 (Haegeman

ES 2 521 018 T3

et al.). Para Haegeman et al. sólo se pudieron detectar 6 de las 13 cepas de CSFV. Por contraste, para la presente invención se detectaron exitosamente todas las cepas de CSFV examinadas. Por lo tanto, el método publicado de Haegeman et al. no es adecuado para la detección específica del virus de la peste porcina clásica.

| Epizone Nº de grupo | Cepa de CSFV | Genotipo | Método según la invención | | RT-PCR estándar de Haegeman Resultado de la PCR |
|------------------------|----------------------|----------|---------------------------|-----------|--|
| | | | Valor de Ct | Resultado | |
| 1 | Cepa C | 1.1 | 30,99 | pos | pos |
| 2 | Eystrup91 | 1.1 | 33,71 | pos | neg |
| 3 | Alfort187 | 1.1 | 32,46 | pos | pos |
| 4 | Koslov1128 | 1.2 | 31,66 | pos | pos |
| 5 | Brescia | 1.2 | 32,50 | pos | neg |
| 6 | Schweiz II | 2.1 | 32,35 | pos | neg |
| 7 | Pader | 2.1 | 33,21 | pos | neg |
| 8 | Bergen | 2.2 | 32,95 | pos | neg |
| 9 | D4886/82/Ro | 2.2 | 32,31 | pos | neg |
| 10 | Uelzen | 2.3 | 29,77 | pos | pos |
| 11 | Spante | 2.3 | 30,64 | pos | pos |
| 12 | Temblor Congénito | 3.1 | 29,03 | pos | neg |
| 13 | Kanagawa | 3.4 | 29,94 | pos | pos |

5 Figura 5: Examen del RNA de 4 cepas de CSFV diferentes mediante PCR estándar y los cebadores P2/C4 de acuerdo con Wong et al.; testigo negativo: agua ((kit QIAGEN One Step RT-PCR; programa de RT-PCR: 30 minutos a 45 °C, 15 minutos a 95 °C, 40 ciclos: 30 segundos a 94 °C, 60 segundos a 50 °C, 2 minutos a 72 °C, 7 minutos a 72 °C). Ningún producto de multiplicación específico resultó detectable.

10 Figura 6: Examen del RNA de 4 cepas de CSFV diferentes mediante PCR estándar y los cebadores P3/C5 de acuerdo con Wong et al.; testigo negativo: agua ((kit QIAGEN One Step RT-PCR; programa de RT-PCR: 30 minutos a 45 °C, 15 minutos a 95 °C, 40 ciclos: 30 segundos a 94 °C, 60 segundos a 45 °C, 2 minutos a 72 °C, 7 minutos a 72 °C).

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la presencia de un virus de la peste porcina clásica (CSFV) en un sujeto, que comprende la operación siguiente:
 - 5 – detección de la región NS5A de al menos un genoma de virus de la peste porcina clásica (CSFV) en una muestra procedente de dicho sujeto; por medio de la multiplicación de ácido nucleico, en donde la multiplicación se lleva a cabo utilizando al menos un cebador para multiplicación de CSFV, en donde dicho al menos un cebador para multiplicación de CSFV comprende un extremo 3' que consiste en al menos los 6 últimos nucleótidos según la secuencia de ID. SEC. nº 3 o ID. SEC. nº 4, y

10 en donde la detección de la región NS5A del al menos un genoma de virus de la peste porcina clásica (CSFV) se atribuye a la presencia de un virus de la peste porcina clásica (CSFV) en dicho sujeto.
2. El método según la Reivindicación 1, en donde la detección de la región NS5A comprende el uso de una sonda de ácido nucleico que se hibrida con la región NS5A de al menos un genoma de virus de la peste porcina clásica (CSFV) y/o con un ácido nucleico complementario de la al menos una región NS5A del al menos un genoma de virus de la peste porcina clásica (CSFV).
- 15 3. El método según la Reivindicación 2, en donde la sonda de ácido nucleico se hibrida con cualquiera de las secuencias del grupo que consiste en las ID. SEC. números 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 y 41, o fragmentos de las mismas.
4. El método según la Reivindicación 2 o 3, en donde la sonda de ácido nucleico comprende al menos una modificación para aumentar la estabilidad del híbrido de sonda-diana.
- 20 5. El método según cualquiera de las Reivindicaciones 2 a 4, en donde la sonda de ácido nucleico comprende al menos 4 modificaciones para aumentar la estabilidad del híbrido de sonda-diana y en donde dichas modificaciones son ácidos nucleicos bloqueados (LNA).
6. El método según cualquiera de las Reivindicaciones 2 a 5, en donde la sonda de ácido nucleico comprende la secuencia de ID. SEC. nº 2.
- 25 7. El método según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6, en donde, antes de la detección de la región NS5A del al menos un genoma de virus de la peste porcina clásica (CSFV), se multiplica dicho genoma del al menos un virus de la peste porcina clásica (CSFV) o partes del mismo.
8. El método según la Reivindicación 7, en donde el producto de multiplicación comprende la secuencia según la ID. SEC. nº 2.
- 30 9. El método según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 8, en donde la multiplicación y/o la detección de la región NS5A se llevan a cabo mediante RT-PCR en tiempo real.
10. Un kit para determinar la presencia de un virus de la peste porcina clásica (CSFV) en un sujeto, que comprende:
 - 35 – una sonda de ácido nucleico, en donde la sonda de ácido nucleico es capaz de hibridarse con la región NS5A del genoma de al menos un virus de la peste porcina clásica (CSFV) y/o con un ácido nucleico complementario de la región NS5A del genoma de al menos un virus de la peste porcina clásica (CSFV), en donde la sonda de ácido nucleico comprende la secuencia de ID. SEC. nº 2 y al menos un cebador para la secuenciación de la región NS5A del al menos un virus de la peste porcina clásica (CSFV) o partes de la misma.
- 40 11. El kit según la Reivindicación 10, que comprende además al menos un cebador para multiplicación de CSFV para multiplicar el genoma de al menos un virus de la peste porcina clásica (CSFV) o partes del mismo, en donde la parte multiplicada del genoma de dicho al menos un virus de la peste porcina clásica (CSFV) comprende la secuencia de ID. SEC. nº 2.
12. Una sonda de ácido nucleico con una longitud de 16 a 40 nucleótidos, en donde el ácido nucleico comprende la secuencia según la ID. SEC. nº 2.
- 45 13. Uso de un ácido nucleico que comprende un extremo 3' que consiste en al menos los 6 últimos nucleótidos según la secuencia de ID. SEC. nº 3 o ID. SEC. nº 4, en donde el ácido nucleico es capaz de multiplicar la región NS5A de al menos un CSFV o fragmentos de la misma, en un método según las Reivindicaciones 1 a 9.
14. Uso de un kit según la Reivindicación 10 o 11 o un ácido nucleico según la Reivindicación 12 en un método

según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

Figura 1

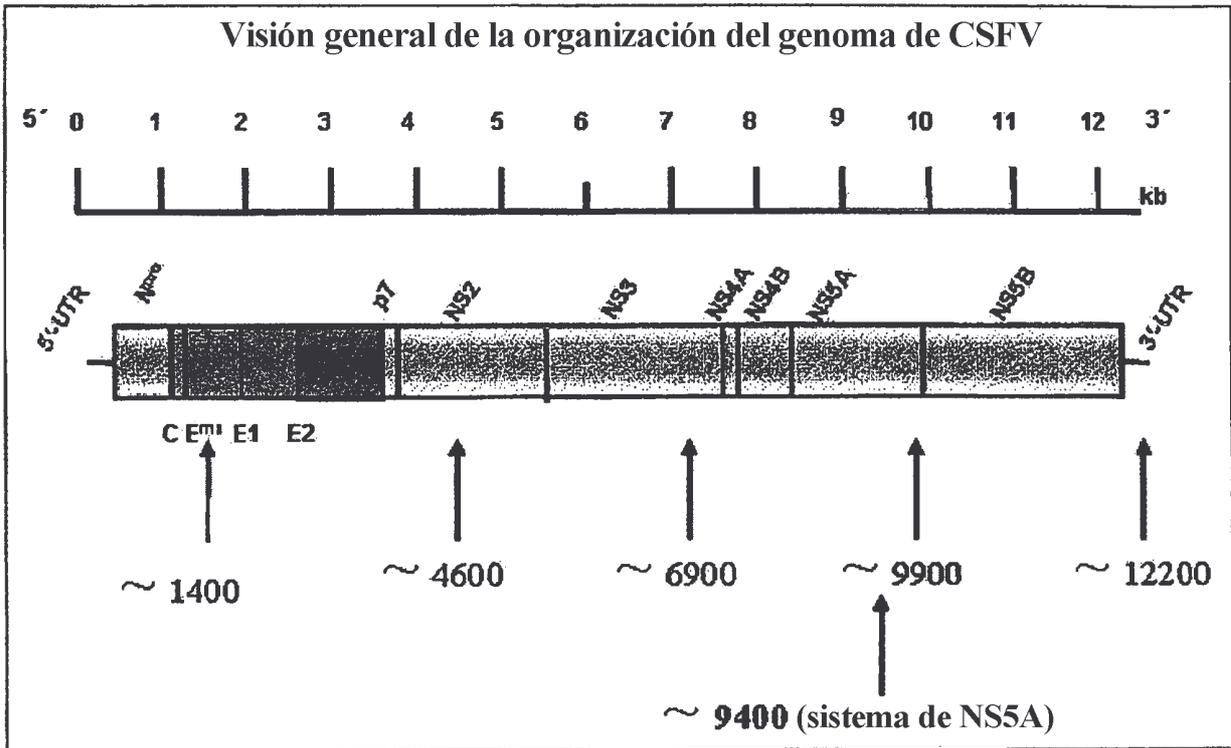
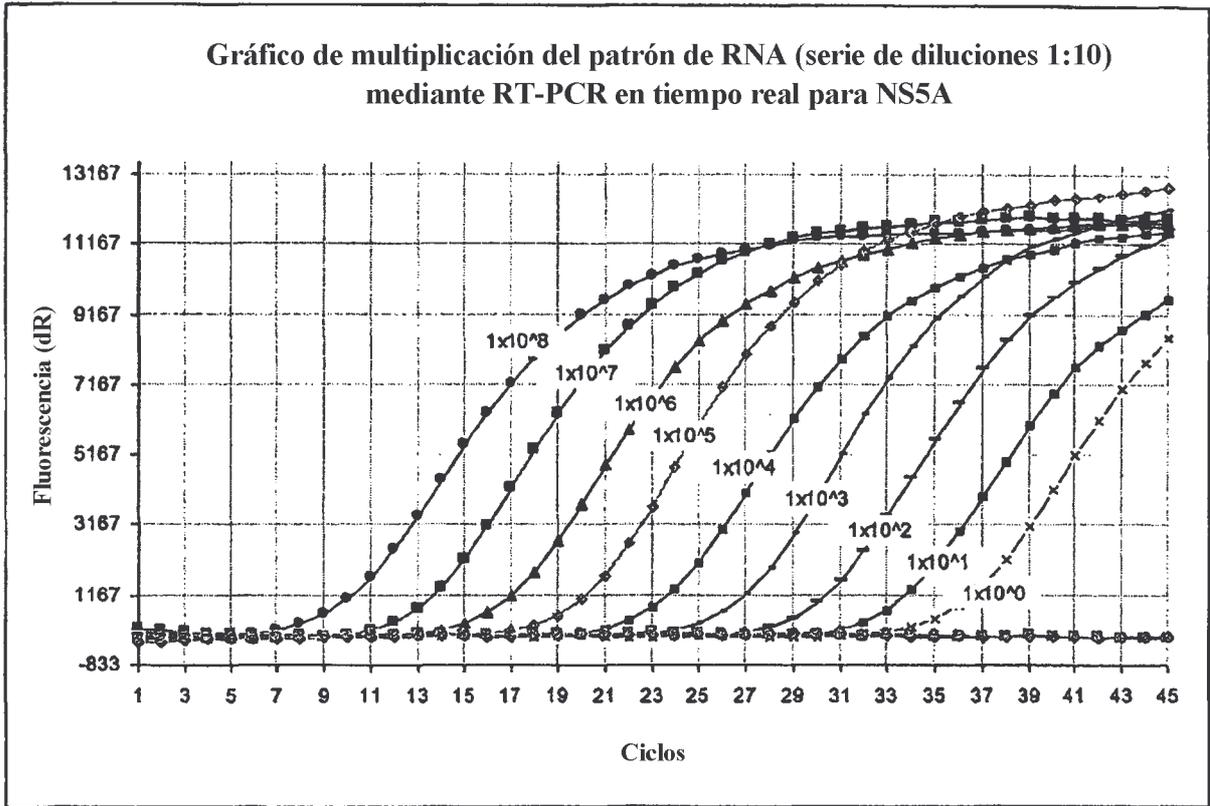


Figura 3

a)



b)

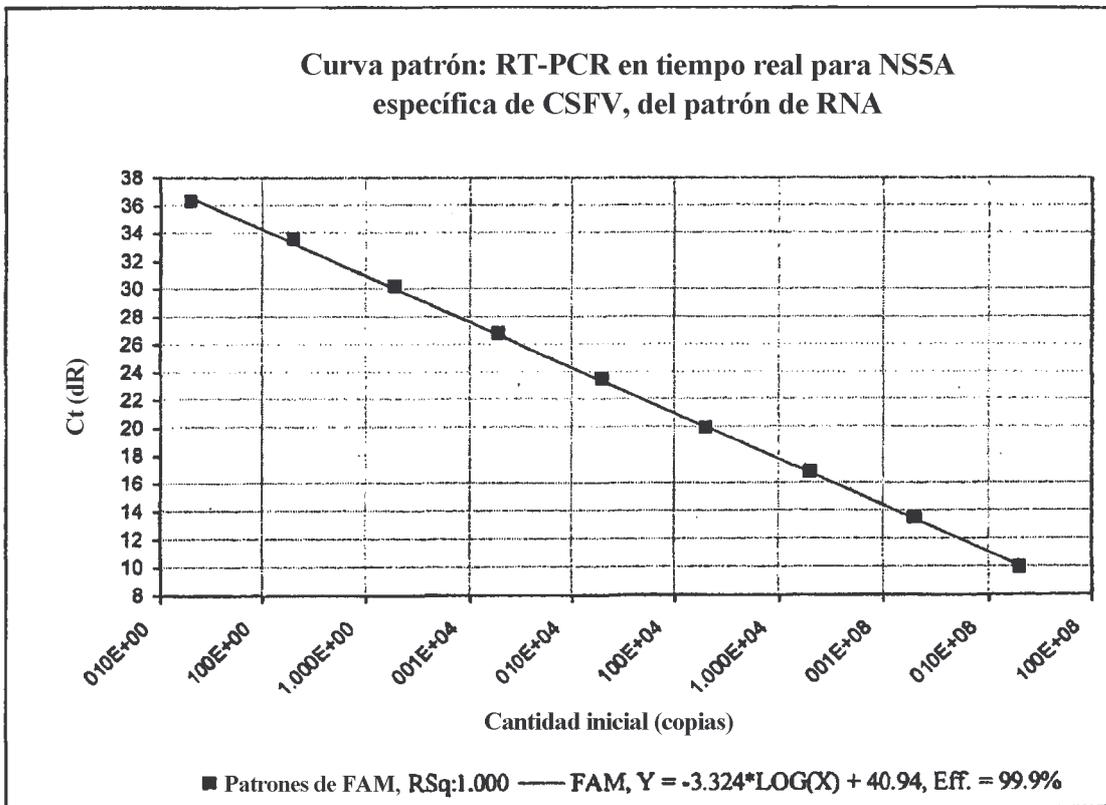


Figura 4

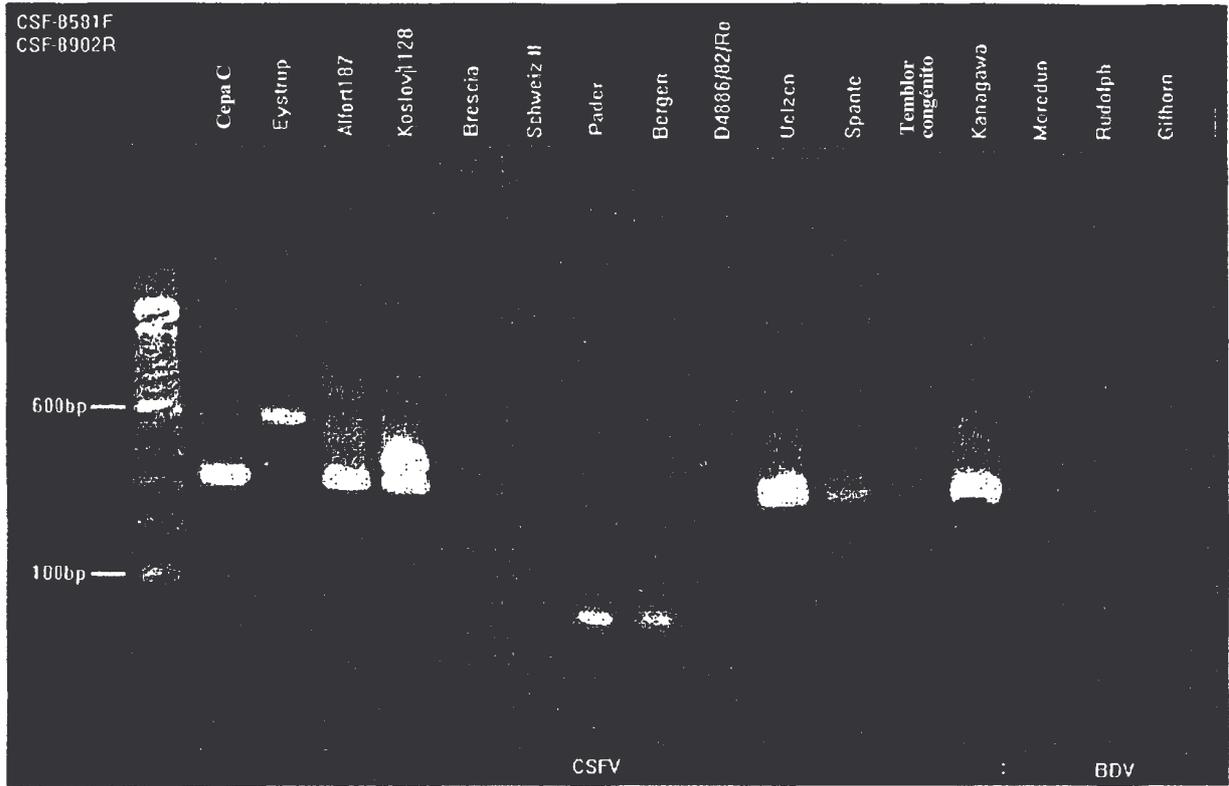


Figura 5

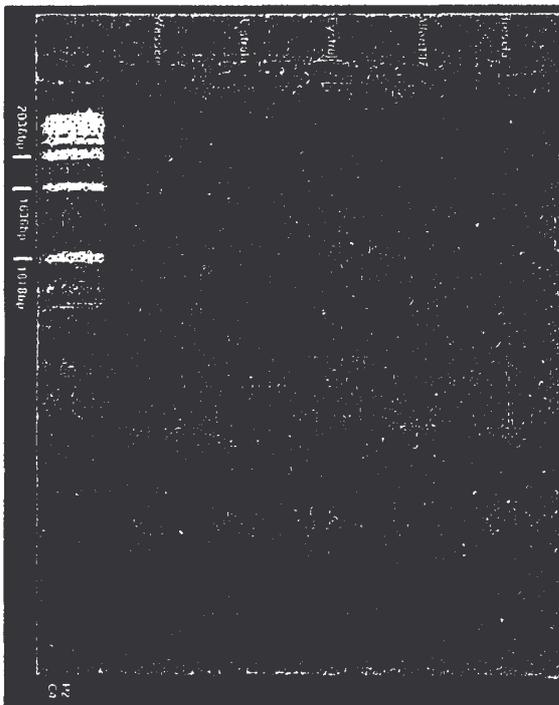


Figura 6

