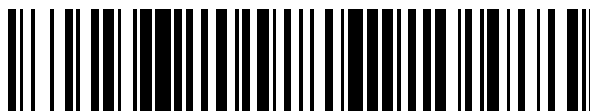


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 048**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12Q 1/70** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2004 E 04724275 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.09.2014 EP 1611254**

54 Título: **Composiciones y métodos para la detección de ciertos flavivirus, incluidos los miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa**

30 Prioridad:

**31.03.2003 US 459491 P**

**12.03.2004 US 552454 P**

**22.03.2004 US 555530 P**

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

**03.12.2014**

73 Titular/es:

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

**GRENZACHERSTRASSE 124**

**4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**YOUNG, KAREN, K., Y.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 524 048 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para la detección de ciertos flavivirus, incluidos los miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa

5 Antecedentes de la invención

10 La familia Flaviviridae y el género Flavivirus abarca un número de virus que son patógenos humanos potencialmente letales. Tales virus incluyen el virus del dengue, virus de la fiebre amarilla, el virus de Modoc y los virus del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa. El serogrupo del virus de la encefalitis japonesa incluye varios virus estrechamente relacionados, como el virus de la encefalitis japonesa (VEJ), el virus del Nilo Occidental (VNO), virus de la encefalitis de San Luis, el virus de la encefalitis del Valle de Murray y el virus de Kunjin. El virus de Kunjin se refiere a menudo como una variante del VNO por el grado de conservación de secuencia entre estos dos virus. Las cepas caracterizadas del VNO se han dividido en dos grupos, linaje I y linaje II, basado en el análisis de secuencias.

15 En 1999, se reportó el primer caso de infección por el VNO humano en los EE.UU. Desde entonces, se han producido epidemias anuales. En agosto de 2002, se confirmó la transmisión del virus del Nilo Occidental a través de vías diferentes a las picaduras de mosquitos cuando cuatro receptores de órganos se infectaron por un solo donante de órganos. El virus, desde entonces, se ha encontrado que es transmisible por transfusión de productos sanguíneos (21 casos confirmados) y por la leche materna.

20 La detección de la infección por el VNO activo es difícil, ya que los síntomas no son específicos y los anticuerpos específicos del virus por lo general se pueden detectar sólo después de la fase de viremia. Por otra parte, la IgM específica del VNO puede persistir durante más de un año, por lo que es difícil diferenciar entre infección activa y exposición en el pasado. Los métodos de detección más sensibles, como la detección directa de ácidos nucleicos virales, son necesarios. La detección de ácidos nucleicos virales presenta un método más sensible para la detección temprana de la infección por VNO y otros flavivirus que los métodos serológicos actualmente en uso.

25 Otros flavivirus, entre ellos miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa, son también patógenos humanos. Estos patógenos incluyen miembros del serogrupo de la encefalitis japonesa, tales como el virus de la encefalitis japonesa, el virus de la encefalitis de San Louis (VESL), y el virus de la encefalitis del valle de Murray, y otros flavivirus como el virus del dengue, virus de la fiebre amarilla y el virus de Modoc. La transmisión de los miembros del serogrupo de virus de la encefalitis japonesa distinta al VNO a través de productos sanguíneos permanece indocumentado. Sin embargo, dichas transmisiones son posibles, y cada vez más probable que ocurra, ya que estos virus están más diseminados. Por lo tanto, son altamente deseables nuevos ensayos específicos y sensibles que sean capaces de detectar estos flavivirus que son patógenos humanos. Además, un solo ensayo que sea capaz de detectar varios miembros del serogrupo de la encefalitis japonesa también sería muy deseable.

30 Breve resumen de la invención

35 La presente invención proporciona equipos para detectar la presencia de un ácido nucleico de ciertos flavivirus, incluyendo varios miembros del serogrupo de virus de la encefalitis japonesa. Los equipos de la presente invención se basan, en parte, en el descubrimiento de oligonucleótidos que pueden ser utilizados por ejemplo, como cebadores y sondas para detectar la presencia de miembros del serogrupo de virus de la encefalitis japonesa. Por ejemplo, el virus del Nilo occidental, el virus Kunjin, el virus de la encefalitis japonesa, el virus de la encefalitis de San Louis (VESL) y el virus de la encefalitis del valle de Murray se pueden detectar con los oligonucleótidos de la invención. Además, los oligonucleótidos descritos se pueden utilizar para detectar flavivirus fuera del serogrupo de virus de la encefalitis japonesa, incluyendo, por ejemplo, el virus de Dengue, el virus de la leucoencefalitis del Myotis de Montana, el virus Modoc, y el virus de la fiebre amarilla. Los oligonucleótidos descritos en este documento pueden ser utilizados como cebadores y sondas para detectar estos flavivirus de acuerdo con los métodos descritos en este documento.

40 La invención se refiere a un equipo para la detección de un ácido nucleico de varios miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa en una muestra biológica en condiciones de hibridación restrictivas, que comprende:

- 55 a) un primer oligonucleótido cebador que comprende el Id. de Sec. N°: 8 o un complementario del mismo;  
b) un segundo oligonucleótido cebador que comprende el Id. de Sec. N°: 15 o un complementario del mismo; y  
c) un tercer oligonucleótido de sonda marcado de forma detectable que comprende el Id. de Sec. N°: 28, o el complementario del mismo,

60 en el que el marcador detectable en el tercer oligonucleótido de sonda es una porción fluorescente.

65 De acuerdo con la invención, la porción detectable en el tercer oligonucleótido sonda es una porción fluorescente. En ciertas realizaciones, la porción fluorescente se puede seleccionar del grupo que consiste de colorantes de la familia de la fluoresceína, colorantes de la familia de la polihalofluoresceína, colorantes de la familia de la hexaclorofluoresceína, colorantes de la familia de la cumarina, colorantes de la familia de la rodamina, colorantes de

la familia de la cianina, colorantes de la familia de la oxazina, colorantes de la familia de la tiazina, colorantes de la familia de la escuarina, colorantes de la familia de los lantánidos quelados y colorantes de la familia de la BODIPY®. En una realización preferida, la porción fluorescente es 6-carboxifluoresceína.

5 En ciertas realizaciones, el oligonucleótido sonda marcado de forma detectable comprende una porción atenuadora. La porción atenuadora puede ser cualquier porción atenuadora conocida para un experto en la materia sin limitación. En ciertas realizaciones, la porción atenuadora se puede seleccionar del grupo que consiste de colorantes de la familia de la fluoresceína, colorantes de la familia de la polihalofluoresceína, colorantes de la familia de la hexaclorofluoresceína, colorantes de la familia de la cumarina, colorantes de la familia de la rodamina, colorantes de la familia de la cianina, colorantes de la familia de la oxazina, colorantes de la familia de la tiazina, colorantes de la familia de la escuarina, colorantes de la familia de los lantánidos quelados y colorantes de la familia de la BODIPY®, y porciones atenuadoras no fluorescentes. En ciertas realizaciones, las porciones atenuadoras no fluorescentes pueden ser colorantes de la familia de los BHQ™, Iowa Negro™, o Dabcyl. En una realización preferida, la porción atenuadora es Cy5™.

15 También se describe un método para detectar un ácido nucleico de varios miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa. En el método, un oligonucleótido de la invención marcado de forma detectable, que se describe en detalle más adelante, se utiliza como una sonda para detectar un ácido nucleico de varios miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa. La sonda se hibrida con un ácido nucleico de Id. de Sec. N°: 16 o el complementario del mismo, que es una secuencia de una región conservada en la región no traducida 3' de los ácidos nucleicos de flavivirus que se pueden detectar según la presente invención. En ciertas realizaciones de la invención, una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde con actividad exonucleasa 5'-3', fragmenta la sonda, en las que la fragmentación de la sonda marcada de forma detectable indica la presencia del ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa.

20 También se describen los métodos que comprenden amplificar el ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa en presencia de una sonda de ácido nucleico marcada de forma detectable, en el que la sonda de ácido nucleico marcada de forma detectable comprende al menos 20 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 17, o el complementario del mismo. En ciertos aspectos, los métodos comprenden amplificar el ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa en presencia de un oligonucleótido marcado de forma detectable, en el que el oligonucleótido marcado de forma detectable comprende el Id. de Sec. N°: 18, o el complementario del mismo. El Id. de Sec. N°: 18 es una secuencia de oligonucleótido que se hibrida con una región conservada de los ácidos nucleicos de flavivirus actualmente conocidos que se pueden detectar según la presente invención. En aún otros aspectos, los métodos comprenden amplificar el ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa en presencia de una sonda de ácido nucleico marcada de forma detectable, en el que la sonda marcada de forma detectable comprende el Id. de Sec. N°: 28, o el complementario de los mismos. El Id. de Sec. N°: 28 es una secuencia específica de ácido nucleico sonda que se puede utilizar para detectar los flavivirus.

30 Un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa se puede detectar con un oligonucleótido como se describe aquí. En este documento, un primer oligonucleótido que se hibrida con un ácido nucleico de Id. de Sec. N°: 1 se puede utilizar como un cebador para amplificar un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa. El Id. de Sec. N°: 1 se basa en el descubrimiento de secuencias conservadas entre los miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa que puede ser detectado. Se describe, que el primer cebador comprende al menos 16 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 2. Además se describe, que el primer cebador comprende el Id. de Sec. N°: 3. El Id. de Sec. N°: 3 es una secuencia de cebador basado en el descubrimiento de una región conservada de todas las secuencias conocidas en la actualidad de los miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa que se pueden detectar. Según la invención, el primer cebador comprende el Id. de Sec. N°: 8. El Id. de Sec. N°: 8 es una secuencia de cebador específico que se puede utilizar para amplificar ácidos nucleicos de miembros del serogrupo de la encefalitis japonesa de acuerdo con la presente invención.

35 Se describe, que un segundo oligonucleótido que se hibrida con un ácido nucleico de Id. de Sec. N°: 9 se puede utilizar como un cebador para amplificar un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa. El Id. de Sec. N°: 9 es una secuencia consenso basada en el descubrimiento de secuencias conservadas entre los miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa que pueden ser detectado. Además se describe, que el segundo cebador comprende al menos 16 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 10. El Id. de Sec. N°: 10 es el complementario del Id. de Sec. N°: 9. También se describe, que el segundo cebador comprende el Id. de Sec. N°: 11. El Id. de Sec. N°: 11 es una secuencia de cebador basado en el descubrimiento de una región conservada de todas las secuencias conocidas en la actualidad de los miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa que se pueden detectar. Según la invención, el segundo cebador comprende el Id. de Sec. N°: 15. El Id. de Sec. N°: 15 es una secuencia de cebador específico que se puede utilizar para amplificar ácidos nucleicos de miembros del serogrupo de la encefalitis japonesa de acuerdo con la presente invención. En ciertas realizaciones, el primer y segundo cebadores pueden usarse juntos en métodos de detección de un ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa.

Se describen métodos que comprenden amplificar el ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa en presencia de una sonda de ácido nucleico marcado de forma detectable que comprende una porción fluorescente y una porción atenuadora. En el presente documento, la fragmentación de la sonda marcada de forma detectable por una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde con actividad nucleasa 5'-3' separa la porción fluorescente de la porción atenuadora. En particular, la fragmentación de la sonda y por lo tanto la presencia del ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa se puede detectar mediante el control de emisión de fluorescencia.

También se describe que un ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa se puede detectar mediante hibridación del ácido nucleico a un cebador o sonda de la invención que se une covalentemente a un soporte sólido. En este documento, el ácido nucleico puede ser detectado mediante hibridación de un cebador marcado de forma detectable o sonda con el ácido nucleico. Además, el ácido nucleico se puede detectar directamente mediante la incorporación de porciones detectables en el ácido nucleico.

También se describe que un ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa se puede detectar usando una nanopartícula con dos o más cebadores o sondas de la invención unidos covalentemente a la misma. También se describe que un ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa se puede detectar usando un ensayo de amplificación por círculo rodante con cebadores y / o sondas como se describe aquí. Se describe además, que un ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa se puede detectar usando un ensayo de amplificación por desplazamiento de hebra con dos cebadores como se describe aquí. Se describe además, que un ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa se puede detectar usando un ensayo de amplificación mediada por transcripción usando cebadores y / o sondas como se describen aquí. Se describe además, que un ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa se puede detectar usando un ensayo de amplificación basada en secuencias de ácido nucleico (NASBA), usando los cebadores y / o sondas como se describen en el presente documento. También se describe que un ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa se puede detectar usando PCR con cebadores de diagnóstico y / o sondas como se describen aquí.

El primer y segundo cebadores y una sonda como se describe en el presente documento se pueden utilizar conjuntamente en los métodos de detección de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa. En el presente documento, un ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa se puede detectar usando una sonda como se describe aquí que comprende una baliza molecular. También se describe que un ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa se puede detectar usando un ensayo de amplificación basado en ácidos nucleicos secuenciados con cebadores y / o sondas como se describe en el presente documento. Se describe además, que un ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa se puede detectar mediante la amplificación del ácido nucleico con dos cebadores como se describe aquí, y luego detectar el ácido nucleico con una sonda marcada de forma detectable, como se describe aquí. Se describe además, que un ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa se puede detectar usando un ensayo dot blot con cebadores y / o sondas como se describe aquí. Además, un ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa se puede detectar usando un ensayo dot blot reverso con cebadores y / o sondas como se describe aquí. También se describe que un ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa se puede detectar usando una sonda multivalente tal como un dendrímero.

Además de los métodos anteriores, también se describen los cebadores de ácidos nucleicos y sondas para la detección de un ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa. En ciertos aspectos, se describe un cebador de ácido nucleico para la detección de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa. También se describe, que el cebador comprende un ácido nucleico que se hibrida con un ácido nucleico de Id. de Sec. N°: 1. También se describe, que el cebador de ácido nucleico comprende al menos 16 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 2 o el ácido nucleico cebador comprende el Id. de Sec. N°: 3. Según la invención, el cebador de ácido nucleico comprende el Id. de Sec. N°: 8.

En ciertas realizaciones, el cebador de ácido nucleico comprende N<sup>6</sup>-alquil-desoxiadenosina en la posición 23 del Id. de Sec. N°: 8. En una realización específica, el cebador de ácido nucleico comprende N<sup>6</sup>-metil-desoxiadenosina en la posición 23 del Id. de Sec. N°: 8. En ciertas realizaciones, el cebador de ácido nucleico comprende N<sup>6</sup>-alquil-desoxiadenosina en la posición 24 del Id. de Sec. N°: 8. En una realización específica, el cebador de ácido nucleico comprende N<sup>6</sup>-terc-butil-bencil-desoxiadenosina en la posición 24 del Id. de Sec. N°: 8. En ciertas realizaciones, el cebador de ácido nucleico comprende N<sup>6</sup>-alquil-desoxiadenosina en las posiciones 23 y 24 del Id. de Sec. N°: 8. En otra realización específica, el cebador de ácido nucleico comprende N<sup>6</sup>-metil-desoxiadenosina en la posición 23 del Id. de Sec. N°: 8 y N<sup>6</sup>-terc-butil-bencil-desoxiadenosina en la posición 24 del Id. de Sec. N°: 8.

También se describe un cebador de ácido nucleico para la detección de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa. También se describe, que el cebador comprende un ácido nucleico que se hibrida con un ácido nucleico de Id. de Sec. N°: 9. También se describe, que el cebador de ácido nucleico comprende al menos 16 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 10 o que el cebador de ácido nucleico comprende el Id. de Sec. N°: 11. Según la invención, el cebador de ácido nucleico comprende el Id. de Sec. N°: 15.

También se describe una sonda de ácido nucleico para la detección de un ácido nucleico de un flavivirus. Los ácidos nucleicos de Flavivirus que pueden detectarse con la sonda incluyen, por ejemplo, miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa, el virus de Dengue, el virus de la fiebre amarilla, el virus de la leucoencefalitis del Myotis de Montana, y el virus Modoc. También se describe que la sonda comprende un ácido nucleico que se hibrida con un ácido nucleico de Id. de Sec. N°: 16, o el complementario del mismo. También se describe que la sonda de ácido nucleico comprende al menos 20 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 17, o el complementario del mismo o la sonda de ácido nucleico comprende el Id. de Sec. N°: 18, o el complementario del mismo. Según la invención, la sonda de ácido nucleico comprende el Id. de Sec. N°: 28, o el complementario del mismo.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona una sonda de ácido nucleico que comprende una porción fluorescente y una porción atenuadora. En ciertas realizaciones, la porción fluorescente se posiciona en relación con la porción atenuadora de manera que un fotón emitido por la porción fluorescente es absorbido por la porción atenuadora cuando la sonda está intacta. La fragmentación de la sonda por una enzima con actividad nucleasa 5' separa la porción fluorescente de la porción atenuadora de manera que un fotón emitido por la porción fluorescente se puede detectar.

La invención proporciona un equipo para la detección de un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa. En este documento, el equipo comprende una combinación de los cebadores y sondas tal como se define en las reivindicaciones. También se describe un equipo que comprende un primer cebador de ácido nucleico que hibrida con un ácido nucleico de Id. de Sec. N°: 1; un segundo cebador de ácido nucleico que hibrida con un ácido nucleico de Id. de Sec. N°: 9; y una sonda de ácido nucleico que hibrida con un ácido nucleico de Id. de Sec. N°: 16, o el complementario del mismo.

Además se describe, que el primer cebador de ácido nucleico de los equipos comprende al menos 16 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 2. También se describe, que el primer cebador de ácido nucleico comprende el Id. de Sec. N°: 3. Según a la invención, el primer cebador de ácido nucleico comprende el Id. de Sec. N°: 8. En ciertas realizaciones, el primer cebador de ácido nucleico comprende N<sup>6</sup>-alquil-desoxiadenosina en la posición 23 del Id. de Sec. N°: 8. En una realización específica, el primer cebador de ácido nucleico comprende N<sup>6</sup>-metil-desoxiadenosina en la posición 23 del Id. de Sec. N°: 8. En ciertas realizaciones, el primer cebador de ácido nucleico comprende N<sup>6</sup>-alquil-desoxiadenosina en la posición 24 del Id. de Sec. N°: 8. En una realización específica, el primer cebador de ácido nucleico comprende N<sup>6</sup>-terc-butil-bencil-desoxiadenosina en la posición 24 del Id. de Sec. N°: 8. En ciertas realizaciones, el primer cebador de ácido nucleico comprende N<sup>6</sup>-alquil-desoxiadenosina en las posiciones 23 y 24 del Id. de Sec. N°: 8. En otra realización específica, el primer cebador de ácido nucleico comprende N<sup>6</sup>-metil-desoxiadenosina en la posición 23 del Id. de Sec. N°: 8 y N<sup>6</sup>-terc-butil-bencil-desoxiadenosina en la posición 24 del Id. de Sec. N°: 8.

Se describe de forma adicional, que el segundo cebador de ácido nucleico de los equipos comprende al menos 16 nucleótidos consecutivos del Id. de Sec. N°: 10, o que el segundo cebador de ácido nucleico comprende el Id. de Sec. N°: 11. Según la invención, el segundo cebador de ácido nucleico comprende el Id. de Sec. N°: 15.

Se describe además que la sonda de ácido nucleico de los equipos comprende al menos 20 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 17, o el complementario del mismo o que la sonda de ácido nucleico comprende el Id. de Sec. N°: 18, o el complementario del mismo. Según la invención, la sonda de ácido nucleico comprende el Id. de Sec. N°: 28, o el complementario del mismo.

En ciertas realizaciones, los equipos de la invención comprenden un oligonucleótido útil como una sonda de ácido nucleico, en el que uno o más porciones detectables está unida a la sonda de ácido nucleico. Según la invención, el marcador detectable en el oligonucleótido sonda es una porción fluorescente. En ciertas realizaciones, la porción fluorescente se puede seleccionar del grupo que consiste de colorantes de la familia de la fluoresceína, colorantes de la familia de la polihalofluoresceína, colorantes de la familia de la hexaclorofluoresceína, colorantes de la familia de la cumarina, colorantes de la familia de la rodamina, colorantes de de la familia de la cianina, colorantes de la familia de la oxazina, colorantes de la familia de la tiarina, colorantes de la familia de la escuarina, colorantes de la familia de los lantánidos quelados y colorantes de la familia de BODIPY\*. En una realización preferida, la porción fluorescente es 6-carboxifluoresceína.

En ciertas realizaciones, los equipos de la invención comprenden un oligonucleótido útil como una sonda de ácido nucleico, en el que al menos una porción atenuadora está unida a la sonda de ácido nucleico. En ciertas realizaciones, la porción atenuadora se puede seleccionar del grupo que consiste de colorantes de la familia de la fluoresceína, colorantes de la familia de la polihalofluoresceína, colorantes de la familia de la hexaclorofluoresceína, colorantes de la familia de la cumarina, colorantes de la familia de la rodamina, colorantes de de la familia de la cianina, colorantes de la familia de la oxazina, colorantes de la familia de la tiarina, colorantes de la familia de la escuarina, colorantes de la familia de los lantánidos quelados y colorantes de la familia de BODIPY\*, y porciones atenuadoras no fluorescentes. En ciertas realizaciones, las porciones atenuadoras no fluorescentes pueden ser colorantes de la familia de la BHQ<sup>TM</sup>, Iowa Black<sup>TM</sup>, o Dabcyl. En una realización preferida, la porción atenuadora es Cy5<sup>TM</sup>. En otras realizaciones, la sonda comprende al menos una porción detectable, por ejemplo, una porción fluorescente y al menos una porción atenuadora.

En ciertas realizaciones, los equipos de la invención comprenden una DNA polimerasa termoestable.

5 También se describen polinucleótidos aislados que comprenden Id. de Sec. N°: 29, Id. de Sec. N°: 30, Id. de Sec. N°: 31, Id. de Sec. N°: 32, Id. de Sec. N°: 33, Id. de Sec. N°: 34, Id. de Sec. N°: 35, Id. de Sec. N°: 36, Id. de Sec. N°: 37, Id. de Sec. N°: 38, Id. de Sec. N°: 39, o Id. de Sec. N°: 40.

10 También se describen vectores que comprenden un polinucleótido que comprende Id. de Sec. N°: 29, Id. de Sec. N°: 30, Id. de Sec. N°: 31, Id. de Sec. N°: 32, Id. de Sec. N°: 33, Id. de Sec. N°: 34, Id. de Sec. N°: 35, Id. de Sec. N°: 36, Id. de Sec. N°: 37, Id. de Sec. N°: 38, Id. de Sec. N°: 39, o Id. de Sec. N°: 40.

15 También se describen oligonucleótidos que comprenden una secuencia de al menos 10 nucleótidos contiguos que hibridan con Id. de Sec. N°: 29 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 30 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 31 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 32 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 33 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 34 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 35 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 36 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 37 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 38 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 39 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 40 o un complementario del mismo. Se describe además, que el oligonucleótido se hibrida al Id. de Sec. N°: 68 o un complemento de Id. de Sec. N°: 69, que el oligonucleótido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 64, Id. de Sec. N°: 65, Id. de Sec. N°: 66, e Id. de Sec. N°: 67, que el oligonucleótido se selecciona del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 64, Id. de Sec. N°: 65, Id. de Sec. N°: 66, e Id. de Sec. N°: 67 y que el oligonucleótido tiene menos de 100 nucleótidos.

25 También se describen mezclas de reacción que comprenden un oligonucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que se hibrida con Id. de Sec. N°: 29 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 30 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 31 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 32 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 33 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 34 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 35 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 36 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 37 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 38 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 39 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 40 o un complementario del mismo.

35 También se describe, que el oligonucleótido hibrida a Id. de Sec. N°: 68 o un complemento de Id. de Sec. N°: 69, que el oligonucleótido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 64, Id. de Sec. N°: 65, Id. de Sec. N°: 66, e Id. de Sec. N°: 67 y que el oligonucleótido se selecciona del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 64, Id. de Sec. N°: 65, Id. de Sec. N°: 66, e Id. de Sec. N°: 67.

40 También se describe que las mezclas de reacción comprenden un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 64 e Id. de Sec. N°: 65; y un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 66 e Id. de Sec. N°: 67. Se describe además, que el oligonucleótido tiene menos de 100 nucleótidos. También se describen mezclas de reacción que comprenden además un oligonucleótido marcado de forma detectable que hibrida con Id. de Sec. N°: 16 o un complementario del mismo.

45 Se describen además mezclas de reacción que comprenden una DNA polimerasa.

50 También se describe, que el oligonucleótido marcado de forma detectable comprende al menos 20 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 17, o el complementario del mismo, que el oligonucleótido marcado de forma detectable comprende el Id. de Sec. N°: 28, o su complemento, que el oligonucleótido marcado de forma detectable comprende una porción fluorescente y que el oligonucleótido marcado de forma detectable comprende además una porción atenuadora.

55 También se describen métodos de detección de un virus de la encefalitis de St. Louis. En este documento, los métodos comprenden la amplificación de un ácido nucleico del virus de la encefalitis de St. Louis con al menos un oligonucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que se hibrida con Id. de Sec. N°: 29 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 30 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 31 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 32 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 33 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 34 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 35 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 36 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 37 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 38 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 39, o su complemento, o Id. de Sec. N°: 40, o su complemento, en condiciones para permitir la iniciación de la amplificación de al menos parte de la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido; y detectar el ácido nucleico amplificado, detectando de ese modo un virus de la encefalitis de St. Louis.

65 Se describe además que el oligonucleótido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 64, Id. de Sec. N°: 65, Id. de Sec. N°: 66, e Id. de Sec. N°: 67 o el oligonucleótido se selecciona entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 64, Id. de Sec. N°: 65, Id. de Sec. N°: 66, e Id. de Sec. N°: 67. Se describe

además, que el oligonucleótido se hibrida al Id. de Sec. N°: 68 o un complemento de Id. de Sec. N°: 69. También se describe, que el oligonucleótido tiene menos de 100 nucleótidos.

5 Se describe además, que el ácido nucleico del virus de la encefalitis de St. Louis es amplificado con un cebador seleccionado del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 64 e Id. de Sec. N°: 65; y un cebador seleccionado del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 66 e Id. de Sec. N°: 67.

10 También se describe, que el paso de detección comprende hibridar un oligonucleótido marcado de forma detectable que hibrida con Id. de Sec. N°: 16 con el ácido nucleico amplificado del ácido nucleico del virus de la encefalitis de St. Louis; y detectar la hibridación de la sonda con el ácido nucleico amplificado.

15 También se describe, que el oligonucleótido marcado de forma detectable comprende al menos 20 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 17, o el complementario del mismo. También se describe, que el oligonucleótido marcado de forma detectable comprende el Id. de Sec. N°: 28, o el complementario del mismo, que el oligonucleótido marcado de forma detectable comprende además una porción fluorescente y que el oligonucleótido marcado de forma detectable comprende además una porción atenuadora.

20 Se describe además, que la cantidad de ácido nucleico amplificado se determina durante el paso de amplificación, cuantificando de ese modo el virus en la muestra.

25 También se describe, que el paso de amplificación se lleva a cabo en una mezcla de reacción de amplificación que comprende una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde con actividad exonucleasa 5'-3' en condiciones que permiten que la polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde fragmentar el oligonucleótido marcado de forma detectable; y el método comprende además detectar la fragmentación del oligonucleótido de ácido nucleico marcado de forma detectable.

30 También se describen equipos para la detección del virus de la encefalitis de St. Louis. En este documento, los equipos comprenden un oligonucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que se hibrida con Id. de Sec. N°: 29 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 30 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 31 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 32 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 33 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 34 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 35 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 36 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 37 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 38 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 39, o su complemento, o Id. de Sec. N°: 40 o un complementario del mismo.

35 También se describe, que el oligonucleótido hibrida al Id. de Sec. N°: 68 o el complementario de Id. de Sec. N°: 69, que el oligonucleótido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 64, Id. de Sec. N°: 65, Id. de Sec. N°: 66, e Id. de Sec. N°: 67 y que el oligonucleótido se selecciona del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 64, Id. de Sec. N°: 65, Id. de Sec. N°: 66, e Id. de Sec. N°: 67.

40 También se describe que los equipos comprenden un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 64 e Id. de Sec. N°: 65; y un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 66 e Id. de Sec. N°: 67. También se describe, que el oligonucleótido tiene menos de 100 nucleótidos. También se describe que los equipos comprenden además un oligonucleótido marcado de forma detectable que hibrida con Id. de Sec. N°: 16 o un complementario del mismo.

45 Se describen además oligonucleótidos que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 56, Id. de Sec. N°: 57, Id. de Sec. N°: 58, Id. de Sec. N°: 59, Id. de Sec. N°: 60, Id. de Sec. N°: 61, Id. de Sec. N°: 62, e Id. de Sec. N°: 63. Se describen además oligonucleótidos seleccionados del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 56, Id. de Sec. N°: 57, Id. de Sec. N°: 58, Id. de Sec. N°: 59, Id. de Sec. N°: 60, Id. de Sec. N°: 61, Id. de Sec. N°: 62, e Id. de Sec. N°: 63.

50 Se describen además mezclas de reacción que comprenden un oligonucleótido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 56, Id. de Sec. N°: 57, Id. de Sec. N°: 58, Id. de Sec. N°: 59, Id. de Sec. N°: 60, Id. de Sec. N°: 61, Id. de Sec. N°: 62, e Id. de Sec. N°: 63. Se describen además oligonucleótidos seleccionados del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 56, Id. de Sec. N°: 57, Id. de Sec. N°: 58, Id. de Sec. N°: 59, Id. de Sec. N°: 60, Id. de Sec. N°: 61, Id. de Sec. N°: 62, e Id. de Sec. N°: 63.

55 También se describen mezclas de reacción que comprenden un oligonucleótido marcado de forma detectable que hibrida con Id. de Sec. N°: 25 o un complementario del mismo. Se describen además mezclas de reacción que comprenden además un oligonucleótido marcado de forma detectable que comprende FGGTCTAGAIGGTTAGAGGAGACCCTCCAG, en el que F es CY5; I es FAM; P es PO<sub>4</sub>; U es propinil dU; y E es 5-metil-dC. También se describen mezclas de reacción que comprenden además un oligonucleótido marcado de forma detectable que hibrida con Id. de Sec. N°: 16 o un complementario del mismo.

60

65

También se describe, que la mezcla de reacción comprende una polimerasa de DNA, las mezclas de reacción comprenden por lo menos un cebador corriente arriba y al menos un cebador corriente abajo.

También se describen métodos para la detección del virus de la fiebre amarilla. En este documento, los métodos comprenden la amplificación de un ácido nucleico del virus de la fiebre amarilla con al menos un oligonucleótido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 56, Id. de Sec. N°: 57, Id. de Sec. N°: 58, Id. de Sec. N°: 59, Id. de Sec. N°: 60, Id. de Sec. N°: 61, Id. de Sec. N°: 62, e Id. de Sec. N°: 63 en condiciones que permiten la iniciación de la amplificación de al menos parte de la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido; y detectar el ácido nucleico amplificado, detectando de ese modo un virus de la fiebre amarilla.

También se describe, que el oligonucleótido se selecciona del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 56, Id. de Sec. N°: 57, Id. de Sec. N°: 58, Id. de Sec. N°: 59, Id. de Sec. N°: 60, Id. de Sec. N°: 61, Id. de Sec. N°: 62, e Id. de Sec. N°: 63. En este documento, el paso de detección comprende hibridar un oligonucleótido marcado de forma detectable que hibrida con el Id. de Sec. N°: 25, o un complementario del mismo, en el ácido nucleico amplificado del ácido nucleico del virus de la fiebre amarilla; y detectar la hibridación del oligonucleótido marcado de forma detectable con el ácido nucleico amplificado.

También se describe, que el oligonucleótido marcado de forma detectable comprende FGGTCTAGAI GGTTAGAGGAGACCCTCCAG, en el que F es CY5; I es FAM; P es PO<sub>4</sub>; U es propinil dU; y E es 5-metil-dC. Se describe además, que el paso de detección comprende hibridar un oligonucleótido marcado de forma detectable que hibrida con Id. de Sec. N°: 16, o un complementario del mismo, en el ácido nucleico amplificado del ácido nucleico del virus de la fiebre amarilla; y detectar la hibridación del oligonucleótido marcado de forma detectable con el ácido nucleico amplificado.

También se describe, que el oligonucleótido marcado de forma detectable comprende al menos 20 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 17, o el complementario del mismo. También se describe, que el oligonucleótido marcado de forma detectable comprende el Id. de Sec. N°: 28, o el complementario del mismo. También se describe, que el oligonucleótido marcado de forma detectable comprende una porción fluorescente. También se describe, que el oligonucleótido marcado de forma detectable comprende además una porción atenuadora.

También se describe, que el oligonucleótido tiene menos de 100 nucleótidos. Además se describe, que la cantidad de ácido nucleico amplificado se determina durante el paso de amplificación, cuantificando de ese modo el virus en la muestra.

También se describe, que el paso de amplificación se lleva a cabo en una mezcla de reacción de amplificación que comprende una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde con actividad exonucleasa 5'-3' en condiciones que permiten a la polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde fragmentar el oligonucleótido marcado de forma detectable; y el método comprende además detectar la fragmentación del oligonucleótido marcado de forma detectable.

También se describen equipos para detectar el virus de la fiebre amarilla. El equipo comprende un oligonucleótido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 56, Id. de Sec. N°: 57, Id. de Sec. N°: 58, Id. de Sec. N°: 59, Id. de Sec. N°: 60, Id. de Sec. N°: 61, Id. de Sec. N°: 62, e Id. de Sec. N°: 63 o el oligonucleótido se selecciona del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 56, Id. de Sec. N°: 57, Id. de Sec. N°: 58, Id. de Sec. N°: 59, Id. de Sec. N°: 60, Id. de Sec. N°: 61, Id. de Sec. N°: 62, e Id. de Sec. N°: 63.

También se describe que los equipos comprenden además un oligonucleótido marcado de forma detectable que hibrida con Id. de Sec. N°: 16 o un complementario del mismo. También se describe que los equipos comprenden además un oligonucleótido marcado de forma detectable que hibrida con Id. de Sec. N°: 25 o un complementario del mismo. También se describe que los equipos comprenden además un oligonucleótido marcado de forma detectable que comprende FGGTCTAGAI GGTTAGAGGAGACCCTCCAG, en el que F es CY5; I es FAM; P es PO<sub>4</sub>; U es propinil dU; y E es 5-metil-dC.

También se describe que la mezcla de reacción comprende una polimerasa de DNA. También se describe que las mezclas de reacción comprenden al menos un cebador corriente arriba y al menos un cebador corriente abajo.

Se describen además oligonucleótidos que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 41, Id. de Sec. N°: 42, Id. de Sec. N°: 43, Id. de Sec. N°: 44, Id. de Sec. N°: 45, Id. de Sec. N°: 46, Id. de Sec. N°: 47, Id. de Sec. N°: 48, Id. de Sec. N°: 49, Id. de Sec. N°: 50, Id. de Sec. N°: 51, Id. de Sec. N°: 52, Id. de Sec. N°: 53, Id. de Sec. N°: 54, e Id. de Sec. N°: 55 y los oligonucleótidos seleccionados del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 41, Id. de Sec. N°: 42, Id. de Sec. N°: 43, Id. de Sec. N°: 44, Id. de Sec. N°: 45, Id. de Sec. N°: 46, Id. de Sec. N°: 47, Id. de Sec. N°: 48, Id. de Sec. N°: 49, Id. de Sec. N°: 50, Id. de Sec. N°: 51, Id. de Sec. N°: 52, Id. de Sec. N°: 53, Id. de Sec. N°: 54, e Id. de Sec. N°: 55.

También se describen mezclas de reacción que comprenden un oligonucleótido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 41, Id. de Sec. N°: 42, Id. de Sec. N°: 43, Id. de Sec. N°: 44,



5 Id. de Sec. N°: 45, Id. de Sec. N°: 46, Id. de Sec. N°: 47, Id. de Sec. N°: 48, Id. de Sec. N°: 49, Id. de Sec. N°: 50, Id. de Sec. N°: 51, Id. de Sec. N°: 52, Id. de Sec. N°: 53, Id. de Sec. N°: 54, e Id. de Sec. N°: 55. También se describe, que el oligonucleótido se selecciona del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 41, Id. de Sec. N°: 42, Id. de Sec. N°: 43, Id. de Sec. N°: 44, Id. de Sec. N°: 45, Id. de Sec. N°: 46, Id. de Sec. N°: 47, Id. de Sec. N°: 48, Id. de Sec. N°: 49, Id. de Sec. N°: 50, Id. de Sec. N°: 51, Id. de Sec. N°: 52, Id. de Sec. N°: 53, Id. de Sec. N°: 54, e Id. de Sec. N°: 55.

10 También se describe, que las mezclas de reacción comprenden, además, un oligonucleótido marcado de forma detectable que hibrida con Id. de Sec. N°: 16 o un complementario del mismo. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende una polimerasa de DNA. En algunas realizaciones, las mezclas de reacción comprenden por lo menos un cebador corriente arriba y al menos un cebador corriente abajo.

15 Se describen además métodos de detección de un virus de la fiebre del dengue. En este documento, los métodos comprenden la amplificación de un ácido nucleico del virus de la fiebre del dengue con al menos un oligonucleótido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 41, Id. de Sec. N°: 42, Id. de Sec. N°: 43, Id. de Sec. N°: 44, Id. de Sec. N°: 45, Id. de Sec. N°: 46, Id. de Sec. N°: 47, Id. de Sec. N°: 48, Id. de Sec. N°: 49, Id. de Sec. N°: 50, Id. de Sec. N°: 51, Id. de Sec. N°: 52, Id. de Sec. N°: 53, Id. de Sec. N°: 54, e Id. de Sec. N°: 55 en condiciones que permiten la iniciación de la amplificación de al menos parte de la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido; y detectar el ácido nucleico amplificado, detectando de ese modo un virus de la fiebre del dengue.

20 También se describe que el método comprende además la hibridación de un oligonucleótido marcado de forma detectable que hibrida con Id. de Sec. N°: 16 con el ácido nucleico amplificado del virus de la fiebre del dengue; y detectar la hibridación del oligonucleótido con el ácido nucleico amplificado. También se describe, que el oligonucleótido se selecciona del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 41, Id. de Sec. N°: 42, Id. de Sec. N°: 43, Id. de Sec. N°: 44, Id. de Sec. N°: 45, Id. de Sec. N°: 46, Id. de Sec. N°: 47, Id. de Sec. N°: 48, Id. de Sec. N°: 49, Id. de Sec. N°: 50, Id. de Sec. N°: 51, Id. de Sec. N°: 52, Id. de Sec. N°: 53, Id. de Sec. N°: 54, e Id. de Sec. N°: 55.

25 También se describe, que el ácido nucleico se amplifica con al menos un cebador corriente arriba y al menos un cebador corriente abajo. También se describe, que el oligonucleótido marcado de forma detectable comprende al menos 20 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 17, o el complementario del mismo. También se describe que el oligonucleótido marcado de forma detectable comprende el Id. de Sec. N°: 28, o el complementario del mismo. También se describe que el oligonucleótido marcado de forma detectable comprende una porción fluorescente. También se describe que el oligonucleótido marcado de forma detectable comprende además una porción atenuadora.

30 También se describe que el oligonucleótido posee menos de 100 nucleótidos. También se describe que la cantidad de ácido nucleico amplificado se determina durante el paso de amplificación, cuantificando de ese modo el virus en la muestra. También se describe que el paso de amplificación se lleva a cabo en una mezcla de reacción de amplificación que comprende una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde con actividad exonucleasa 5'-3' en condiciones que permiten a la polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde fragmentar el oligonucleótido marcado de forma detectable; y el método comprende además detectar la fragmentación del oligonucleótido de ácido nucleico marcado de forma detectable.

35 También se describen equipos para la detección del virus del dengue. En este documento, el equipo comprende un oligonucleótido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 41, Id. de Sec. N°: 42, Id. de Sec. N°: 43, Id. de Sec. N°: 44, Id. de Sec. N°: 45, Id. de Sec. N°: 46, Id. de Sec. N°: 47, Id. de Sec. N°: 48, Id. de Sec. N°: 49, Id. de Sec. N°: 50, Id. de Sec. N°: 51, Id. de Sec. N°: 52, Id. de Sec. N°: 53, Id. de Sec. N°: 54, e Id. de Sec. N°: 55. También se describe, que el oligonucleótido se selecciona del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 41, Id. de Sec. N°: 42, Id. de Sec. N°: 43, Id. de Sec. N°: 44, Id. de Sec. N°: 45, Id. de Sec. N°: 46, Id. de Sec. N°: 47, Id. de Sec. N°: 48, Id. de Sec. N°: 49, Id. de Sec. N°: 50, Id. de Sec. N°: 51, Id. de Sec. N°: 52, Id. de Sec. N°: 53, Id. de Sec. N°: 54, e Id. de Sec. N°: 55.

40 También se describe que los equipos comprenden además un oligonucleótido marcado de forma detectable que hibrida con el Id. de Sec. N°: 16 o un complementario del mismo. También se describe que la mezcla de reacción comprende una polimerasa de DNA.

45 También se describe que un paso de cuantificación se lleva a cabo utilizando ya sea un ácido nucleico de control externo o interno. Ver las Patentes US N° 5.476.774 y 5.219.727.

50 Breve descripción de las figuras

55 La figura 1 presenta una región de secuencia conservada, identificada como Id. de Sec. N°: 1, en la región no traducida 3' de los genomas de los flavivirus que se pueden detectar usando las composiciones y métodos descritos en el presente documento y que se pueden unir mediante un cebador como se describe en el presente documento. El Id. de Sec. N°: 2 representa el complementario del Id. de Sec. N°: 1.

La Figura 2 presenta una región de secuencia conservada, identificado como Id. de Sec. N°: 9, en la región no traducida 3' de los genomas de los flavivirus que se pueden detectar utilizando las composiciones y métodos descritos en el presente documento y que se pueden unir mediante un cebador como se describe en el presente documento. El Id. de Sec. N°: 10 representa el complementario del Id. de Sec. N°: 9.

La Figura 3 presenta una región de secuencia conservada, identificado como Id. de Sec. N°: 16, en la región no traducida 3' de los genomas de los flavivirus que se pueden detectar usando las composiciones y métodos descritos en el presente documento y que se pueden unir mediante una sonda descrita en este documento. El Id. de Sec. N°: 17 representa el complementario del Id. de Sec. N°: 16. En el Id. de Sec. N°: 16, N está ausente, A o C. En el Id. de Sec. N°: 17 N está ausente, T o G.

La Figura 4 presenta una alineación de las secuencias de ácidos nucleicos de los oligonucleótidos de la invención con secuencias de ácido nucleico de los miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa.

La Figura 5 presenta un alineamiento de las secuencias de ácidos nucleicos de los oligonucleótidos de la invención con secuencias de ácidos nucleicos de flavivirus detectables que no son miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa.

La Figura 6 presenta un gráfico de fluorescencia normalizada frente al número de ciclos de amplificación que muestran la detección de RNA de VNO extraído y diluido en serie usando los oligonucleótidos de la invención.

La Figura 7 presenta la secuencia de la región no traducida 3' de los genomas de un número de aislados de VESL que se puede detectar usando las composiciones y métodos descritos en este documento y que puede detectarse mediante un cebador descrito en este documento. Las secuencias para los siguientes aislados se representan: BFS1750 (Id. de Sec. N°: 29), 1750-Std (Id. de Sec. N°: 30), TD6-4G (Id. de Sec. N°: 31), CoaV750 (Id. de Sec. N°: 32), L695121.05 (Id. de Sec. N°: 33), TNM771K (Id. de Sec. N°: 34), MSI-7 (Id. de Sec. N°: 35), Kern217 (Id. de Sec. N°: 36), CoaV608 (Id. de Sec. N°: 37), TBH-28 (Id. de Sec. N°: 38), VR1265 (Id. de Sec. N°: 39), y CoaV353 (Id. de Sec. N°: 40).

Descripción detallada de la invención

#### 1. Abreviaturas

Las abreviaturas utilizadas a lo largo de la especificación para referirse a ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos específicas, son las abreviaturas convencionales de una letra. Por lo tanto, cuando se incluye en un ácido nucleico, los nucleótidos codificantes de origen natural se abrevian como sigue: adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T) y uracilo (U). También, a menos que se especifique lo contrario, las secuencias de ácidos nucleicos que se representan como una serie de abreviaturas de una letra se presentan en la dirección 5' -> 3'.

#### 2. Definiciones

Una "reacción de amplificación" se refiere a cualquier reacción (por ejemplo, química, enzimática, u otro tipo de reacción) que resulta en un aumento de copias de una secuencia de ácido nucleico molde o aumento de la señal que indica la presencia del molde. Las reacciones de amplificación incluyen, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (ver patentes de Estados Unidos 4.683.195 y 4.683.202; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis et al., eds, 1990)), amplificación por desplazamiento de la cadena (SDA) (Walker, et al. Nucleic Acids Res. 20(7):1691-6 (1992); Walker PCR Methods Appl 3(1):1-6 (1993)), amplificación mediada por transcripción (Phyffer, et al., J. Clin. Microbiol. 34:834-841 (1996); Vuorinen, et al., J. Clin. Microbiol. 33:1856-1859 (1995)), amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA) (Compton, Nature 350 (6313):91-2 (1991), replicación en círculo rodante (RCA) (Lisby, Mol. Biotechnol. 12(1):75-99 (1999)); Hatch et al., Genet. Anal. 15(2):35-40 (1999)) amplificación de señal de DNA ramificado (bDNA) (Iqbal et al., Mol. Cell Probes 13(4):315-320 (1999)) Replicasa Q-Beta (Lizardi et al., Bio/Technology 6:1197 (1988)).

Tal como se usa en este documento, una "muestra" se refiere a cualquier sustancia que contenga o presuma de contener un ácido nucleico. La muestra puede ser de origen natural o sintético y puede obtenerse mediante cualquier medio conocido por los expertos en la materia. La muestra puede ser una muestra de tejido o fluido aislado de un individuo o individuos, incluyendo, pero sin limitarse a, por ejemplo, piel, plasma, suero, sangre completa, fluido espinal, semen, fluido seminal, fluido linfático, fluido sinovial, orina, lágrimas, células sanguíneas, órganos, tumores, lavado bronco-alveolar, y también a muestras de constituyentes de cultivos in vitro de células (incluyendo pero sin limitarse a medio condicionado resultante del crecimiento de células en medio de cultivo celular, células recombinantes y componentes celulares). Un ácido nucleico puede obtenerse a partir de una muestra biológica mediante cualquier procedimiento conocido en la materia.

Tal como se utiliza aquí, los términos "ácido nucleico", "polinucleótido" y "oligonucleótido" se refieren a cebadores, sondas, fragmentos de oligómeros a detectar, controles de oligómeros y oligómeros de bloqueo no marcados y es

genérico para polímeros lineales de polidesoxirribonucleótidos (que contienen 2 desoxi-D-ribosa), polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa), y cualquier otro N-glicósido de una base de purina o pirimidina, o bases de purina o pirimidina modificadas.

- 5 Un ácido nucleico, polinucleótido u oligonucleótido puede comprender enlaces fosfodiéster o enlaces modificados incluyendo, pero sin limitarse a, fosfotriéster, fosforamidoato, siloxano, carbonato, carboximetiléster, acetamidoato, carbamato, tioéster, fosforamidoato en puente, fosfonato de metileno en puente, fosforotioato, metilfosfonato, fosforoditioato, fosforotioato en puente o enlaces sulfona, y combinaciones de dichos enlaces.
- 10 Un ácido nucleico, polinucleótido u oligonucleótido puede comprender las cinco bases que ocurren biológicamente (adenina, guanina, timina, citosina y uracilo) y / o bases distintas de las cinco bases que ocurren biológicamente. Estas bases pueden servir para varios propósitos, por ejemplo, para estabilizar o desestabilizar la hibridación; para promover o inhibir la degradación de la sonda; o como puntos de anclaje para porciones detectables o porciones atenuadoras. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede contener una o más porciones de bases modificadas, no estándar, o derivadas incluyendo, pero sin limitarse a, N<sup>6</sup>-metil-adenina, N<sup>6</sup>-terc-butil-bencil-adenina, imidazol, imidazoles sustituidos, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N<sup>6</sup>-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N<sup>6</sup>-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N<sup>6</sup>-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracilo-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w,2,6-diaminopurina, y 5-propinil pirimidina. Otros ejemplos de porciones de bases modificadas, no estándar, o porciones derivadas de bases pueden encontrarse en las Patentes US N° 6.001.611, 5.955.589, 5.844.106, 5.789.562, 5.750.343, 5.728.525, y 5.679.785.
- 25

Además, un ácido nucleico, polinucleótido u oligonucleótido puede comprender una o más porciones de azúcar modificados incluyendo, pero sin limitarse a, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y una hexosa.

- 30 No se pretende que la presente invención esté limitada por la fuente de un ácido nucleico, polinucleótido u oligonucleótido. Un ácido nucleico, polinucleótido o oligonucleótido puede ser de un mamífero humano o no humano, o cualquier otro organismo, o derivados de cualquier fuente recombinante, sintetizado in vitro o mediante síntesis química. Un ácido nucleico, nucleótido, polinucleótido o oligonucleótido puede ser DNA, RNA, DNAc, DNA-RNA, ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico peptídico (PNA), un híbrido o cualquier mezcla de los mismos, y pueden existir en una forma de doble cadena, de una sola hebra o parcialmente bicatenario. Un ácido nucleico también puede ser un ácido nucleico derivado como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.696.248. Los ácidos nucleicos de la invención incluyen tanto ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, en formas purificadas o no purificadas, incluyendo genes, cromosomas, plásmidos, genomas de material biológico tal como microorganismos, por ejemplo, bacterias, levaduras, virus, viroides, mohos, hongos, plantas, animales, seres humanos, y similares.
- 40

No hay distinción prevista en longitud entre los términos de ácidos nucleicos, polinucleótidos y oligonucleótidos, y estos términos se utilizarán indistintamente. Estos términos incluyen DNA de cadena sencilla y doble, así como RNA de una sola hebra y doble.

- 45 El término "residuo" tal como se utiliza aquí se refiere a un nucleótido o base dentro de un ácido nucleico como se ha definido anteriormente. Un residuo puede ser cualquier nucleótido conocido por un experto en la técnica sin limitación, incluyendo todos los nucleótidos que se producen biológicamente y los nucleótidos que no aparecen en la naturaleza descritos anteriormente.
- 50

- El término "cebador" se refiere a un oligonucleótido que es capaz de actuar como un punto de iniciación de la síntesis de un polinucleótido a lo largo de una cadena molde de ácido nucleico cuando se coloca bajo condiciones que permiten la síntesis de un producto de extensión del cebador que es complementaria a la cadena molde. El cebador puede obtenerse a partir de una fuente recombinante, como en un fragmento de restricción purificado, o producido sintéticamente. Las condiciones de extensión del cebador típicamente incluyen presencia de cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato diferentes y un agente con actividad de polimerización tal como una polimerasa de DNA o transcriptasa inversa, en un tampón adecuado (un "tampón" puede incluir sustituyentes que son cofactores, o que afectan el pH, la fuerza iónica, etc.), y a una temperatura adecuada. El cebador es preferiblemente monocatenario para una eficiencia máxima en la amplificación. Los cebadores de la invención puede tener, por ejemplo, entre 5 a 500 nucleótidos, y en algunas realizaciones tendrán al menos 10, 20, 30, 25, 30, 40, 50, 75, o 100 nucleótidos y / o tienen menos de 500, 300, 200, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, o 20 nucleótidos.
- 60

- El término "hibridar" se refiere a la unión de un ácido nucleico de cadena sencilla o de una región localmente monocatenaria de un ácido nucleico de doble cadena con otro ácido nucleico de una sola hebra o de una región localmente monocatenaria de un ácido nucleico bicatenario que tiene una secuencia complementaria. Como ya sabe un experto en la técnica, no es necesario para dos cadenas de ácido nucleico ser totalmente complementarias para
- 65

5 hibridarse entre sí. Dependiendo de las condiciones de hibridación, un ácido nucleico puede hibridar con su complemento, incluso si hay unos cuantos, algunos, o muchos desajustes, deleciones, o adiciones en una o ambas cadenas. En ciertas realizaciones, los cebadores y sondas de la invención pueden hibridar con al menos un ácido nucleico, parcialmente complementario de forma selectiva, tal como se define a continuación. En ciertas realizaciones, los cebadores y sondas de la invención pueden hibridar con una secuencia al menos parcialmente complementaria en condiciones restrictivas, como se define a continuación.

10 Los términos "restrictivas" o "condiciones restrictivas", como se usa aquí, denota las condiciones de hibridación de baja fuerza iónica y alta temperatura, como es bien conocido en la técnica; véase por ejemplo Maniatis et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición; Current Protocols in Molecular Biology, 1988, ed. Ausubel et al., J. Wiley & Sons Publ., Nueva York, y Tijssen, 1993, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Hybridization with nucleic acid probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays", se seleccionan condiciones restrictivas para estar aproximadamente entre 5-30 °C por debajo del punto de fusión térmico ( $T_m$ ) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. Alternativamente, se seleccionan las condiciones restrictivas para que sean aproximadamente 5-15 °C más bajas que el punto de fusión térmico ( $T_m$ ) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La  $T_m$  es la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico) a la que el 50% de las sondas complementarias a la diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio (como las secuencias diana están presentes en exceso, en la  $T_m$ , el 50% de las sondas están ocupadas en equilibrio). Por ejemplo, las condiciones de hibridación restrictivas serán aquellas en las que la concentración de sal es menor que aproximadamente 1,0 M de iones sodio (u otras sales), típicamente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1 M de concentración de iones de sodio a un pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente pH 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 25 °C para sondas cortas (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 55 °C para sondas largas (por ejemplo, mayor que 50 nucleótidos). Las condiciones restrictivas también se pueden modificar con la adición de agentes desestabilizantes de hibridación tales como formamida.

15 Los términos "selectiva" o "condiciones selectivas", como se usa aquí, denota las condiciones de hibridación para los cebadores y / o sondas de la invención que permiten la amplificación, detección y / o cuantificación de un ácido nucleico detectable de flavivirus en una muestra que puede contener ácidos nucleicos adicionales no derivados del flavivirus detectable, o derivados de regiones no relacionadas con el genoma de flavivirus. Los flavivirus detectables se describen a continuación.

20 El "complemento" de una secuencia de ácido nucleico, como se usa aquí, se refiere a un oligonucleótido que, cuando se alinea con la secuencia de ácido nucleico de tal manera que el extremo 5' de una secuencia se empareja con el extremo 3' de la otra, es en asociación antiparalela. El complementario de una secuencia de ácido nucleico no tiene por qué coincidir exactamente cada nucleótido de la secuencia; los dúplex estables pueden contener pares de bases no coincidentes o bases desemparejadas. Los expertos en la técnica de la tecnología de ácidos nucleicos pueden determinar la estabilidad del dúplex empíricamente teniendo en cuenta un número de variables incluyendo, por ejemplo, la longitud del oligonucleótido, la composición de bases y la secuencia del oligonucleótido, la fuerza iónica, y la incidencia de pares de bases no coincidentes.

25 La estabilidad de un dúplex de ácido nucleico se mide por la temperatura de fusión, o " $T_m$ ". La  $T_m$  de un dúplex de ácido nucleico particular en condiciones específicas es la temperatura a la cual la mitad de los pares de bases potenciales se disocia.

30 Tal como se utiliza aquí, el término "sonda" se refiere a un oligonucleótido que puede formar una estructura dúplex con una región de un ácido nucleico, debido a la complementariedad de al menos una secuencia en la sonda con una secuencia en la región. La sonda, preferiblemente, no contiene una secuencia complementaria a la secuencia (s) de un cebador. Como se discute más adelante, la sonda puede estar marcada o no. El extremo 3' terminal de la sonda puede estar "bloqueado" para evitar la incorporación de la sonda en un producto de extensión del cebador. El "bloqueo" puede lograrse mediante el uso de bases no complementarias o mediante la adición de una porción química tal como biotina o un grupo fosfato al hidroxilo 3' del último nucleótido, que puede, dependiendo de la porción seleccionada, servir a un doble propósito también actuando como un marcador para la detección o captura del ácido nucleico unido al marcador. El bloqueo también se puede lograr mediante la eliminación del hidroxilo 3' o mediante el uso de un nucleótido que carece de un hidroxilo 3', tal como un didesoxinucleótido.

35 El término "porción detectable" como se usa aquí, se refiere a cualquier átomo o molécula que se puede utilizar para proporcionar una señal detectable (cuantificable opcionalmente) y que puede unirse a un ácido nucleico o proteína. Las porciones detectables pueden proporcionar señales detectables por fluorescencia, radiactividad, colorimetría, gravimetría, difracción de rayos X o absorción, magnetismo, actividad enzimática, y similares. Las porciones detectables convenientes para la presente invención incluyen aquellas que facilitan la detección del tamaño de un fragmento de oligonucleótido.

40 El término "porción fluorescente" tal como se utiliza aquí se refiere a una porción química que puede emitir luz en condiciones apropiadas para la porción particular. Típicamente, una porción fluorescente particular puede emitir luz de una longitud de onda particular tras la absorción de luz de longitud de onda más corta. La longitud de onda de

la luz emitida por una porción fluorescente particular es característica de esa porción. Por lo tanto, una porción fluorescente particular puede ser detectada mediante la detección de luz de una longitud de onda apropiada después de la excitación de la porción fluorescente con luz de longitud de onda más corta. Ejemplos de porciones fluorescentes que se pueden utilizar en los métodos y composiciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, colorantes de la familia de la fluoresceína, colorantes de la familia de la polihalofluoresceína, colorantes de la familia de la hexaclorofluoresceína, colorantes de la familia de la cumarina, colorantes de la familia de la rodamina, colorantes de la familia de la cianina, colorantes de la familia de la oxazina, colorantes de la familia de la tiazina, colorantes de la familia de la escuarina, colorantes de la familia de los lantánidos quelados y colorantes de la familia de la BODIPY®.

El término "porción atenuadora" tal como se utiliza aquí, se refiere a una porción química que puede absorber la energía emitida por una porción fluorescente cuando la porción atenuadora está suficientemente cerca de la porción fluorescente, por ejemplo, cuando ambas porciones atenuadora y fluorescente están unidas a un polinucleótido común. Este fenómeno se conoce generalmente en la técnica como transferencia de energía por resonancia de fluorescencia ("FRET"). Una porción atenuadora puede volver a emitir la energía absorbida de una porción fluorescente en una señal característica para esa porción atenuadora, y por lo tanto una porción atenuadora también puede ser una "porción fluorescente". Alternativamente, una porción atenuadora puede disipar la energía absorbida de una porción fluorescente en forma de calor.

Tal como se define en el presente documento, "actividad nucleasa 5' a 3'" o "actividad nucleasa 5'" se refiere a que la actividad de una enzima mediante la que se eliminan nucleótidos del extremo 5' de un oligonucleótido se realiza de una manera secuencial. La actividad nucleasa 5' puede ser una actividad exonucleasa 5' a 3' o una actividad endonucleasa 5' a 3'. Por ejemplo, muchas polimerasas de ácidos nucleicos específicas de molde presentan una actividad exonucleasa 5' a 3' que se asocia tradicionalmente con algunas polimerasas de DNA, (es decir, DNA polimerasa I. E. coli tiene esta actividad mientras que el fragmento Klenow de la DNA polimerasa de E. coli no lo tiene). La actividad exonucleasa 5' a 3' también puede escindir un sustrato de ácido nucleico más de un enlace fosfodiéster (nucleótido) a partir del extremo 5' del sustrato. Aunque no pretende estar ligado a ninguna teoría particular de funcionamiento, se cree que este aspecto de exonucleasa 5' a 3' asociada con las polimerasas de DNA, que conduce a la liberación de los fragmentos de oligonucleótidos escindidos de las sondas, puede depender de la composición de nucleótidos particular de la sonda. Por ejemplo, el número de coincidencias o desemparejamientos entre los nucleótidos del oligonucleótido y el ácido nucleico molde, en particular en el extremo 5' del oligonucleótido, puede influir en esta actividad, como se describe, por ejemplo, en Holland et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7276-80.

El término "reacción de nucleasa control 5'" tal como se utiliza aquí, se refiere a una reacción de nucleasa 5' realizada como se describe a continuación en una cantidad conocida, por ejemplo, número de copias, de un ácido nucleico de un flavivirus detectable. La cantidad de fluorescencia emitida por una reacción de este tipo se puede comparar con una reacción realizada en una muestra con una cantidad desconocida de un ácido nucleico de un serogrupo del virus de la encefalitis japonesa para evaluar la cantidad de dicho ácido nucleico presente en la muestra.

El término "adyacente" tal como se utiliza aquí se refiere a la posición del cebador con respecto a la sonda en el mismo o en la cadena complementaria del ácido nucleico molde. El cebador y la sonda pueden estar separados por más de aproximadamente 150 nucleótidos, más de aproximadamente 125 nucleótidos, más de aproximadamente 100 nucleótidos, más de aproximadamente 80 nucleótidos, más de aproximadamente 60 nucleótidos, más de aproximadamente 50 nucleótidos, más de aproximadamente 40 nucleótidos, más de aproximadamente 30 nucleótidos, más de aproximadamente 20 nucleótidos, por aproximadamente 1 a aproximadamente 20 nucleótidos, por aproximadamente 1 a aproximadamente 10 nucleótidos, o puede directamente estar en contacto entre sí. Si se desea detectar un ácido nucleico de flavivirus con un proceso independiente de polimerización, la sonda está separada preferiblemente de la sonda por aproximadamente 1 a aproximadamente 10 nucleótidos. En el proceso dependiente de la polimerización, por ejemplo, los métodos de amplificación y detección mediante PCR tal como se muestra en el presente documento, la sonda puede hibridar con el ácido nucleico detectable en cualquier lugar dentro de la secuencia a amplificar que está corriente abajo de un cebador, lo que permite la extensión del cebador en la posición de la polimerasa por lo que la sonda se fragmenta.

El término "polimerasa de ácido nucleico termoestable" se refiere a una enzima que es relativamente estable al calor en comparación, por ejemplo, con polimerasas de nucleótidos de E. coli y que cataliza la polimerización de nucleósidos trifosfato. Generalmente, estas enzimas se obtienen a partir de organismos considerados por expertos en la materia como organismos termófilos. Generalmente, la enzima iniciará la síntesis en el extremo 3' de un cebador hibridado a la secuencia de unión a cebador, y continuará la síntesis de una nueva cadena hacia el extremo 5' del molde. Si la polimerasa posee una actividad nucleasa 5' a 3', puede hidrolizar sondas hibridadas al molde para soltar ambos fragmentos de sonda marcados y sin marcar, hasta que la polimerización termina o hasta que todos los fragmentos de la sonda se disocian del ácido nucleico a detectar. Una enzima termoestable representativa aislada de *Thermus aquaticus* (Taq) se describe en la patente US. Nº 4.889.818 y un método para su uso en PCR convencional se describe en Saiki et al., 1988, Science 239:487-91. Otra enzima termoestable representativa incluye la polimerasa de DNA Z05 de las especies de *Thermus*. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. Nº 5.674.738.

La polimerasa de DNA Taq posee una síntesis dependiente de DNA, actividad exonucleasa de reemplazo de cadena 5'-3' (ver Gelfand, "Taq DNA polymerase" en PCR Technology Principles and Applications for DNA Amplification, Erlich, Ed., Stockton Press, NY PCR Technology (1989), capítulo 2). Por lo tanto, la polimerasa de DNA Taq no degrada la sonda cuando no está unida al DNA molde.

El término "reacción de nucleasa 5'" de un cebador de ácido nucleico o sonda se refiere a la degradación de una sonda hibridada al ácido nucleico cuando el cebador se extiende por una polimerasa de ácido nucleico que tiene actividad nucleasa 5' a 3', como se ha definido antes y se describe en detalle más adelante. Dichas reacciones están basadas en las descritas en las Pat. Estadounidenses N° 6.214.979, 5.804.375, 5.487.972 y 5.210.015.

Para determinar el "porcentaje de complementariedad" o el "porcentaje de identidad" de dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para propósitos de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en la secuencia de una primera secuencia de ácido nucleico para el alineamiento óptimo con una segunda secuencia de ácido nucleico). Los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos correspondientes se comparan posteriormente. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por un nucleótido complementario como la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son complementarias en esa posición. Del mismo modo, cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de complementariedad (o porcentaje de identidad) entre las dos secuencias es una función del número de posiciones complementarias (o posiciones idénticas) compartidas por las secuencias dividido por el número total de posiciones de comparación (es decir, % de complementariedad = número de posiciones superpuestas complementarias / número total de posiciones del nucleótido más corto x 100%, y % de identidad = número de posiciones idénticas superpuestas / número total de posiciones del nucleótido más corto x 100%).

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede también lograrse utilizando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitante preferido de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 5873-5877. Tal algoritmo está incorporado en el programa NBLAST de Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y técnicas de DNA recombinante, que están dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames y S.J. Higgins, eds., 1984); A Practical Guide to Molecular Cloning (B. Perbal, 1984); y una serie, Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.).

3. Cebadores de ácidos nucleicos y sondas para la detección de un ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa y otros Flavivirus

La presente descripción proporciona oligonucleótidos útiles como cebadores y sondas para detectar la presencia de un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa y algunos otros miembros del género Flavivirus, y métodos para su uso. Estos cebadores y sondas se describen en detalle a continuación. Se observa que, mientras que los cebadores descritos en este documento pueden ser designados como particularmente útiles para la amplificación de un tipo particular de virus (por ejemplo, virus del Nilo occidental, VESL, virus del Dengue, virus de la fiebre amarilla, etc.), los cebadores pueden ser útiles también para la amplificación de otros virus.

Los oligonucleótidos útiles en los métodos de la descripción pueden ser diseñados para comprender secuencias de nucleótidos, o complementarios de los mismos, que se conservan entre diferentes cepas de Flavivirus o que están conservados entre dos o más miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa o de otros miembros del género Flavivirus. Los oligonucleótidos que comprenden secuencias conservadas entre las diferentes cepas o miembros de un serogrupo o de un género pueden resultar útiles, por ejemplo, como cebadores o sondas que se pueden emplear para detectar las diferentes cepas o miembros, reduciendo así el número de cebadores o sondas necesarias para detectar la diferentes cepas o miembros. Las secuencias conservadas pueden incluir, por ejemplo, al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50, o más nucleótidos contiguos que son completamente (es decir, 100%) o sustancialmente idénticos entre las dos o más cepas o dos o más miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa o de otros miembros del género Flavivirus. Las secuencias sustancialmente idénticas incluyen aquellas que son, por ejemplo, un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idénticas entre las dos o más cepas a través de los nucleótidos contiguos enumerados anteriormente.

3.1. Cebadores de ácido nucleico

Cebadores basados en Id. de Sec. N°: 1

En un aspecto, la descripción proporciona cebadores de ácido nucleico que se pueden utilizar en métodos de detección de miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa. En ciertas realizaciones, un primer cebador de ácido nucleico que se puede utilizar para detectar un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa comprende un ácido nucleico que se hibrida con un ácido nucleico de Id. de Sec. N°: 1 o un complementario del mismo. El Id. de Sec. N°: 1, tal como se presenta en la Figura 1, representa una región de secuencia conservada en la región no traducida 3' de los genomas de los flavivirus que se pueden detectar usando las composiciones y métodos de la presente invención. El Id. de Sec. N°: 2 representa el complementario de Id. de Sec. N°: 1.

En tales realizaciones de la descripción, el primer cebador de ácido nucleico que posee una composición de nucleótidos, es decir, una estructura química, que permite que se hibriden en las condiciones definidas a un ácido nucleico del Id. de Sec. N°: 1. En algunos casos, cada nucleótido de un cebador que se hibrida con un ácido nucleico formará pares de bases complementarias con un nucleótido del ácido nucleico. Por ejemplo, un cebador que contiene un nucleótido estándar que se hibrida con un residuo C en el ácido nucleico del Id. de Sec. N°: 1 debe tener un residuo G en la posición correspondiente. Por lo tanto, la hibridación con el ácido nucleico del Id. de Sec. N°: 1 define la secuencia de nucleótidos y por lo tanto la estructura química exacta del cebador. Además, el primer cebador de ácido nucleico también puede comprender nucleótidos no estándar de acuerdo con las definiciones de oligonucleótido y los cebadores citados anteriormente. Algunos de tales nucleótidos no estándar puede unirse también a otros nucleótidos estándar o no estándar para formar un par de bases. Por ejemplo, el nucleótido inosina no estándar puede emparejarse con uracilo, citosina y adenina. Dada la correlación conocida entre la hibridación y la estructura química, un experto en la técnica puede reconocer fácilmente las características estándar de los cebadores de la descripción. Las realizaciones ejemplares se describen en detalle a continuación.

En ciertas realizaciones, el primer cebador de ácido nucleico que se hibrida con un ácido nucleico de Id. de Sec. N°: 1 puede ser tan corto como aproximadamente 6 nucleótidos. En otras realizaciones, el primer cebador de ácido nucleico puede ser tan largo como aproximadamente 80 nucleótidos. En ciertas realizaciones, el primer cebador de ácido nucleico comprende aproximadamente 10, aproximadamente 12, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23, aproximadamente 24, aproximadamente 25, aproximadamente 26, aproximadamente 27, aproximadamente 28, aproximadamente 29, aproximadamente 30, aproximadamente 35, o aproximadamente 40 nucleótidos. En algunas realizaciones, el primer cebador de ácido nucleico comprenderá menos de 100, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 21 o 20 nucleótidos.

La longitud y composición del cebador pueden ser elegidos para dar suficiente estabilidad termodinámica para asegurar la hibridación del cebador con el ácido nucleico de flavivirus en las condiciones de reacción apropiadas, que dependen del método de detección a realizar. Por ejemplo, los cebadores con nucleótidos modificados, no estándar o derivados pueden ser más largos o más cortos que aquellos con nucleótidos convencionales, mientras que tiene propiedades termodinámicas de hibridación similares. Ejemplos de tales bases no estándar se pueden encontrar en las patentes de EE.UU. N° 6.320.005, 6.174.998, 6.001.611, y 5.990.303. Como otro ejemplo, los cebadores con secuencias ricas en G / C puede hibridarse a secuencias diana a temperaturas más altas que un cebador de longitud similar con secuencias ricas en A / T. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el primer cebador de ácido nucleico comprende bases modificadas, no estándar o derivadas, como se define anteriormente.

En ciertas realizaciones, el primer cebador de ácido nucleico comprende al menos aproximadamente 16 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 2. El Id. de Sec. N°: 2, como se muestra en la Figura 1, es el complementario del Id. de Sec. N°: 1. En otras realizaciones, el primer cebador de ácido nucleico comprende al menos aproximadamente 18 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 2. En aún otras realizaciones, el primer cebador de ácido nucleico comprende al menos aproximadamente 20 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 2. En aún otras realizaciones, el primer cebador de ácido nucleico comprende al menos aproximadamente 22 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 2. En aún otras realizaciones, el primer cebador de ácido nucleico comprende al menos aproximadamente 24 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 2.

En ciertas realizaciones, la descripción proporciona cebadores de ácido nucleico que se pueden utilizar para detectar un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa. Estos cebadores pueden estar estructuralmente definidos por referencia a sus secuencias de ácido nucleico, tal como se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1	
Id. de Sec. N°: 3 Cebador 1 del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa	GN <sup>2</sup> AAN <sup>5</sup> CCN <sup>8</sup> N <sup>9</sup> N <sup>10</sup> CN <sup>12</sup> N <sup>13</sup> AN <sup>15</sup> CN <sup>17</sup> N <sup>18</sup> N <sup>19</sup> N <sup>20</sup> TCGGN <sup>25</sup> N <sup>26</sup> En el que N <sup>2</sup> es T o A; N <sup>5</sup> es G o C; N <sup>8</sup> es T o ausente; N en la posición 9 es C o G; N <sup>10</sup> es T o C; N <sup>12</sup> es A o G; N <sup>13</sup> es G o A; N <sup>15</sup> es A o C; N <sup>17</sup> es C o T; N <sup>18</sup> es G o C; N <sup>19</sup> es T o C; N <sup>20</sup> es C o T; N <sup>25</sup> es A o G; y N <sup>26</sup> es A o T.
Id. de Sec. N°: 4 Cebador 1 del virus del Nilo	GTAAGCCN <sup>8</sup> CN <sup>10</sup> CAGAACCGN <sup>19</sup> N <sup>20</sup> TCGGAA En el que N <sup>8</sup> está ausente o T; N <sup>10</sup> es T o C; N <sup>19</sup> es T o C; y N <sup>20</sup> es C o T.

Occidental	
Id. de Sec. Nº: 5 Cebador 1 del virus de la encefalitis japonesa	GAAAN <sup>5</sup> CCN <sup>8</sup> CTCN <sup>12</sup> N <sup>13</sup> AACN <sup>17</sup> GTN <sup>20</sup> TCGGAA En el que N <sup>5</sup> es G o C; N <sup>8</sup> está ausente; N <sup>12</sup> es A o G; N <sup>13</sup> es G o A; N <sup>17</sup> es C o T; y N <sup>20</sup> es C o T.
Id. de Sec. Nº: 6 Cebador 1 del virus de la encefalitis del valle de Murray	GAAAGCCTCCCAGAN <sup>15</sup> CCGTN <sup>20</sup> TCGGAA En el que N <sup>15</sup> es A o C; y N <sup>20</sup> es C o T.
Id. de Sec. Nº: 7 Cebador 1 del virus Koutango	GTAAGCCCTCAGAACCGTCTCGGAA
SEC ID Nº: 8 Ejemplo Cebador 1	GTAAGCCCTCAGAACCGTCTCGGAA
Id. de Sec. Nº: 11 Cebador 2 del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa	N <sup>1</sup> CCN <sup>4</sup> AN <sup>6</sup> TN <sup>8</sup> TN <sup>10</sup> N <sup>11</sup> N <sup>12</sup> N <sup>13</sup> CCAGGTN <sup>20</sup> TCAA En el que N <sup>1</sup> es T o C; N <sup>4</sup> es C o T; N <sup>6</sup> es G o C; N <sup>8</sup> es C o A; N <sup>10</sup> es A o T; N <sup>11</sup> está ausente o T; N <sup>12</sup> es T o C; N <sup>13</sup> es C o T; y N <sup>20</sup> es G o A.
Id. de Sec. Nº: 12 Cebador 2 del virus del Nilo occidental	N <sup>1</sup> CCTAGTCTATCCCAGGTN <sup>19</sup> TCAA En el que N <sup>1</sup> es T o C y N <sup>19</sup> es G o A.
Id. de Sec. Nº: 13 Cebador 2 del virus de la encefalitis japonesa	CCCN <sup>4</sup> AN <sup>6</sup> TN <sup>8</sup> TATN <sup>12</sup> N <sup>13</sup> CCAGGTGTCAA En el que N <sup>4</sup> es C o T; N <sup>6</sup> es G o C; N <sup>8</sup> es C o A; N <sup>12</sup> es T o C; y N <sup>13</sup> es C o T.
Id. de Sec. Nº: 14 Cebador 2 del virus de la encefalitis del valle de Murray	TCCTAGTCTTTTCCCAGGTGTCAA
Id. de Sec. Nº: 15 Ejemplo de cebador 2	TCCTAGTCTATCCCAGGTGTCAA
Id. de Sec. Nº: 74 Ejemplo de cebador 2	TCTCCTAGTCTATCCCAGGTGTCAA

- En ciertas realizaciones, el primer cebador de ácido nucleico comprende cualquiera de las Id. de Sec. Nº: 3-8. En ciertas realizaciones de la invención, con el fin de mejorar la especificidad del cebador, los cebadores pueden comprender uno o más nucleótidos alquilados en o cerca de su extremo 3'. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el primer cebador de ácido nucleico comprende el Id. de Sec. Nº: 8, en el que el residuo en la posición 23 es N<sup>6</sup>-alquil-desoxiadenosina. En una realización específica, el primer cebador de ácido nucleico comprende el Id. de Sec. Nº: 8, en el que el residuo en la posición 23 es N<sup>6</sup>-metil-desoxiadenosina. En ciertas realizaciones, el primer cebador de ácido nucleico comprende el Id. de Sec. Nº: 8, en el que el residuo en la posición 24 es N<sup>6</sup>-alquil-desoxiadenosina. En una realización específica, el primer cebador de ácido nucleico comprende el Id. de Sec. Nº: 8, en el que el residuo en la posición 24 es N<sup>6</sup>-terc-butil-bencil-desoxiadenosina. En ciertas realizaciones, el primer cebador de ácido nucleico comprende el Id. de Sec. Nº: 8, en el que el residuo en la posición 23 es N<sup>6</sup>-alquil-desoxiadenosina y el residuo en la posición 24 es N<sup>6</sup>-alquil-desoxiadenosina. En aún otra realización específica, el primer cebador de ácido nucleico comprende el Id. de Sec. Nº: 8, en el que el residuo en la posición 23 es N<sup>6</sup>-metil-desoxiadenosina y el residuo en la posición 24 es N<sup>6</sup>-terc-butil-bencil-desoxiadenosina. La patente de Estados Unidos Nº. 6.001.611 describe N<sup>6</sup>-alquildesoxiadenosina, así como la identidad de las porciones alquilo que se pueden utilizar con tales nucleótidos no estándar. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la porción alquilo comprende un alquilo C1 a aproximadamente C10 ramificado o no ramificado. En otras realizaciones, la porción alquilo comprende un alquilo C1 a aproximadamente C20 ramificado o no ramificado.
- En otro aspecto, la descripción proporciona un segundo cebador de ácido nucleico para la detección de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa que comprende un ácido nucleico que se hibrida con un ácido nucleico de Id. de Sec. Nº: 9 o un complementario del mismo. El Id. de Sec. Nº: 9, tal como se presenta en la Figura 2, representa una región de secuencia conservada en la región no traducida 3' de los genomas de los flavivirus que se pueden detectar usando las composiciones y métodos de la presente invención. La Figura 2 también muestra que el Id. de Sec. Nº: 10 representa el complementario de Id. de Sec. Nº: 9.

En tales realizaciones de la descripción, el segundo cebador de ácido nucleico que tiene una composición de nucleótidos, es decir, estructura química, que permite que se hibride con un ácido nucleico de Id. de Sec. Nº: 9. Por ejemplo, un cebador que contiene un nucleótido estándar que se hibrida con un residuo C en el ácido nucleico del Id. de Sec. Nº: 9 debe tener un residuo G en la posición correspondiente. Por lo tanto, la hibridación con el ácido nucleico del Id. de Sec. Nº: 9 define la secuencia de nucleótidos y por lo tanto la estructura química exacta del cebador. Además, el segundo cebador de ácido nucleico también puede comprender nucleótidos no estándar de acuerdo con las definiciones de oligonucleótidos y cebadores citados anteriormente. Algunos de tales nucleótidos no estándar puede unirse también a otros nucleótidos estándar o no estándar para formar un par de bases. Por ejemplo, el nucleótido inosina no estándar puede emparejarse con uracilo, citosina y adenina. Dada la correlación conocida entre la hibridación y la estructura química, un experto en la técnica puede reconocer fácilmente las



características estándar de los cebadores de la invención. Las realizaciones ejemplares se describen en detalle a continuación.

En ciertas realizaciones, el segundo cebador de ácido nucleico que se hibrida con un ácido nucleico de Id. de Sec. N°: 9 puede ser tan corto como aproximadamente 6 nucleótidos. En otras realizaciones, el segundo cebador de ácido nucleico puede ser tan largo como aproximadamente 80 nucleótidos. En ciertas realizaciones, el segundo cebador de ácido nucleico comprende aproximadamente 10, aproximadamente 12, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23, aproximadamente 24, aproximadamente 25, aproximadamente 26, aproximadamente 27, aproximadamente 28, aproximadamente 29, aproximadamente 30, aproximadamente 35, o aproximadamente 40 nucleótidos.

La longitud y la composición del segundo cebador pueden ser elegidos para dar suficiente estabilidad termodinámica para asegurar la hibridación del cebador con el ácido nucleico de flavivirus en las condiciones de reacción apropiadas, que dependen del método de detección a realizar. Por ejemplo, los cebadores con nucleótidos modificados, no estándar o derivados pueden ser más largos o más cortos que aquellos con nucleótidos convencionales, mientras que tiene propiedades termodinámicas de hibridación similares. Ejemplos de tales bases no estándar se pueden encontrar en las patentes de EE.UU. N° 6.320.005, 6.174.998, 6.001.611, y 5.990.303. Como otro ejemplo, los cebadores con secuencias ricas en G / C pueden hibridarse a secuencias diana a temperaturas más altas que un cebador de longitud similar con secuencias ricas en A / T. Así, en ciertas realizaciones, el segundo cebador de ácido nucleico comprende bases modificadas, no estándar o derivadas como se ha definido anteriormente.

En ciertas realizaciones, el segundo cebador de ácido nucleico comprende al menos 16 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 10. Como se muestra en la Figura 2, el Id. de Sec. N°: 10 representa el complementario del Id. de Sec. N°: 9. En otras realizaciones, el segundo cebador de ácido nucleico comprende al menos aproximadamente 18 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 10. En aún otras realizaciones, el segundo cebador de ácido nucleico comprende al menos aproximadamente 20 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 10. En aún otras realizaciones, el segundo cebador de ácido nucleico comprende al menos aproximadamente 22 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 10. En aún otras realizaciones, el segundo cebador de ácido nucleico comprende al menos aproximadamente 24 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 10.

En ciertas realizaciones, el segundo cebador de ácido nucleico comprende el Id. de Sec. N°: 11. En otras realizaciones, el segundo cebador de ácido nucleico comprende el Id. de Sec. N°: 12. En aún otras realizaciones, el segundo cebador de ácido nucleico comprende el Id. de Sec. N°: 13. En aún otras realizaciones, el segundo cebador de ácido nucleico comprende el Id. de Sec. N°: 14. En aún otras realizaciones, el segundo cebador de ácido nucleico comprende el Id. de Sec. N°: 15 o Id. de Sec. N°: 74. En ciertas realizaciones, el segundo cebador de ácido nucleico comprende nucleótidos no estándar o derivados. En otras realizaciones, el segundo cebador de ácido nucleico puede comprender uno o más nucleótidos alquilados en o cerca del extremo 3'. En ciertas realizaciones, el segundo cebador de ácido nucleico comprende el Id. de Sec. N°: 15 o Id. de Sec. N°: 74, en el que el residuo en la posición 24 es N<sup>6</sup>-alquil-desoxiadenosina. En ciertas realizaciones, la porción alquilo comprende un alquilo C1 a aproximadamente C10 ramificado o no ramificado. En otras realizaciones, la porción alquilo comprende un alquilo C1 a aproximadamente C20 ramificado o no ramificado. En una realización específica, el segundo cebador de ácido nucleico comprende el Id. de Sec. N°: 15 o Id. de Sec. N°: 74, en el que el residuo en la posición 24 es N<sup>6</sup>-terc-butilbencil-desoxiadenosina.

Los cebadores de ácido nucleico pueden comprender adicionalmente secuencias de ácidos nucleicos que no son complementarios y / o no se hibridan a un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa. Estas secuencias adicionales se pueden seleccionar por un experto en la técnica para, por ejemplo, ayudar en la detección de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa. Los métodos de detección de un ácido nucleico, incluyendo un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa son ampliamente descritas en las secciones 4.2 y 4.3, a continuación. Estos métodos describen tanto las secuencias de ácidos nucleicos adicionales que pueden estar presentes en los cebadores de ácido nucleico de la invención, así como métodos de uso de estas secuencias adicionales para detectar un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa.

Los cebadores de ácido nucleico pueden prepararse mediante cualquier método adecuado conocido por un experto en la materia sin limitación. Los métodos para preparar oligonucleótidos de secuencia definida son bien conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, la clonación y restricción de secuencias apropiadas y síntesis química directa. Los métodos de síntesis química pueden incluir, por ejemplo, el método fosfotriéster descrito por Narang et al., 1979, Methods in Enzymology 68:90, el método fosfodiéster descrito por Brown et al., 1979, Methods in Enzymology 68: 109, el método dietilfosforamidato descrito en Beaucage et al., 1981, Tetrahedron Letters 22: 1859, y el método de soporte sólido descrito en la Pat. De EE.UU. N° 4.458.066. Además, las modificaciones de los métodos de síntesis descritos anteriormente se pueden usar para impactar deseablemente en el comportamiento de la enzima con respecto a los oligonucleótidos sintetizados. Por ejemplo, la incorporación de enlaces fosfodiéster modificados (por ejemplo, fosforotioato, metilfosfonatos, fosfoamidato, o boranofosfato) o enlaces distintos de un derivado de ácido

fosforoso en un oligonucleótido puede ser usado para prevenir la escisión en un sitio seleccionado. Además, el uso de azúcares 2'-amino modificados tiende a favorecer el desplazamiento sobre la digestión del oligonucleótido cuando se hibrida con un ácido nucleico que es también el molde para la síntesis de una nueva hebra de ácido nucleico.

5 Cebadores del virus del Dengue

Cebadores adicionales hibridan con el virus del dengue 3' UTR. Cebadores ejemplares útiles para amplificar y / o detectar ácidos nucleicos del virus del Dengue incluyen los representados en la Tabla 2 (5'→ 3').

10

Tabla 2		
Secuencia	Comentarios	Id. de Sec. N°:
GAGCCCCGTCCAAGGACGTAAAAA GAA	Cebador corriente arriba consenso del virus del Dengue.	41
GAGCCCCGTCCAAGGACGTAAAAA GAJ	Cebador corriente arriba consenso del virus del Dengue.	42
GAGCCCCGTCCAAGGACGTAAAAA GEJ	Cebador corriente arriba consenso del virus del Dengue.	43
GAGCCCCGTCCAAGGACGTAAAATG AA	Cebador corriente arriba del virus del Dengue tipo I.	44
GAGCCCCGTCCAAGGACGTAAAATG AJ	Cebador corriente arriba del virus del Dengue tipo I.	45
GAGCCCCGTCCAAGGACGTAAAATG EJ	Cebador corriente arriba del virus del Dengue tipo I.	46
GAGCCCCGTCCAAGGACGTAAAAAG AA	Cebador corriente arriba del virus del Dengue tipo II y III.	47
GAGCCCCGTCCAAGGACGTAAAAAG AJ	Cebador corriente arriba del virus del Dengue tipo II y III.	48
GAGCCCCGTCCAAGGACGTAAAAAG EJ	Cebador corriente arriba del virus del Dengue tipo II y III.	49
ATTGAAGTCAGGCCACTTGTGCCA	Cebador corriente arriba del virus del Dengue tipo IV.	50
ATTGAAGTCAGGCCACTTGTGCCJ	Cebador corriente arriba del virus del Dengue tipo IV.	51
ATTGAAGTCAGGCCACTTGTGCUJ	Cebador corriente arriba del virus del Dengue tipo IV.	52
GATCTCTGGTCTTTCCAGCGTCAA	Cebador corriente abajo del virus del Dengue.	53
GATCTCTGGTCTTTCCAGCGTCAJ	Cebador corriente abajo del virus del Dengue.	54
GATCTCTGGTCTTTCCAGCGTCEJ	Cebador corriente abajo del virus del Dengue.	55
Definición de sufijos de cebadores: J = t-butil-bencil-dA, E = metil-dA; U = etil-dC		

En algunas realizaciones, un cebador "corriente arriba" y un cebador "corriente abajo" se utilizan en combinación para amplificar un ácido nucleico del virus de Dengue. En algunas formas de realización más de un cebador corriente arriba se usa en combinación con al menos un cebador corriente abajo para detectar uno o más ácidos nucleicos del virus del dengue. El uso de múltiples cebadores corriente arriba en una sola reacción de amplificación permite la amplificación y / o detección de diferentes variantes de ácido nucleico del virus de Dengue. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un primer cebador corriente arriba (seleccionado de Id. de Sec. N°: 41, Id. de Sec. N°: 42 e Id. de Sec. N°: 43) y un segundo cebador corriente arriba (seleccionado de Id. de Sec. N°: 50, Id. de Sec. N°: 51, e Id. de Sec. N°: 52) se utilizan en combinación con un cebador corriente abajo del virus del Dengue (por ejemplo, seleccionado de un cebador que comprende el Id. de Sec. N°: 53, Id. de Sec. N°: 54, e Id. de Sec. N°: 55). Estas realizaciones son útiles, por ejemplo, para detectar cualquiera de los tipos de virus del Dengue 1, 2, 3, o 4.

15 Cebadores del virus de la fiebre amarilla

25 Cebadores adicionales hibridan con el virus de la fiebre amarilla 3' UTR. Los ejemplos de cebadores útiles para amplificar y / o detectar ácidos nucleicos del virus de la fiebre amarilla incluyen los representados en la Tabla 3 (5'→ 3').

Tabla 3		
Secuencia	Comentarios	Id. de Sec. N°:
AACCGGGATAAAAACTACGGGTGGAG AA	cebador corriente arriba del virus de la fiebre amarilla.	56
AACCGGGATAAAAACTACGGGTGGAG AJ	cebador corriente arriba del virus de la fiebre amarilla.	57
AACCGGGATAAAAACTACGGGTGGAG EJ	cebador corriente arriba del virus de la fiebre amarilla.	58

ATAAAACTACGGGTGGAGAACCGGA	cebador corriente arriba del virus de la fiebre amarilla.	59
ATAAAACTACGGGTGGAGAACCGGJ	cebador corriente arriba del virus de la fiebre amarilla.	60
ACTCCGGTCTTCCCTGGCGTCAA	cebador corriente abajo del virus de la fiebre amarilla.	61
ACTCCGGTCTTCCCTGGCGTCAJ	cebador corriente abajo del virus de la fiebre amarilla.	62
ACTCCGGTCTTCCCTGGCGTCEJ	cebador corriente abajo del virus de la fiebre amarilla.	63
Sufijos: ver Tabla 2.		

En algunas realizaciones, un cebador "corriente arriba" y un cebador "corriente abajo" se utilizan en combinación para amplificar un ácido nucleico del virus de la fiebre amarilla. En algunas formas de realización más de un cebador corriente arriba se usa en combinación con al menos un cebador corriente abajo para detectar uno o más ácidos nucleicos del virus de la fiebre amarilla. Múltiples cebadores corriente arriba se pueden usar en una sola reacción de amplificación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un primer cebador corriente arriba (por ejemplo, seleccionado de Id. de Sec. N°: 56, Id. de Sec. N°: 57 e Id. de Sec. N°: 58) y un segundo cebador corriente arriba (por ejemplo, seleccionado de Id. de Sec. N°: 59, Id. de Sec. N°: 60, e Id. de Sec. N°: 61) se utilizan en combinación con un cebador corriente abajo del virus de la fiebre amarilla (por ejemplo, seleccionado de un cebador que comprende el Id. de Sec. N°: 62 e Id. de Sec. N°: 63).

Cebadores basados en las secuencias de la Figura 7

Cebadores adicionales hibridan con cualquiera de las secuencias representadas en la Figura 7 (por ejemplo, Id. de Sec. N°: 29, Id. de Sec. N°: 30, Id. de Sec. N°: 31, Id. de Sec. N°: 32, Id. de Sec. N°: 33, Id. de Sec. N°: 34, Id. de Sec. N°: 35, Id. de Sec. N°: 36, Id. de Sec. N°: 37, Id. de Sec. N°: 38, Id. de Sec. N°: 39, Id. de Sec. N°: 40), o un complementario de los mismos, en condiciones que permitan el cebamiento de una reacción de amplificación. En algunos casos, estos cebadores son útiles para amplificar y / o detectar ácidos nucleicos a partir de VESL.

Como los cebadores que se hibridan con Id. de Sec. N°: 1 descritos anteriormente, los cebadores que se hibridan a cualquiera de las secuencias representadas en la Figura 7 también pueden comprender nucleótidos no estándar de acuerdo con las definiciones de oligonucleótido y cebadores citados anteriormente.

La longitud y la composición de los cebadores que se hibridan a cualquiera de las secuencias representadas en la Figura 7 pueden ser elegidos para dar suficiente estabilidad termodinámica para asegurar la hibridación del cebador con el ácido nucleico de flavivirus en las condiciones de reacción apropiadas, que dependen del método de detección a realizar. Por ejemplo, los cebadores con nucleótidos modificados, no estándar o derivados pueden ser más largos o más cortos que aquellos con nucleótidos convencionales, mientras que tiene propiedades termodinámicas de hibridación similares. Así, en ciertas realizaciones, el segundo cebador de ácido nucleico comprende bases modificadas, no estándar, o derivadas como se ha definido anteriormente. Los cebadores que se hibridan a cualquiera de las secuencias representadas en la figura 7 pueden comprender al menos, por ejemplo, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50 o más nucleótidos contiguos de cualquiera de las secuencias representadas en la Figura 7 o un complementario de la misma.

Los expertos en la técnica apreciarán que los pares de cebadores pueden ser diseñados usando Id. de Sec. N°: 29, Id. de Sec. N°: 30, Id. de Sec. N°: 31, Id. de Sec. N°: 32, Id. de Sec. N°: 33, Id. de Sec. N°: 34, Id. de Sec. N°: 35, Id. de Sec. N°: 36, Id. de Sec. N°: 37, Id. de Sec. N°: 38, Id. de Sec. N°: 39, Id. de Sec. N°: 40 para amplificar las secuencias deseadas de la región 3' UTR del VESL. En algunas realizaciones, un primer cebador hibrida con TTGACACCTGGAAAGACAGGAGA (Id. de Sec. N°: 68) y un segundo cebador hibrida con el complementario de CAAAGCCCCTCATTCCGACTCGGG (Id. de Sec. N°: 69) bajo condiciones que permiten el cebamiento de una reacción de amplificación.

Ejemplos de cebadores para detectar y / o amplificar VESL incluyen aquellos representados en la Tabla 4.

Secuencia	Comentarios	Id. de Sec. N°:
CAAAGCCCCTCATTCCGACTCGGGA	cebador corriente arriba del virus de la encefalitis de S. Louis.	64
CAAAGCCCCTCATTCCGACTCGGGJ	cebador corriente arriba del virus de la encefalitis de S. Louis.	65
TCTCCTGTCTTCCAGGTGTCAA	cebador corriente arriba del virus de la encefalitis de S. Louis.	66
TCTCCTGTCTTCCAGGTGTCAJ	cebador corriente arriba del virus de la encefalitis de S. Louis.	67

Sufijos: ver Tabla 2.
-----------------------

### 3.2. Sondas de ácido nucleico

En otro aspecto, la descripción proporciona una sonda para la detección de un ácido nucleico de ciertos flavivirus. Los ácidos nucleicos de flavivirus que se pueden detectar con las sondas de la invención se describen en las secciones 3.3 y 3.4, a continuación. La sonda puede ser cualquier sonda de ácido nucleico que se puede utilizar para identificar la presencia de un ácido nucleico de un flavivirus detectable conocido por un experto en la materia sin limitación. Normalmente, la sonda comprende una secuencia de nucleótidos que se hibrida a una región en un ácido nucleico de un flavivirus a detectar.

La secuencia de nucleótidos de la sonda puede ser de cualquier longitud suficiente para unirse específicamente a un ácido nucleico de un flavivirus a detectar. En ciertas realizaciones, la sonda comprende al menos aproximadamente 6 nucleótidos. En ciertas realizaciones, la sonda comprende menos de aproximadamente 140 nucleótidos. En ciertas realizaciones, la sonda puede ser de aproximadamente 18 a aproximadamente 25, de aproximadamente 25 a aproximadamente 35, o de aproximadamente 35 a aproximadamente 45 nucleótidos de longitud. La longitud y la composición de la sonda pueden ser elegidos para dar suficiente estabilidad termodinámica para asegurar la hibridación de la sonda con el ácido nucleico de flavivirus en las condiciones de reacción apropiadas, que dependen del método de detección a realizar. Por ejemplo, las sondas con nucleótidos modificados, no estándar o derivados pueden ser más largas o más cortas que aquellas con nucleótidos convencionales mientras que tienen propiedades de hibridación termodinámicas similares. Ejemplos de tales bases no estándar se pueden encontrar en las patentes de EE.UU. N°: 6.320.005, 6.174.998, 6.001.611, y 5.990.303. Como otro ejemplo, las sondas con secuencias ricas en G / C puede hibridarse a secuencias diana a temperaturas más altas que una sonda de longitud similar con secuencias ricas en A / T.

Normalmente, la porción de la secuencia de nucleótidos de la sonda que se hibrida con el ácido nucleico detectable es idéntica o complementaria a la región del ácido nucleico detectable a la que se hibrida la sonda. Sin embargo, esta porción de la sonda puede tener menos del 100% de identidad de secuencia o complementariedad a la región del ácido nucleico viral detectable a la que se hibrida la sonda. En ciertas realizaciones de la invención, la secuencia de nucleótidos de la parte de la sonda que se hibrida con el ácido nucleico viral detectable puede tener aproximadamente el 99%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 85% o aproximadamente el 80% de identidad o complementariedad con la región del ácido nucleico viral detectable a la que se hibrida la sonda.

En ciertas realizaciones, la descripción proporciona una sonda para la detección de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa que comprende un ácido nucleico que se hibrida con un ácido nucleico de Id. de Sec. N°: 16. El Id. de Sec. N°: 16, como se presenta en Figura 3, representa una región de secuencia conservada en la región no traducida 3' de los genomas de los flavivirus que se pueden detectar usando las composiciones y métodos de la presente invención. La Figura 3 también muestra que Id. de Sec. N°: 17 representa el complementario de Id. de Sec. N°: 16.

En tales realizaciones, la sonda tiene una composición de nucleótidos, es decir, estructura química, que permite que se hibride en las condiciones definidas a un ácido nucleico del Id. de Sec. N°: 16. Por ejemplo, una sonda que contiene un nucleótido estándar que se hibrida con un residuo C en el ácido nucleico del Id. de Sec. N°: 16 debe tener un residuo G en la posición correspondiente. Por lo tanto, la hibridación con el ácido nucleico del Id. de Sec. N°: 16 define la secuencia de nucleótidos y por lo tanto la estructura química exacta de la sonda. Además, la sonda también puede comprender nucleótidos no estándar de acuerdo con las definiciones de oligonucleótido y cebadores indicados anteriormente. Algunos de tales nucleótidos no estándar puede unirse también a otros nucleótidos estándar o no estándar para formar un par de bases. Por ejemplo, el nucleótido inosina no estándar puede emparejarse con uracilo, citosina y adenina. Dada la correlación conocida entre la hibridación y la estructura química, un experto en la técnica puede reconocer fácilmente las características estándar de las sondas de la invención. Las realizaciones ejemplares se describen en detalle a continuación.

En ciertas realizaciones, las sondas que pueden hibridarse con el Id. de Sec. N°: 16 comprenden aproximadamente 10, aproximadamente 12, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23, aproximadamente 24, aproximadamente 25, aproximadamente 26, aproximadamente 27, aproximadamente 28, aproximadamente 29, aproximadamente 30, aproximadamente 32, aproximadamente 34, aproximadamente 36, aproximadamente 38, aproximadamente 40, aproximadamente 42, aproximadamente 44, aproximadamente 46, aproximadamente 48, aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, o aproximadamente 80 nucleótidos. En ciertas realizaciones, la sonda comprende bases modificadas, no estándar o derivadas, como se define anteriormente.

En ciertas realizaciones, la sonda comprende al menos aproximadamente 20 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 17. En otras realizaciones, la sonda comprende al menos aproximadamente 22 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 17. En otras realizaciones, la sonda comprende al menos aproximadamente 24 nucleótidos

consecutivos de Id. de Sec. N°: 17. En aún otras realizaciones, la sonda comprende al menos aproximadamente 26 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 17. En otras realizaciones, la sonda comprende al menos aproximadamente 28 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 17. En aún otras realizaciones, la sonda comprende al menos aproximadamente 30 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 17. En aún otras realizaciones, la sonda comprende al menos aproximadamente 32 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 17. En aún otras realizaciones, la sonda comprende al menos aproximadamente 34 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 17. En otras realizaciones, la sonda comprende al menos aproximadamente 36 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 17. En aún en otras realizaciones, la sonda comprende al menos aproximadamente 38 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 17. En otras realizaciones, la sonda comprende al menos aproximadamente 40 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 17.

En ciertas realizaciones, la descripción proporciona sondas de ácido nucleico particulares que se pueden utilizar para detectar un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa, así como ciertos otros flavivirus. Estas sondas pueden estar estructuralmente definidas por referencia a sus secuencias de ácido nucleico, tal como se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5	
Id. de Sec. N°: 18 Sonda para detectar Flavivirus	GGN <sup>3</sup> CTAGN <sup>8</sup> GGTTAGAGGAGACCCN <sup>24</sup> N <sup>25</sup> N <sup>26</sup> N <sup>27</sup> N <sup>28</sup> En el que N <sup>3</sup> es A o T; N <sup>8</sup> es A o T; N <sup>24</sup> es C o T; N <sup>25</sup> es G, C, T, A, o está ausente; N <sup>26</sup> es C, T, G, o está ausente; N <sup>27</sup> es G, C, A, T, o está ausente; y N <sup>28</sup> es G, C, A, T, o está ausente.
Id. de Sec. N°: 19 Sonda para detectar miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa	GGACTAGN <sup>8</sup> GGTTAGAGGAGACCCN <sup>25</sup> N <sup>26</sup> N <sup>27</sup> N <sup>28</sup> En el que N <sup>8</sup> es A o T; N <sup>25</sup> es G o A; N <sup>26</sup> es C o T; N <sup>27</sup> es G o T; y N <sup>28</sup> es G o T.
Id. de Sec. N°: 20 Sonda para detectar el virus del Nilo occidental	GGACTAGN <sup>8</sup> GGTTAGAGGAGACCCN <sup>25</sup> CGN <sup>28</sup> En el que N <sup>8</sup> es A o T; N <sup>25</sup> es G o A; y N <sup>28</sup> es G o T.
Id. de Sec. N°: 21 sonda para detectar el virus de la encefalitis japonesa	GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCGN <sup>26</sup> GG En el que N <sup>26</sup> es C o T.
Id. de Sec. N°: 22 sonda para detectar el virus de la encefalitis del valle de Murray	GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCACTC
Id. de Sec. N°: 23 Sonda para detectar el virus Kunjin	AATAN <sup>5</sup> GTGGATTACATGAN <sup>19</sup> TTCAN <sup>24</sup> TGAAG n el que N <sup>5</sup> es T o C; N <sup>19</sup> es G o C; y N <sup>24</sup> es T o C.
Id. de Sec. N°: 24 sonda para detectar el virus del Dengue	GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCN <sup>25</sup> N <sup>26</sup> N <sup>27</sup> N <sup>28</sup> En el que N <sup>25</sup> es C o T; N <sup>26</sup> es C o G; N <sup>27</sup> es C o G; y N <sup>28</sup> es G, C o A.
Id. de Sec. N°: 25 sonda para detectar el virus de la fiebre amarilla	GGTCTAGAGGTTAGAGGAGACCCTCCAG
Id. de Sec. N°: 26 Sonda para detectar el virus de la leucoencefalitis del Myotis de Montana	GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCTTCC
Id. de Sec. N°: 27 Sonda para detectar el virus de Modoc	GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCGGC
Id. de Sec. N°: 28 Sonda Ejemplo 1	GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCGCGG
Id. de Sec. N°: 70 Sonda anti-sentido de Flavivirus	GGGTCTCCTCTAACCTCTAGTCCTTCCCC

En ciertas realizaciones, la sonda comprende cualquiera de las Id. de Sec. N°: 18-28 o 70, o complementarios de los mismos.

Las sondas de ácido nucleico pueden comprender adicionalmente otras secuencias de ácido nucleico que no derivan de y / o no hibridan con un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa u otro flavivirus que puede ser detectado con las sondas descritas. Estas secuencias de ácido nucleico adicionales pueden seleccionarse por un experto en la técnica para proporcionar la funcionalidad deseada para las sondas. Por ejemplo, las sondas de ácidos nucleicos pueden comprender secuencias adicionales que permiten métodos mejorados de detección. Ejemplos de sondas que pueden comprender secuencias de ácido nucleico adicionales o que pueden adaptarse de otra manera para su uso en las sondas, métodos y equipos de la invención se pueden encontrar en las patentes Estadounidenses núms. 6.323.337, 6.248.526, 6.150.097, 6.117.635, 6.090.552, 5.866.336, y 5.723.591. Además, los métodos de detección de un ácido nucleico, incluyendo un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa o de otros flavivirus detectables están ampliamente

5 descritas en las secciones 4.2 y 4.3, a continuación. Algunos de estos métodos también utilizan secuencias de ácidos nucleicos adicionales que pueden estar presentes en los cebadores de ácido nucleico de la invención; dichas secuencias de ácidos nucleicos adicionales y métodos de uso de estas secuencias adicionales para detectar un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa se describen a continuación.

Las sondas de ácido nucleico se pueden preparar por cualquier método conocido para un experto en la materia sin limitación. En particular, los métodos utilizados para preparar los cebadores de ácido nucleico de la invención descritas anteriormente también pueden utilizarse para preparar las sondas de ácido nucleico de la invención.

10 Además de la secuencia de nucleótidos de la sonda, la sonda puede comprender secuencias de nucleótidos adicionales u otras porciones que no inhiben los métodos de la presente invención. En formas de realización adecuadas de la invención, la sonda puede comprender secuencias de nucleótidos adicionales u otras porciones que facilitan los métodos de la presente invención. Por ejemplo, la sonda puede estar bloqueada en su extremo 3' para evitar el cebamiento de polimerización no deseado de ácido nucleico por la sonda. Además, las porciones  
15 pueden estar presentes dentro de la sonda que estabilizan o desestabilizan la hibridación de los fragmentos de sonda o sonda con la secuencia de nucleótidos. Las sondas de la invención también pueden comprender nucleótidos modificados, no estándar o derivados como se ha definido anteriormente.

20 En ciertas realizaciones, la sonda puede comprender una porción detectable. La porción detectable puede ser cualquier porción detectable conocida por un experto en la materia sin limitación. Además, la porción detectable puede ser detectable por cualquier medio conocido para un experto en la materia sin limitación. Por ejemplo, la porción detectable puede ser detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos.

25 Una variedad de porciones detectables que pueden utilizarse para detectar las sondas, así como los métodos para su unión a la sonda, son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, enzimas (por ejemplo, fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano picante) y sustratos enzimáticos, porciones radiactivas, porciones fluorescentes, cromóforos, marcajes quimioluminiscentes, marcajes electroquimioluminiscentes, como Origin™ (Igen), ligandos que tienen parejas de unión específicas, o cualquier otro marcaje que puede interactuar entre sí para mejorar, alterar, o  
30 disminuir una señal. Por supuesto, se puede realizar una reacción de nucleasa 5' usando una polimerasa de DNA termoestable a temperaturas elevadas, la porción detectable no puede degradarse o de otra manera ser indetectable debido a tales temperaturas elevadas.

35 En ciertas realizaciones, la porción detectable puede ser una porción fluorescente. La porción fluorescente puede ser cualquier porción fluorescente conocida por un experto en la materia sin limitación. En general, se prefieren las porciones fluorescentes con amplios cambios Stokes, permitiendo el uso de fluorímetros con filtros en lugar de monocromómetros y aumentar la eficacia de la detección. En ciertas realizaciones, la porción fluorescente se puede seleccionar del grupo que consiste en colorantes de la familia de la fluoresceína (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA), colorantes de la familia de la polihalofluoresceína, colorantes de la familia de la hexaclorofluoresceína,  
40 colorantes de la familia de la cumarina (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR), colorantes de la familia de la rodamina (Integrated DNA Technologies, Inc.), colorantes de la familia de la cianina, colorantes de la familia de la oxazina, colorantes de la familia de la tiazina, colorantes de la familia de la escuarina, colorantes de la familia de los lantánidos quelados y colorantes de la familia de BODIPY® (Molecular Probes, Inc.). En una realización preferida, la porción fluorescente es 6-carboxifluoresceína (FAM™) (Integrated DNA Technologies, Inc.). Otros ejemplos de  
45 porciones fluorescentes que se pueden utilizar en las sondas, métodos y equipos de la invención pueden encontrarse en las Patentes Estadounidenses N° 6.406.297, 6.221.604, 5.994.063, 5.808.044, 5.880.287, 5.556.959, y 5.135.717.

50 En otras realizaciones, la porción detectable puede ser una porción detectable distinta de una porción fluorescente. Entre las porciones radiactivas, se prefieren los compuestos marcados con <sup>32</sup>P. Cualquier método conocido para un experto en la técnica sin limitación puede ser utilizado para introducir <sup>32</sup>P en una sonda. Por ejemplo, una sonda puede marcarse con <sup>32</sup>P mediante el marcaje en 5' con una quinasa o por inserción aleatoria mediante desplazamiento de mella. Las porciones detectables que son enzimas normalmente se pueden detectar por su actividad. Por ejemplo, la fosfatasa alcalina puede detectarse midiendo la fluorescencia producida por la acción de la  
55 enzima sobre sustratos apropiados. Cuando un miembro de parejas de unión específicas se utiliza como porción detectable, la presencia de la sonda puede detectarse mediante la detección de la unión específica de una molécula para el miembro de la pareja de unión específica. Por ejemplo, un antígeno se puede unir a la sonda, y un anticuerpo monoclonal específico para ese antígeno se puede utilizar para detectar la presencia del antígeno y por lo tanto de la sonda.

60 Otras parejas de unión específicas que se pueden usar como porciones detectables incluyen la biotina y avidina o estreptavidina, IgG y proteína A, y otras numerosas parejas de receptor-ligando conocidas en la técnica. Aún otros ejemplos de porciones detectables que no son porciones fluorescentes se pueden encontrar en las patentes Estadounidenses N°. 5.525.465, 5.464.746, 5.424.414, y 4.948.882.

65

La descripción anterior de porciones detectables no pretende categorizar los diferentes marcajes en distintas clases, ya que el mismo marcador puede servir de varias formas diferentes. Por ejemplo, <sup>125</sup>I puede servir como una porción radiactiva o como un reactivo denso en electrones. La peroxidasa de rábano picante puede servir como enzima o como antígeno para un anticuerpo monoclonal. Además, se pueden combinar varias porciones detectables para el efecto deseado. Por ejemplo, se podría marcar una sonda con biotina, y detectar su presencia con avidina marcada con <sup>125</sup>I, o con un anticuerpo monoclonal anti-biotina marcado con peroxidasa de rábano picante. Otras permutaciones y posibilidades serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica, y se consideran como equivalentes dentro del alcance de la presente invención.

El método de enlace o la conjugación de la porción detectable a la sonda depende, por supuesto, del tipo de porción o porciones detectables utilizadas y la posición de la porción detectable en la sonda.

La porción detectable puede estar unida a la sonda directamente o indirectamente mediante una variedad de técnicas. Dependiendo del tipo preciso de porción detectable utilizada, la porción detectable puede estar localizada en el extremo 5' o 3' de la sonda, que se encuentra internamente en la secuencia de nucleótidos de la sonda, o unido a brazos espaciadores de varios tamaños y composiciones para facilitar las interacciones de señal. Utilizando reactivos de fosforamidita disponibles comercialmente, se pueden producir oligonucleótidos que contienen grupos funcionales (por ejemplo, tioles o aminas primarias) en cualquier extremo terminal a través de una fosforamidita adecuadamente protegida, y puede unirse a una porción detectable a la misma usando los protocolos descritos en, por ejemplo, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, ed. por Innis et al., Academic Press, Inc., 1990.

Los métodos para introducir reactivos de funcionalización de oligonucleótidos para introducir una o más porciones sulfhidrilo, amino o hidroxilo en la secuencia de sonda de oligonucleótidos, normalmente en el extremo 5' se describen en la patente Estadounidense N° 4.914.210. Un grupo fosfato 5' puede introducirse como un radioisótopo utilizando polinucleótido quinasa y [gamma-<sup>32</sup>P]ATP para proporcionar un grupo marcador. La biotina se puede añadir al extremo 5' mediante la reacción de un residuo de aminotimidina o enlazante alquilamino, introducido durante la síntesis, con un éster de N-hidroxisuccinimida de biotina. Otros métodos para unir una porción detectable, incluyendo una porción fluorescente, a la sonda se pueden encontrar en la patente de Estados Unidos N° 5.118.802.

También es posible unir una porción detectable en el extremo 3' terminal de la sonda mediante el empleo de, por ejemplo, polinucleótido transferasa terminal para añadir una porción deseada, tal como, por ejemplo, cordicepina <sup>35</sup>S-dATP, y dUTP biotinilado.

Los derivados de oligonucleótidos son también porciones detectables que pueden utilizarse en las sondas, métodos y equipos de la presente invención. Por ejemplo, eteno-dA y eteno-A son nucleótidos fluorescentes de adenina conocidos que pueden incorporarse a una sonda de oligonucleótidos. Del mismo modo, eteno-dC es otro análogo que podría utilizarse en la síntesis de la sonda. Las sondas que contienen tales derivados de nucleótidos pueden degradarse para liberar mononucleótidos que son mucho más fluorescentes que la sonda intacta, por ejemplo, una actividad nucleasa 5' a 3' de polimerasa.

En ciertas realizaciones, una sonda puede marcarse con más de una porción detectable. En algunas de tales realizaciones, cada porción detectable se puede conectar individualmente a diferentes bases de la sonda. En otras realizaciones, más de una porción detectable se puede conectar a la misma base de la sonda.

En ciertas realizaciones, la porción detectable puede unirse al extremo 5' de la sonda. En otras realizaciones, la porción detectable puede unirse a la sonda en un residuo que está dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, aproximadamente 35, o alrededor de 40 residuos del extremo 5' de la sonda. En ciertas realizaciones, la porción detectable puede estar unida al extremo 3' de la sonda. En otras realizaciones, la porción detectable puede unirse a la sonda en un residuo que está dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, aproximadamente 35, o alrededor de 40 residuos del extremo 3' de la sonda. La porción detectable puede estar unida a cualquier parte de un residuo de la sonda.

Por ejemplo, la porción detectable puede estar unida a una porción de azúcar, fosfato, o base de un nucleótido en la sonda. En otras realizaciones, la porción detectable puede unirse entre dos residuos de la sonda.

En ciertas realizaciones, la sonda puede comprender una porción fluorescente y una porción atenuadora. En tales realizaciones, la porción fluorescente puede ser cualquier porción fluorescente conocida para un experto en la técnica, como se describe anteriormente. Además, la porción atenuadora puede ser cualquier porción atenuadora conocida por un experto en la materia sin limitación. En ciertas realizaciones, la porción atenuadora se puede seleccionar del grupo que consiste en colorantes de la familia de la fluoresceína, colorantes de la familia de la polihalofluoresceína, colorantes de la familia de la hexaclorofluoresceína, colorantes de la familia de la cumarina, colorantes de la familia de la rodamina, colorantes de la familia de la cianina, colorantes de la familia de la oxazina, colorantes de la familia de la tiacina, colorantes de la familia de la escuarina, colorantes de la familia de los quelatos de lantánido, colorantes de la familia de BODIPY®, y porciones atenuadoras no fluorescentes. En ciertas realizaciones, las porciones atenuadoras no fluorescentes pueden ser colorantes de la familia BHQ™ (incluyendo los

atenuadores descritos en el documento WO 01/86001), Iowa Black™, o Dabcyl (Integrated DNA Technologies, Inc.). Otros ejemplos de porciones atenuadoras específicas incluyen, por ejemplo, pero no a modo de limitación, TAMRA (N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirodamina) (Molecular Probes, Inc.), DABCYL (4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzoico), Iowa Black™ (Integrated DNA Technologies, Inc.), Cy3™ (Integrated DNA Technologies, Inc.) o Cy5™ (Integrated DNA Technologies, Inc.). En una realización preferida, la porción atenuadora es Cy5™. Otros ejemplos de porciones atenuadoras que pueden utilizarse en las sondas, métodos y equipos de la invención pueden encontrarse en las Patentes Estadounidenses N° 6.399.392, 6.348.596, 6.080.068, y 5.707.813.

En ciertas realizaciones, la porción atenuadora se puede unir al extremo 3' de la sonda. En otras realizaciones, la porción atenuadora se puede conectar a la sonda en un residuo que está a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, aproximadamente 35, o alrededor de 40 residuos del extremo 5' de la sonda. En ciertas realizaciones, la porción atenuadora se puede unir al extremo 3' de la sonda. En otras realizaciones, la porción atenuadora se puede conectar a la sonda en un residuo que está a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, aproximadamente 35, o alrededor de 40 residuos del extremo 3' de la sonda. En una realización preferida, la porción fluorescente se une al extremo 5' de la sonda y la porción atenuadora está unida a un residuo que está dentro de aproximadamente 9 residuos del extremo 5' de la sonda. La porción atenuadora se puede unir a cualquier parte de un residuo de la sonda. Por ejemplo, la porción atenuadora se puede unir a una porción de azúcar, fosfato, o base de un nucleótido en la sonda. En otras realizaciones, la porción atenuadora se puede unir entre dos residuos de la sonda.

Aunque no se pretende estar ligado a ninguna teoría o mecanismo de acción particular, se cree que cuando la sonda está intacta, un fotón emitido por la porción fluorescente puede ser absorbido y por lo tanto inactivado por la porción atenuadora. La porción atenuadora entonces o bien libera la energía del fotón como un fotón de diferente longitud de onda o en forma de calor. Por lo tanto, la porción atenuadora también puede ser una porción fluorescente. Como se describió anteriormente, este fenómeno se denomina transferencia de energía por resonancia de fluorescencia ("FRET"). La escisión de la sonda entre la porción fluorescente y la porción atenuadora resulta en una reducción en la atenuación de la fluorescencia emitida por la porción fluorescente por la porción atenuadora.

En general, la transferencia de energía entre la porción fluorescente y la porción atenuadora depende de la distancia entre la porción fluorescente y la porción atenuadora y la distancia de transferencia crítica de la pareja de porciones fluorescente-atenuadora particular. La distancia de transferencia crítica es a la vez característica y constante para una porción fluorescente dada combinada con una porción atenuadora determinada. Además, la relación espacial de la porción fluorescente en referencia a la porción atenuadora se puede determinar con mayor sensibilidad cuando la distancia de transferencia crítica de la pareja de porciones fluorescente-atenuadora está cerca de la distancia entre la porción fluorescente y la porción atenuadora. En consecuencia, el experto en la materia puede seleccionar la porción fluorescente y la porción atenuadora de tener una distancia de transferencia crítica que está cerca de la distancia que separa la porción fluorescente de la porción atenuadora en la sonda. Las distancias de transferencia críticas de parejas de porciones fluorescente-atenuadora particulares son bien conocidas en la técnica y se pueden encontrar, por ejemplo, en un artículo de Wu y Brand, 1994, Anal. Biochem. 218: 1-13.

Otros criterios para la selección de determinadas parejas de porciones fluorescente-atenuadora particulares incluyen, por ejemplo, el rendimiento cuántico de emisión fluorescente por la porción fluorescente; la longitud de onda de la fluorescencia emitida por la porción fluorescente; el coeficiente de extinción de la porción atenuadora; la longitud de onda de la fluorescencia, en su caso, emitida por la porción atenuadora; y el rendimiento cuántico de la emisión fluorescente, en su caso, por la porción atenuadora. Además, si la porción atenuadora es también una porción fluorescente, la porción atenuadora y la porción fluorescente se pueden seleccionar preferiblemente de manera que la fluorescencia emitida por uno fácilmente se puede distinguir de la fluorescencia emitida por la otra. Se puede encontrar una mayor orientación sobre la selección de determinadas parejas de porciones fluorescente-atenuadora particulares en un artículo de revisión de Klostermeier y Millar, 2002, Biopolymers 61: 159-179.

Los ejemplos de combinaciones de porciones fluorescentes y atenuadoras que se pueden utilizar en este aspecto de la invención incluyen, pero no se limitan a la porción fluorescente rodamina 590 y la porción atenuadora de cristal violeta. Una combinación preferida de porciones fluorescente y atenuadora es la porción fluorescente 6-carboxifluoresceína y la porción atenuadora Cy5™. Otros ejemplos de parejas de porciones fluorescente-atenuadora que se pueden utilizar en las sondas, métodos y equipos de la invención pueden encontrarse en la Patente de Estados Unidos N° 6.245.514.

Los ejemplos de moléculas que pueden utilizarse tanto como porciones fluorescentes o atenuadoras en FRET incluyen fluoresceína, 6-carboxifluoresceína, 2'7'-dimetoxi-4'5'-dicloro-6-carboxifluoresceína, rodamina, 6-carboxirodamina, 6-carboxi-X-rodamina, y ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS). Cuando una porción fluorescente es un donador o un aceptor se define por sus espectros de excitación y de emisión, y la porción atenuadora con la que está emparejada. Por ejemplo, FAM™ se excita más eficientemente por la luz con una longitud de onda de 488 nm, y emite luz con un espectro de 500 a 650 nm, y un máximo de emisión de 525 nm. En consecuencia, FAM™ es una porción fluorescente adecuada para su uso con, por ejemplo, con TAMRA una porción atenuadora, que tiene en su máximo de excitación 514 nm.



En algunas realizaciones, se utilizan las siguientes variantes de sonda:

5 FGGACTAGAIGGTTAGAGGAGACCCCGCGGP (que es una variante de Id. de Sec. N°: 28);  
 FGGAEUAGAIGGUUAGAGGAGAE EEEEGEGGP (que es una variante de Id. de Sec. N°: 28);  
 FGGGTCTCCITCTAACCTCTAGTCCTTCCCCCP (que es una variante de Id. de Sec. N°: 70);  
 FGGGUEUEEIEUAACCTCTAGTCCTTCCCCCP (que es una variante de Id. de Sec. N°: 70); y  
 FGGTCTAGAIGGTTAGAGGAGACCCTCCAGP (que es una variante de Id. de Sec. N°: 25).

10 En todas las sondas anteriores, F = CY5; I = FAM; P = PO4; T = dU propinilo; E = 5-metil-dC).

### 10 3.3. Ácidos nucleicos de miembros detectables del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa

15 Los cebadores, sondas, métodos y equipos de la descripción son útiles para la detección de ciertos miembros del género Flavivirus. En particular, los cebadores, sondas, métodos y equipos son útiles para la detección de miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa. Por ejemplo, los miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa que pueden detectarse según la presente invención incluyen, pero no se limitan a, virus de la encefalitis japonesa, el virus del Nilo occidental, virus de la encefalitis del Valle de Murray, VESL, y el virus Kunjin. En varios casos, la secuencia completa de al menos una cepa de algunos de estos virus ha sido determinada. Estas secuencias pueden encontrarse por referencia a los números de acceso de GenBank presentados en la Figura 4, que presenta una alineación de secuencias de ácido nucleico de los miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa con los oligonucleótidos de la invención.

20 Las secuencias completas de ácidos nucleicos de los genomas de otros miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa, por ejemplo, el virus de Cacipacore, virus de la encefalitis de San Luis, el virus Usutu, y el virus de Youende, aún no se han determinado. Sin embargo, se cree que los cebadores y sondas de la presente invención hibridan con las secuencias que tienen un alto grado de conservación con todos los miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa. Además, un experto en la técnica puede reconocer fácilmente que los cebadores y sondas pueden hibridarse con un ácido nucleico a partir de uno de los miembros aún no secuenciados tras la determinación de las secuencias de ácidos nucleicos de estos genomas virales.

25 En ciertas realizaciones, un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa puede ser detectado. En otras realizaciones, un ácido nucleico de virus de la encefalitis japonesa se puede detectar. En aún otras realizaciones, un ácido nucleico de virus del Nilo occidental puede ser detectado. En aún otras realizaciones, un ácido nucleico de virus de la encefalitis del valle de Murray puede ser detectado. En aún otras realizaciones, un ácido nucleico del VESL puede ser detectado. En aún otras realizaciones, un ácido nucleico de virus de la encefalitis japonesa, el virus del Nilo occidental, VESL o virus de la encefalitis del valle de Murray puede ser detectado.

30 El ácido nucleico a detectar puede ser cualquier ácido nucleico de un flavivirus detectable como se describe aquí. Normalmente, el ácido nucleico será un RNA monocatenario, ya que los flavivirus a detectar tienen genomas de RNA de cadena sencilla de cadena positiva. Sin embargo, el ácido nucleico a detectar también puede ser DNA correspondiente a la secuencia de un genoma de RNA de un flavivirus que puede ser detectado. Tal DNA se puede preparar, por ejemplo, mediante la transcripción inversa del RNA viral como se describe en la Sección 4.1, a continuación.

35 La presencia de un ácido nucleico de un flavivirus detectable puede ser detectada en una muestra de cualquier fuente conocida para un experto en la materia sin limitación. Por ejemplo, el ácido nucleico viral puede ser detectado en una muestra biológica, tal como se define anteriormente. El ácido nucleico viral puede ser detectado en una muestra de cualquier fuente natural, incluyendo un animal vertebrado, tal como un pez, anfibio, reptil, pájaro, o un mamífero, y un animal invertebrado, tales como insectos, arácnidos, crustáceos, etc. Además, la muestra a analizar puede ser de una fuente inerte, tal como una muestra de agua o suelo o una muestra de frotis, como la que deriva de los análisis de superficies.

40 En ciertas realizaciones, el ácido nucleico a detectar se puede amplificar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica. La amplificación se puede realizar antes de la detección de acuerdo con los métodos descritos en este documento o la amplificación se puede realizar simultáneamente con la detección como se describe aquí. Los métodos de amplificación de un ácido nucleico se describen a continuación y en, por ejemplo, Saiki et al., 1988, Science 239: 487-91.

### 40 3.4. Ácidos nucleicos de otros flavivirus detectables

45 Las sondas, métodos y equipos descritos en este documento también pueden usarse para detectar un ácido nucleico a partir de otros flavivirus, incluyendo, pero sin limitarse a, el virus del Dengue, virus de leucoencefalitis de Myotis de Montana, virus Modoc, y el virus de la fiebre amarilla. Como con los miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa, las secuencias de ácido nucleico de al menos una cepa de algunos de estos virus ha sido determinada. Estas secuencias pueden encontrarse por referencia a los números de acceso presentados en la

Figura 5, que presenta una alineación de secuencias de ácidos nucleicos de estos flavivirus detectables con Id. de Sec. N°: 16.

Como se discute aquí, los cebadores de Id. de Sec. N°: 41, Id. de Sec. N°: 42, Id. de Sec. N°: 43, Id. de Sec. N°: 44, Id. de Sec. N°: 45, Id. de Sec. N°: 46, Id. de Sec. N°: 47, Id. de Sec. N°: 48, Id. de Sec. N°: 49, Id. de Sec. N°: 50, Id. de Sec. N°: 51, Id. de Sec. N°: 52, Id. de Sec. N°: 53, Id. de Sec. N°: 54, e Id. de Sec. N°: 55 son útiles para amplificar y / o detectar el virus del dengue y los cebadores Id. de Sec. N°: 56, Id. de Sec. N°: 57, Id. de Sec. N°: 58, Id. de Sec. N°: 59, Id. de Sec. N°: 60, Id. de Sec. N°: 61, Id. de Sec. N°: 62, e Id. de Sec. N°: 63 son útiles para amplificar y / o detectar el virus de la fiebre amarilla.

### 3.5. Reacciones de amplificación multiplex para detectar diferentes variantes de virus o diferentes virus

Los cebadores y sondas de la descripción se pueden combinar en las reacciones para detectar más de un ácido nucleico viral. Por ejemplo, en algunos casos, se combinan múltiples cebadores corriente abajo y / o corriente arriba en una mezcla de reacción para su uso en la detección de diferentes variantes virales (por ejemplo, la que no sería detectada, o sólo se detectaría pobremente por un único cebador o par de cebadores). En algunas realizaciones, múltiples cebadores corriente abajo y / o corriente arriba se combinan en una mezcla de reacción para detectar más de un virus. En tales realizaciones, los cebadores específicos para cada virus a ser detectado se incluyen en la mezcla de reacción, permitiendo de este modo la amplificación de cada ácido nucleico viral presente en una muestra. Por ejemplo, cualquier combinación de cebadores para la amplificación del virus del Nilo occidental, VESL, el virus de Dengue y el virus de la fiebre amarilla se pueden incluir dependiendo de qué virus se desea detectar. La detección de múltiples virus utilizando una sola reacción es útil, por ejemplo, cuando se está analizando un banco de sangre o en otros casos en los que la contaminación con cualquier virus es todo lo que necesita ser detectado.

Las sondas se pueden utilizar en las reacciones descritas anteriormente. Dependiendo de qué resultado se desea, se puede utilizar una única sonda capaz de detectar cualquier producto de ácido nucleico viral posible. Alternativamente, se puede utilizar una sonda diferente que hibrida específicamente con cada producto de ácido nucleico viral posible. En tales casos, puede ser útil emplear un marcador detectable diferente con cada sonda, permitiendo de este modo la diferenciación de los productos de ácidos nucleicos virales.

En algunas realizaciones, se puede usar PCR multiplex para detectar múltiples ácidos nucleicos virales usando los componentes descritos anteriormente. La PCR Multiplex permite la amplificación y / o detección de múltiples fragmentos de polinucleótido en la misma reacción. Véase, por ejemplo, PCR PRIMER, A LABORATORY MANUAL (Dieffenbach, ed. 1995) Cold Spring Harbor Press, páginas 157-171.

En algunas realizaciones, se utilizan cebadores para la detección de ambos virus del Nilo occidental y VESL. En algunas realizaciones, se utilizan cebadores para la detección del virus del Nilo occidental, VESL, y el virus de Dengue. En algunas formas de realización, se utilizan cebadores para la detección del virus del Nilo occidental, VESL, y el virus de la fiebre amarilla. En algunas formas de realización, se utilizan cebadores para la detección del virus del Nilo occidental, VESL, la fiebre amarilla y el virus del dengue. En algunos casos, las reacciones multiplex comprenden además al menos una sonda como se describe aquí.

### 4. Métodos para la detección y / o cuantificación de un ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa y ciertos otros Flavivirus

En ciertos aspectos, la presente descripción proporciona métodos para el uso de cebadores de ácidos nucleicos y sondas para detectar un ácido nucleico de ciertos flavivirus. En otros aspectos, la presente descripción proporciona métodos para el uso de cebadores de ácidos nucleicos y sondas para cuantificar un ácido nucleico de ciertos flavivirus en una muestra. Cualquier método para el uso de cebadores de ácidos nucleicos y sondas para detectar un ácido nucleico conocido para un experto en la técnica sin limitación puede ser utilizado para detectar un ácido nucleico de un flavivirus detectable, como se describió anteriormente. En ciertas realizaciones, los métodos proporcionan el uso de un cebador y una sonda para detectar un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa. En otras realizaciones, los métodos proporcionan el uso de dos cebadores y una sonda para detectar un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa. En aún otras realizaciones, los métodos proporcionan el uso de una sonda para detectar ciertos flavivirus, como se describe a continuación.

#### 4.1. Ensayos basados en la reacción nucleasa 5' para la detección y / o cuantificación de un ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa

En ciertos aspectos, los métodos comprenden la detección de un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa con un cebador y una sonda. Estos métodos generalmente comprenden poner en contacto un cebador hibridado con un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa con una enzima con actividad nucleasa 5'. La enzima con actividad nucleasa 5' fragmenta entonces una sonda hibridada con el ácido nucleico del miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa en una reacción nucleasa 5'. La sonda puede marcarse con una porción detectable que permite la detección de la fragmentación de

la sonda. Tales métodos se basan en aquellos descritos en la patente Estadounidense N° 6.214.979, 5.804.375, 5.487.972 y 5.210.015.

5 En una reacción nucleasa 5', el ácido nucleico, el cebador y la sonda puede contactarse con cualquier enzima conocida por un experto en la técnica por tener actividad nucleasa 5' a 3' sin limitación. Las condiciones se eligen preferiblemente para permitir a la polimerasa escindir la sonda y liberar una pluralidad de fragmentos de la sonda del ácido nucleico. Las enzimas preferidas con actividad nucleasa 5' incluyen polimerasas de ácidos nucleicos dependiente de molde. Las formas nativas y recombinantes conocidas de tales polimerasas incluyen, por ejemplo, polimerasa de DNA I de *E. coli* (Fermentas, Inc., Hanover, MD), polimerasa de DNA de *Bacillus stearothermophilus*,  
10 y polimerasa de DNA de *Thermococcus littoralis*.

En realizaciones preferidas, las enzimas con actividad nucleasa 5' son polimerasas de ácidos nucleicos termoestables y termoactivas. Tales polimerasas termoestables incluyen, pero no se limitan a, las formas nativas y recombinantes de polimerasas a partir de una variedad de especies de los géneros de eubacterias *Thermus*,  
15 *Thermatoga* y *Thermosiphon*. Por ejemplo, las polimerasas de especies de *Thermus* que se pueden utilizar en los métodos de la invención incluyen la polimerasa de DNA (Taq) de *Thermus aquaticus*, la polimerasa de DNA (Tth) de *Thermus thermophilus*, la polimerasa de DNA (Z05) de especies de *Thermus* Z05, y (sps17) especies de *Thermus* sps17, como se describe en las patentes Estadounidenses N° 5.405.774, 5.352.600, 5.079.352, 4.889.818, 5.466.591, 5.618.711, 5.674.738, y 5.795.762. Las polimerasas de *Thermatoga* que pueden utilizarse en los  
20 métodos de la invención incluyen, por ejemplo, polimerasa de DNA de *Thermatoga maritima* y polimerasa de DNA de *Thermatoga neapolitana*, mientras que un ejemplo de una polimerasa de *Thermosiphon* que se puede utilizar es la polimerasa de DNA de *Thermosiphon africanus*. Las secuencias de las polimerasas de DNA de *Thermatoga maritima* y *Thermosiphon africanus* están publicadas en la solicitud de patente internacional N° PCT / US91 / 07035 con la Publicación N° WO 92/06200. La secuencia de *Thermatoga neapolitana* puede encontrarse en la Publicación de  
25 Patente Internacional N° WO 97/09451.

Una reacción nucleasa 5' comprende poner en contacto el ácido nucleico a detectar con un cebador, una sonda, y una enzima que tiene actividad nucleasa de 5' a 3', bajo condiciones en las que el cebador y la sonda se hibridan con el ácido nucleico. Los componentes de una reacción nucleasa 5' pueden ponerse en contacto con el ácido  
30 nucleico a detectar en cualquier orden, por ejemplo, el cebador puede ponerse en contacto con el ácido nucleico a detectar primero, seguido por la sonda y enzima con actividad nucleasa 5', o, alternativamente, la enzima con actividad nucleasa 5' puede ponerse en contacto el ácido nucleico a detectar primero, seguido por la sonda y después el cebador. En ciertas realizaciones, más de un cebador o sonda se pueden añadir a la reacción nucleasa 5'. En ciertas realizaciones preferidas, un par de cebadores pueden ponerse en contacto con el ácido nucleico en una reacción de nucleasa 5'. El cebador puede ser cualquier cebador capaz de cebar una reacción de síntesis de  
35 DNA. Cuando sólo se utiliza un cebador, el cebador debe hibridar con el ácido nucleico antes de la sonda, es decir, el extremo 3' del cebador debe apuntar hacia el extremo 5' de la sonda. El extremo 3' del cebador puede hibridar adyacente al extremo 5' de la sonda, o el extremo 3' del cebador puede hibridar aún más corriente arriba del extremo 5' de la sonda. Cuando se utiliza más de un cebador, al menos un cebador debe hibridar con el ácido nucleico a detectar antes de la sonda, como se describió anteriormente.

Ciertas realizaciones de las reacciones nucleasa 5' se basan en varias reacciones de nucleasa 5' que son conocidas por los expertos en la técnica. Ejemplos de tales reacciones se describen en detalle, por ejemplo, en la patente Estadounidense N° 5.210.015.  
45

En resumen, en una reacción nucleasa 5', un ácido nucleico diana se pone en contacto con un cebador y una sonda en condiciones en las que el cebador y la sonda se hibridan con una cadena del ácido nucleico. El ácido nucleico, cebador y sonda también se ponen en contacto con una enzima, por ejemplo una polimerasa de ácido nucleico, que posee actividad nucleasa 5' a 3'. Las polimerasas de ácidos nucleicos que poseen actividad nucleasa 5' a 3' pueden escindir la sonda hibridada con el ácido nucleico corriente abajo del cebador. El extremo 3' del cebador proporciona un sustrato para la extensión de un nuevo ácido nucleico basado en el ácido nucleico molde mediante la polimerasa de ácido nucleico. A medida que la polimerasa extiende el nuevo ácido nucleico, se encuentra con el extremo 5' de la sonda y comienza a escindir fragmentos de la sonda.  
50

El cebador y la sonda pueden ser diseñados de tal manera que hibridan con el ácido nucleico diana en estrecha proximidad entre sí de tal manera que la unión de la polimerasa de ácido nucleico al extremo 3' del cebador lo pone en contacto con el extremo 5' de la sonda. En este proceso, no se requiere la extensión de ácido nucleico para llevar la polimerasa de ácido nucleico en posición para llevar a cabo la escisión. El término "escisión independiente de la polimerización" se refiere a este proceso.  
60

Alternativamente, si el cebador y la sonda hibridan con regiones espaciadas a más distancia del ácido nucleico, la extensión de ácido nucleico debe ocurrir antes de que la polimerasa de ácido nucleico se encuentra con el extremo 5' de la sonda. A medida que continúa la polimerización, la polimerasa escinde progresivamente fragmentos del extremo 5' de la sonda. Esta escisión continúa hasta que la porción de la sonda se ha desestabilizado hasta el punto que se disocia de la molécula de plantilla. El término "escisión dependiente de la polimerización" se refiere a este proceso.  
65

Una ventaja de la escisión independiente de la polimerización reside en la eliminación de la necesidad de amplificación del ácido nucleico. En ausencia de la extensión del cebador, la hebra del ácido nucleico es sustancialmente monocatenaria. Siempre que el cebador y la sonda estén unidos adyacentemente al ácido nucleico, pueden ocurrir rondas secuenciales de hibridación de oligonucleótidos y escisión de fragmentos. Por lo tanto, pueden fragmentarse cantidades suficientes de sonda para producir una señal detectable, permitiendo así la detección en ausencia de polimerización.

En cualquier proceso, se proporciona una muestra que contiene el ácido nucleico. Si el ácido nucleico es de doble cadena, debe primero desnaturalizarse, por ejemplo, separar las cadenas del ácido nucleico una de otra. Cualquier método de desnaturalización adecuado, incluyendo físicos, químicos o enzimáticos, conocidos por un experto en la técnica se puede utilizar sin limitación para separar las hebras de ácidos nucleicos. Un método físico preferido para la separación de cadenas es calentar el ácido nucleico hasta que esté completamente desnaturalizado (> 99%). La desnaturalización por calor típica implica temperaturas que oscilan entre aproximadamente 80 °C y aproximadamente 105 °C, durante aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 10 minutos. Como una alternativa a la desnaturalización, el ácido nucleico puede existir en forma de una sola hebra en la muestra, tal como, por ejemplo, un virus de RNA o DNA de cadena sencilla.

Hay que señalar que los virus que pueden ser detectados con los cebadores, sondas, métodos y equipos de la invención son los virus de RNA de una sola cadena de sentido positivo. En consecuencia, la desnaturalización del genoma viral nativo no es necesaria para detectar un genoma viral sin amplificar. Sin embargo, si el genoma viral nativo se transcribe de forma inversa en un DNA de acuerdo con ciertas realizaciones de la invención, descritas a continuación, la desnaturalización de los ácidos nucleicos virales amplificados es necesaria antes de la detección con los cebadores y sondas de la invención.

Si el ácido nucleico a detectar es RNA, el RNA puede o bien ser utilizado como un molde de RNA para una reacción de nucleasa 5' como se ha descrito anteriormente, o el RNA se puede utilizar como un molde para la transcripción inversa en DNAc, o ambos a la vez. En ciertas realizaciones, el RNA puede detectarse sin transcripción inversa en DNAc usando los métodos de la invención. Los métodos de escisión independiente de la polimerización tal como se describe anteriormente son particularmente muy adecuados para tales realizaciones. En otras formas de realización, el RNA puede primero retrotranscribirse en DNAc en ausencia de una sonda, y después el producto de DNAc se puede detectar de acuerdo con los métodos de la invención. En aún otras formas de realización, el RNA se puede retrotranscribir en presencia de una sonda, produciendo simultáneamente DNAc que posteriormente se pueden amplificar y / o detectar y detectar la presencia del RNA mediante el análisis de la fragmentación de la sonda como se describe aquí.

Cuando el RNA se retrotranscribe en ausencia de una sonda, el RNA puede transcribirse de forma inversa en DNAc mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica. Los productos de tales retrotranscripciones pueden detectarse entonces como cualquier ácido nucleico detectable de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

Cuando el RNA se retrotranscribe en presencia de una sonda, el RNA puede retrotranscribirse mediante una polimerasa de DNA con actividad nucleasa 5'-3' que puede usar RNA como plantilla para la síntesis de la cadena de DNA. Al igual que con todas las actividades de síntesis de DNA polimerasa conocidos, tales síntesis requieren la presencia de un cebador, tal como los descritos en el presente documento. La DNA polimerasa que puede utilizar el RNA como plantilla es preferiblemente termoestable, de modo que múltiples ciclos de desnaturalización y síntesis de DNA pueden ocurrir sin destruir la polimerasa. Además, la polimerasa de DNA usada para la transcripción inversa puede preferiblemente también sintetizar DNA utilizando una plantilla de DNA. Tales polimerasas se describen en, por ejemplo, las Patentes Estadounidenses N° 6.468.775 (polimerasa de DNA de *Carboxythermus hydrogeniformans*), 5.968.799 (polimerasa de DNA de *Thermosiphon africanus*), 5.736.373 (polimerasa de DNA de *Bacillus pallidus*), 5.674.738 (polimerasa de DNA de especies de *Thermus* Z05), y 5.407.800 (polimerasas de DNA de *Thermus aquaticus* y *Thermus thermophilus*). Además, los métodos y composiciones para la transcripción inversa de un RNA usando una polimerasa de DNA termoestable con actividad de transcripción inversa se describen en las patentes Estadounidenses N° 5.693.517, 5.561.058, 5.405.774, 5.352.600, 5.310.652, y 5.079.352.

Ya sea RNA o DNA, la cadena de ácido nucleico desnaturalizada se pone en contacto con un cebador y una sonda en condiciones de hibridación, que permiten que el cebador y la sonda se unan a la cadena de ácido nucleico. En ciertas realizaciones, dos cebadores pueden usarse para amplificar el ácido nucleico. En tales realizaciones, los dos cebadores pueden seleccionarse de modo que sus posiciones relativas a lo largo del ácido nucleico son tales que un producto de extensión sintetizado a partir de un cebador, después de que el producto de extensión se separa de su molde (complemento), puede servir como un molde para la extensión del otro cebador para producir un producto amplificado de longitud definida. La longitud del producto depende de la longitud de la secuencia entre los dos cebadores y la longitud de los propios cebadores.

Debido a que las cadenas complementarias son normalmente más largas que la sonda o el cebador, las cadenas tienen más puntos de contacto y por lo tanto una mayor probabilidad de encontrarse y unirse entre sí durante

cualquier período de tiempo determinado. Un elevado exceso molar de la sonda y el cebador ayuda a desplazar el equilibrio hacia la hibridación del cebador y la sonda en lugar de reasociación del molde.

El cebador debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia del agente para la polimerización. La longitud exacta y la composición del cebador puede depender de muchos factores, incluyendo la temperatura de la reacción de hibridación, el origen y composición del cebador, la proximidad del sitio de hibridación de la sonda al sitio de hibridación del cebador, y la proporción de concentración cebador:sonda. Por ejemplo, dependiendo de la complejidad de la secuencia, un cebador de oligonucleótido contiene normalmente alrededor de 15-30 nucleótidos, aunque puede contener menos o más nucleótidos. Los cebadores deben ser suficientemente complementarios para hibridar selectivamente a sus respectivas cadenas y formar dúplex estables.

Cada cebador puede ser seleccionado para ser "sustancialmente" complementario a una cadena del ácido nucleico. Los cebadores no necesitan reflejar la secuencia exacta del molde, pero deben ser suficientemente complementarios para hibridar selectivamente a sus respectivas cadenas en las condiciones de reacción apropiadas. Pueden intercarse bases no complementarias o secuencias más largas en el cebador o localizados en los extremos del cebador, siempre que el cebador conserve complementariedad suficiente con su cadena molde para formar un dúplex estable con él. Las secuencias de nucleótidos no complementarias de los cebadores pueden incluir sitios de enzimas de restricción. Cualquier secuencia de nucleótidos no complementaria preferiblemente no debe estar en el extremo 3' del cebador.

La sonda se hibrida preferentemente con el ácido nucleico a detectar antes de que la polimerasa se una al ácido nucleico y al cebador y comience a extender la nueva cadena de ácido nucleico a partir del cebador basado en el molde de ácido nucleico detectable. Es posible para la polimerasa unirse al cebador y al ácido nucleico a detectar antes de que la sonda contacte con el ácido nucleico detectable; sin embargo, esta disposición puede dar lugar a una disminución de la fragmentación de la sonda a menos que se lleven a cabo múltiples ciclos de extensión del cebador, como en una reacción de PCR basada en la reacción nucleasa 5' como se describe a continuación. Por consiguiente, es preferible que la sonda hibride con el ácido nucleico a detectar antes de que comience la extensión del cebador por la polimerasa.

Una variedad de técnicas conocidas para un experto en la técnica pueden emplearse para mejorar la probabilidad de que la sonda hibride con el ácido nucleico detectable antes de que la polimerización de extensión del cebador alcance esta región dúplex, o antes de que la polimerasa se una al oligonucleótido corriente arriba en el proceso independiente de la polimerización. Por ejemplo, las moléculas de cebador cortas requieren generalmente temperaturas más bajas para formar complejos híbridos suficientemente estables con el ácido nucleico. Por lo tanto, la sonda puede estar diseñada para ser más larga que el cebador para que la sonda se hibride preferentemente con el ácido nucleico a temperaturas más altas en relación con la hibridación del cebador.

También se pueden utilizar cebadores y sondas que tienen una estabilidad térmica diferencial en base a su composición de nucleótidos. Por ejemplo, la sonda puede elegirse para tener un mayor contenido G / C y, en consecuencia, una mayor estabilidad térmica que el cebador. Alternativamente o adicionalmente, uno o más bases de DNA modificadas, no estándar o derivadas pueden incorporarse en cebadores o sondas para resultar en mayor o menor estabilidad térmica en comparación con cebadores o sondas que sólo tienen bases de DNA convencionales. Ejemplos de tales bases modificadas, no estándares o derivados pueden encontrarse en las patentes Estadounidenses N° 6.320.005, 6.174.998, 6.001.611 y 5.990.303.

Además, la temperatura de la reacción puede también variar para aprovechar la estabilidad térmica diferencial de la sonda y el cebador. Por ejemplo, tras la desnaturalización a altas temperaturas como se describe anteriormente, la reacción se puede incubar a una temperatura intermedia que permite la unión de la sonda pero no del cebador, seguido por una reducción adicional de temperatura para permitir la hibridación del cebador y la posterior extensión.

Un elevado exceso molar de la sonda respecto a la concentración de cebador también se puede utilizar preferentemente para favorecer la unión de la sonda antes que el cebador. Tales concentraciones de sonda están normalmente en el intervalo de aproximadamente 2 a 20 veces mayor que la correspondiente concentración de cebador, que es generalmente 0,5-5 x 10<sup>-7</sup> M.

La extensión dependiente de molde de los cebadores de oligonucleótido se cataliza por una polimerasa de DNA en presencia de cantidades adecuadas de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) o análogos, por ejemplo, dUTP, como se discute anteriormente, en un medio de reacción que se compone de las sales apropiadas, cationes metálicos, y el sistema de tamponamiento del pH. Los agentes de polimerización adecuados son enzimas que catalizan la síntesis de DNA dependiente del molde y cebador y poseen la actividad nucleasa 5' a 3'. Tales enzimas incluyen, por ejemplo, polimerasa de DNA I de Escherichia coli, polimerasa de DNA de Thermus thermophilus, polimerasa de DNA de Bacillus stearothermophilus, polimerasa de DNA de Thermococcus littoralis, polimerasa de DNA de Thermus aquaticus, y polimerasa de DNA de Z05. Además, las condiciones de reacción para realizar la síntesis de DNA utilizando estas polimerasas de DNA son bien conocidas en la técnica. Para ser útil en los métodos de la presente invención, el agente de polimerización debe poseer actividad nucleasa 5' que puede escindir

eficientemente el oligonucleótido y liberar fragmentos marcados de forma que se genera directa o indirectamente una señal detectable.

5 Los productos de la síntesis son moléculas dúplex que constan de las cadenas de molde y las hebras de extensión del cebador. Los subproductos de esta síntesis son fragmentos de la sonda que pueden consistir en una mezcla de fragmentos de mono-, di- y oligonucleótidos. En realizaciones preferidas, se pueden realizar los ciclos repetidos de desnaturalización, hibridación del cebador y de la sonda, y la extensión del cebador y escisión de la sonda, resultando en la acumulación exponencial de la región amplificada definida por los cebadores y la generación exponencial de fragmentos marcados. Tal ciclo térmico repetido se conoce generalmente en la técnica como la  
10 reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se pueden realizar ciclos suficientes para lograr una cantidad suficiente de fragmentos de la sonda para distinguir las reacciones positivas, es decir, el ácido nucleico a detectar está presente, a partir de reacciones negativas, es decir, el ácido nucleico a detectar no está presente. Generalmente, las reacciones positivas presentarán una señal que es varios órdenes de magnitud mayor que una reacción negativa.

15 En ciertas realizaciones preferidas, la reacción de PCR se lleva a cabo como un proceso automatizado que utiliza una enzima termoestable. En este proceso la mezcla de reacción se cicla a través de un paso de desnaturalización, un paso de hibridación de la sonda y el cebador, y un paso de síntesis, en el que se produce simultáneamente la escisión y el desplazamiento con extensión del molde dependiente de cebador. Se puede utilizar un termociclador, como el ABI 3700 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA), que está diseñado específicamente para su uso con una enzima termoestable. En algunas de tales realizaciones de la invención, los ácidos nucleicos a detectar pueden amplificarse en ausencia de una sonda marcada de forma detectable, seguida de la detección del producto de  
20 amplificación en una reacción separada. Alternativamente, los ácidos nucleicos a detectar pueden amplificarse en presencia de la sonda, lo que permite la amplificación y detección en una sola reacción.

25 Las polimerasas termoestables son las preferidas en este proceso automatizado debido a que la forma preferida de desnaturalización de los productos de extensión de doble cadena es mediante la exposición a una alta temperatura (alrededor de 95 °C) durante el ciclo de PCR. Por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 4.889.818 describe una enzima termoestable representativa aislada de *Thermus aquaticus*. Las polimerasas termoestables adicionales representativas incluyen, por ejemplo, las polimerasas extraídas de las bacterias termoestables *Thermus flavus*,  
30 *Thermus ruber*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus* (que tiene una temperatura óptima algo más baja que los otros enumerados), *Thermus lacteus*, *Thermus rubens*, *Thermotoga marítima*, *Thermococcus littoralis*, *Methanothermus fervidus*, y *Pyrococcus furiosus* (Stratagene, La Jolla, CA). Como se describió anteriormente, algunas de estas polimerasas termoestables pueden sintetizar DNA a partir de un molde de RNA. Cuando una molécula de RNA debe detectado de acuerdo con los métodos de la invención, una polimerasa de DNA que puede sintetizar DNA a partir de una plantilla de RNA, es decir, con la actividad de transcripción inversa, se debe utilizar.  
35

En otros aspectos, los métodos pueden utilizarse también para cuantificar una cantidad de un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa en una muestra. En tales métodos, se lleva a cabo una reacción de nucleasa 5' como se describe anteriormente, y la cantidad de fluorescencia producida se cuantifica. La  
40 cantidad de fluorescencia se puede cuantificar por cualquier método conocido para un experto en la materia sin limitación. En ciertas realizaciones, la cantidad de fluorescencia emitida se puede cuantificar con un fluorómetro. Esta cantidad de fluorescencia puede ser comparada con la cantidad de fluorescencia emitida por una reacción de control. La reacción de control se lleva a cabo preferentemente con los mismos reactivos y, al mismo tiempo que la reacción realizada con la muestra con una cantidad conocida de ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa. Alternativamente, la cantidad de fluorescencia emitida por la porción fluorescente se puede comparar con una curva de fluorescencia de trazado estándar frente a la concentración de ácido nucleico viral. Una curva estándar representativa se presenta en la Figura 6. Una guía adicional en la cuantificación de una cantidad de un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa se puede encontrar en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos N° 2002/0058262 y las patentes europeas N°  
50 1.138.780, 1.138.783 y 1.138.784.

4.2. Otros métodos para detectar un ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa que utilizan uno o más cebadores y una sonda

55 Además de las reacciones nucleasa 5' descritas anteriormente, la descripción proporciona adicionalmente otros métodos que pueden utilizarse para detectar un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa, tal como se describe a continuación.

En ciertas realizaciones, se puede utilizar cualquier método conocido por un experto en la técnica que utiliza dos  
60 cebadores de ácido nucleico y una sonda de ácido nucleico para detectar un ácido nucleico para detectar un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa. Los cebadores y sondas de ácido nucleico descritas en las Secciones 3.1 y 3.2 se pueden utilizar en cualquier método conocido por un experto en la técnica, sin limitación. Los ejemplos de reacciones de amplificación que pueden ser utilizados para detectar los ácidos nucleicos virales incluyen, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y reacción en cadena de la ligasa (LCR) (ver patentes de Estados Unidos 4.683.195 y 4.683.202; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis et al., eds, 1990)), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) (Walker, et al Nucleic Acids  
65

Res 20 (7): 1691-6 (1992); Walker PCR Methods Appl 3(1): 1-6 (1993)), amplificación mediada por transcripción (Phyffer, et al., 1. Clin. Microbiol. 34: 834-841 (1996); Vuorinen, et al. J. Clin. Microbiol. 33:1856-1859 (1995)), amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA) (Compton, Nature 350 (6313): 91-2 (1991), amplificación por círculo rodante (RCA) (Lisby, Mol. Biotechnol. 12 (1): 75-99 (1999)); Hatch et al., Genet. Anal. 15 (2): 35-40 (1999)) amplificación de señal de DNA ramificado (bDNA) (véase, por ejemplo, Iqbal et al., Mol. Cell Probes 13 (4): 315-320 (1999)) y replicasa Q-Beta (Lizardi et al., Bio/Technology 6: 1197 (1988)).

Un ejemplo de tales métodos es amplificar un ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa y detectar la presencia del ácido nucleico con una sonda que es una baliza molecular. Tales sondas contienen una secuencia de reconocimiento de diana que puede hibridarse mediante secuencias complementarias que pueden formar una horquilla. La baliza molecular tiene una porción fluorescente y una porción atenuadora en extremos opuestos de la sonda. La hibridación de la baliza molecular con el ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa separa la porción fluorescente de la porción atenuadora que permite la detección de la porción fluorescente, y revelando de esta manera la presencia del ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa. Cualquier sonda de la invención se puede utilizar en tales métodos con la adición de varios residuos en los extremos 5' y 3' de la sonda que un experto en la técnica reconoce como capaz de formar una estructura de horquilla. Una guía adicional en la selección y uso de balizas moleculares se pueden encontrar en un artículo de Tyagi y Kramer, 1996, Nat. Biotechnol. 14: 303-308.

En otro ejemplo, dos cebadores y una sonda se pueden utilizar para detectar un ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa mediante la amplificación basada en secuencias de ácido nucleico. La amplificación basada en secuencias de ácido nucleico (NASBA) es una tecnología de amplificación robusta que se puede utilizar para detectar un ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa. En los métodos de NASBA, se utilizan tres enzimas, incluyendo la transcriptasa inversa, la polimerasa de RNA T7, y RNasa H. El producto de amplificación final es un RNA monocatenario con una polaridad opuesta a la del ácido nucleico a detectar. El producto de RNA amplificado se puede detectar mediante el uso de una sonda de captura específica de la diana unido a partículas magnéticas junto con una sonda detectora marcada con rutenio y un instrumento (NucliSens Reader; bioMérieux) capaz de medir la electroquimioluminiscencia (ECL). Alternativamente, el RNA amplificado por NASBA específicamente puede ser detectado en tiempo real mediante la inclusión de sondas de baliza molecular en la reacción de amplificación, como se describe anteriormente. Mayor orientación sobre el uso de los cebadores y sondas se puede encontrar en los artículos de Compton, 1991, Nature 350: 91-92 y Kievits et al., 1991, J. Virol. Methods 35: 273-86.

Otros ejemplos de tales métodos incluyen reacciones de nucleasa 5' descritas en detalle anteriormente. Otro ejemplo de tales métodos incluyen la amplificación de un ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa con dos cebadores de la invención, seguido por la detección del ácido nucleico amplificado con una sonda de la invención. Otros ejemplos de tales métodos que pueden utilizarse o adaptarse por un experto en la técnica para detectar un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa se pueden encontrar en las patentes Estadounidenses N° 6.403.339, 6.329.152, 5.952.202, y 5.387.510.

En otras realizaciones, se puede utilizar cualquier método conocido por un experto en la técnica que utiliza un cebador de ácido nucleico y una sonda de ácido nucleico para detectar un ácido nucleico para detectar un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa. Los cebadores y sondas de ácido nucleico descritas en las Secciones 3.1 y 3.2 se pueden utilizar en cualquier método conocido por un experto en la técnica, sin limitación. En algunos de estos métodos, un experto en la técnica reconocerá que un cebador también puede ser utilizado como una sonda, y una sonda utilizada como cebador.

Por ejemplo, un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa se puede hibridar a un cebador que se une a un soporte sólido. Una sonda marcada de forma detectable puede entonces hibridarse con el ácido nucleico a detectar, lo que indica la presencia del ácido nucleico. Alternativamente, la sonda puede estar unida al soporte sólido y se utiliza para capturar el ácido nucleico, y luego el cebador puede ser marcado de manera detectable e hibridarse con el ácido nucleico, lo que indica la presencia del ácido nucleico. Un método que utiliza sondas unidas a una fase sólida se describe en US 5.232.829 y EP 420 260.

Otro ejemplo de los métodos que utilizan un cebador de ácido nucleico y una sonda para detectar un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa implica el uso de nanopartículas. En tales métodos, dos oligonucleótidos, tales como un cebador o sonda de la invención, que pueden hibridarse a las diferentes regiones de un ácido nucleico a detectar están covalentemente unidos a una nanopartícula. Las nanopartículas se ponen en contacto con un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa en condiciones de hibridación. Si el ácido nucleico está presente, el ácido nucleico se une a los oligonucleótidos unidos a las nanopartículas, produciendo un complejo de gran peso molecular que puede ser detectado. El complejo puede ser detectado por cualquier método conocido para un experto en la materia sin limitación. En ciertas realizaciones, el complejo se detecta mediante precipitación del complejo. Se puede encontrar orientación adicional sobre los métodos de uso de nanopartículas en conexión con los cebadores y sondas de la invención en Taton et al., 2000, Science 289 (5485): 1757 a 1760 y las patentes Estadounidenses n° 6.506.564, 6.495.324, 6.417.340, 6.399.303, y 6.361.944.

En otro ejemplo, la amplificación por círculo rodante ("RCA") se puede utilizar como parte de un método para detectar un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa. En ciertas realizaciones de métodos RCA, un círculo de DNA se amplifica por extensión de la polimerasa de un cebador complementario. Cualquiera de los cebadores o sondas de la invención pueden ser utilizados en tales métodos. Los métodos de circularización de DNA son bien conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, ligar los extremos de una molécula de DNA juntos en condiciones que favorecen la ligadura intramolecular. El producto monocatenario concatémico puede entonces detectarse por cualquier método de detección de un ácido nucleico conocido para un experto en la materia sin limitación. Por ejemplo, el producto concatémico puede ser detectado utilizando una sonda marcada de forma detectable de la invención. Otros ejemplos de métodos de detección de un ácido nucleico de secuencia conocida son ampliamente descritos en este documento. En otras formas de realización de RCA, un segundo cebador puede ser utilizado que es complementario al producto concatémico. Este cebador permite la amplificación exponencial de las secuencias presentes en el molde de DNA circular. Los productos de amplificación todavía se pueden encontrar, por ejemplo, mediante el uso de una sonda marcada de forma detectable de la invención. Se puede encontrar orientación adicional sobre el uso de los cebadores y sondas de la invención en métodos RCA para detectar un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa en las patentes Estadounidenses N° 6.344.329, 6.350.580, 6.221.603, 6.210.884, 5.648.245, y 5.714.320 y la publicación de patente internacional N° WO95 / 35390.

Aún otro ejemplo de tales métodos es la reacción de nucleasa 5' independiente de la polimerización descrito anteriormente. Otros ejemplos de métodos de uso de un cebador y una sonda que se puede utilizar o adaptar por un experto en la técnica para detectar un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa se describen en las patentes Estadounidenses N° 6.316.200, 6.268.128, 6.180.338, 5.716.784, y 5.573.906.

En ciertas realizaciones, se puede utilizar cualquier ensayo conocido por un experto en la técnica que utiliza dos cebadores de ácido nucleico que puede amplificar un ácido nucleico para detectar el ácido nucleico para detectar un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa. Los cebadores de ácido nucleico descritos en la Sección 3.1 se pueden utilizar en cualquier método conocido para un experto en la técnica, sin limitación. Además, un experto en la técnica reconocerá que una sonda de la invención también se puede usar como un cebador en algunos de estos métodos.

En un ejemplo de tales métodos, un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa se puede detectar mediante la amplificación del ácido nucleico con al menos un cebador que comprende una estructura de horquilla que contiene una porción fluorescente y una porción atenuadora en el extremo 5' de la molécula. La incorporación del cebador en el producto de amplificación puede entonces separar la porción fluorescente de la porción atenuadora, lo que permite la detección de la porción fluorescente. La detección de la porción fluorescente revela la presencia del ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente el uso de los cebadores o sondas de la invención en tales métodos mediante la incorporación de residuos adicionales en el cebador o sonda para formar la estructura de horquilla necesario. Se puede encontrar orientación adicional en el diseño y selección de tales cebadores y sondas en Nazerenko et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25: 2516-2521 y en Thelwell et al., 2000, *Nucleic Acids Res.* 28: 3752-3761.

En otro ejemplo de tales métodos, un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa se puede detectar usando amplificación por desplazamiento de cadena ("SDA"). En tales métodos, los ácidos nucleicos amplificados del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa se detectan mediante la incorporación de un cebador de cadena sencilla que comprende una porción fluorescente, una porción atenuadora, y un sitio de restricción diseñado para separar las dos porciones. Un experto en la técnica puede reconocer fácilmente cómo modificar cualquiera de los cebadores o sondas de la invención para su uso en SDA.

En una primera reacción de amplificación utilizada en SDA, el cebador se utiliza para amplificar el ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa en presencia de, por ejemplo, tio-dCTP, incorporando así el cebador en el producto de amplificación. Entonces, una endonucleasa de restricción se puede utilizar para romper el sitio de restricción en el cebador. La endonucleasa de restricción no puede cortar ambas hebras del producto de amplificación debido a la incorporación de tio-dCTP en el producto de amplificación. Finalmente, el extremo 3' del cebador creado por el corte puede ser utilizado para cebar una nueva reacción de polimerización, desplazando así la porción de la hebra 3' de la mella de la cadena molde. El desplazamiento de la hebra separa la porción fluorescente de la porción atenuadora, evitando de ese modo la atenuación de la fluorescencia emitida por la porción fluorescente. De este modo puede detectarse el ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa y / o cuantificarse mediante la medición de la presencia y / o cantidad de fluorescencia. Se puede encontrar orientación adicional sobre la selección y modificación de cebadores y sondas para uso en SDA en Little et al., 1999, *Clin. Chem.* 45-777-784 y las patentes de EE.UU. N° 6.528.254 y 6.528.632.

En otro ejemplo, un ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa se puede detectar usando la amplificación mediada por transcripción ("TMA"). TMA es un sistema de amplificación de la transcripción de RNA que utiliza la polimerasa de RNA y la transcriptasa inversa para amplificar los ácidos nucleicos a detectar.



En el método, un cebador de la invención con un promotor para la polimerasa de RNA se utiliza para la transcripción inversa de un cebador de RNA de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa. La actividad de RNasa de la transcriptasa inversa entonces degrada el molde de RNA, liberando la hebra de DNAC. La síntesis de la segunda hebra se ceba con un segundo cebador de la invención y se cataliza por la transcriptasa inversa. La polimerasa de RNA reconoce entonces el promotor sintetizado en la segunda cadena y cataliza múltiples ciclos de transcripción de RNA a partir de la segunda cadena. El producto de RNA puede entonces ser detectado o puede servir como molde para otra ronda de amplificación.

El producto de RNA de TMA se puede detectar mediante cualquier método conocido para un experto en la técnica. En ciertas realizaciones, el producto de RNA puede detectarse con una sonda de la invención. En otras realizaciones, el producto de RNA puede detectarse con una sonda de la invención que se ha marcado con un marcaje de éster de acridina (Gen-Probe, Inc., San Diego, CA). Estos marcajes se pueden eliminar químicamente a partir de la sonda no hibridada mientras que los marcajes de las sondas hibridadas permanecen inalterados. Por lo tanto, en tales realizaciones, la presencia de un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa se puede detectar mediante la detección de la presencia del marcaje de éster de acridina. Se puede encontrar más orientación en el uso de los cebadores y sondas de la invención en métodos basados en la TMA en Arnold et al., 1989, Clin. Chem. 35: 1588-1594, Miller et al., 1994, J. Clin. Microbiol. 32:393-397, y las Patentes de EE.UU. N° 6.335.166 y 6.294.338.

En otro ejemplo, un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa se puede detectar usando PCR de diagnóstico. En tales métodos, la presencia de un ácido nucleico a detectar se indica mediante la amplificación dependiente de molde con éxito de un producto de PCR. Generalmente, la identidad del producto de PCR puede determinarse a partir del tamaño del producto de PCR; el éxito de la amplificación del ácido nucleico a detectar generalmente dará como resultado un producto de PCR de tamaño conocido. Los métodos para determinar el tamaño de un ácido nucleico, tal como un producto de PCR, son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo electroforesis en gel y capilar, entre otros.

Otros métodos de detección de la amplificación exitosa de un producto de PCR revelando así la presencia de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa incluyen el uso de colorantes de unión a DNA no específicos. Por ejemplo, puede incluirse SYBR® green (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) en la reacción de amplificación, lo que permite la detección y cuantificación de cualquier DNA de doble hebra generado durante la PCR. Ejemplos de tales métodos se pueden encontrar en las patentes de Estados Unidos N° 6.323.337 y 5.863.753.

Por último, otros métodos que pueden ser utilizados o adaptados por un experto en la técnica para utilizar los cebadores y sondas de la invención para detectar un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa se describen en las Patentes de EE.UU. N° 6.528.632, 6.475.729, 6.361.944, 6.329.152, 6.270.967, 6.258.546, 6.063.603, 6.057.099, 6.040.166, 5.914.230, 5.843.650, 5.747.255, 5.747.251, 5.731.146, 5.712.386, 5.635.347, 5.554.517, 5.409.818, 5.384.242, 4.965.188, 4.868.104, 4.800.159, y 4.683.195.

En otras realizaciones, cualquier ensayo conocido por un experto en la técnica que utiliza un único cebador de ácido nucleico o sonda que se puede hibridar con un ácido nucleico para detectar el ácido nucleico se puede utilizar para detectar un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa. Los cebadores y sondas de ácido nucleico descritos en las Secciones 3.1 y 3.2 se pueden utilizar en cualquier método conocido para un experto en la técnica, sin limitación. Además, un experto en la técnica reconocerá que un cebador también puede ser utilizado como una sonda, y una sonda utilizada como cebador en algunos de los métodos descritos.

Por ejemplo, un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa se puede detectar usando un cebador para iniciar una reacción de extensión del cebador. El éxito de la extensión del cebador mediante una polimerasa de ácido nucleico indica la presencia del ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa. Un producto de extensión del cebador que indica la presencia de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa se puede detectar por cualquier método conocido por un experto en la técnica. Por ejemplo, la reacción de extensión del cebador puede incorporar nucleótidos marcados con fluorescencia o <sup>32</sup>P. Otros ejemplos de métodos de detección de cebador único o sonda que describen los métodos que se pueden utilizar como se describen o que pueden adaptarse por un experto en la técnica para detectar un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa se pueden encontrar en las patentes Estadounidenses N° 6.440.707, 6.379.888, 6.368.803, 6.365.724, 6.361.944, 6.352.827, 6.326.145, 6.312.906, 6.268.128, 6.261.784, 6.177.249, 6.140.055, 6.130.047, 6.124.090, 6.121.001, 6.110.677, 6.054.279, 6.022.686, 5.981.176, 5.958.700, 5.945.283, 5.935.791, 5.919.630, 5.888.739, 5.888.723, 5.882.867, 5.876.924, 5.866.336, 5.856.092, 5.853.990, 5.846.726, 5.814.447, 5.808.036, 5.800.989, 5.795.718, 5.792.614, 5.710.028, 5.683.875, 5.683.872, 5.679.510, 5.641.633, 5.597.696, 5.595.890, 5.571.673, 5.547.861, 5.525.462, 5.514.546, 5.491.063, 5.437.977, 5.294.534, 5.118.605, 5.102.784, 4.994.373, 4.851.331, 4.767.700, y 4.683.194.

Algunas de las patentes de Estados Unidos referidas anteriormente describen métodos que pueden utilizar uno o dos cebadores, o uno o dos cebadores y una sonda. La descripción anterior no pretende categorizar tales métodos. Los métodos de detección de un ácido nucleico que utiliza, por ejemplo, dos cebadores proporcionados en una

patente de Estados Unidos que proporciona un método para detectar un ácido nucleico usando un único cebador se pueden utilizar con los cebadores, sondas y equipos de la invención.

5 4.3. Métodos para la detección de un ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa y ciertos otros Flavivirus utilizando una sonda

Además de los ensayos para detectar un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa descritos anteriormente, la descripción proporciona además métodos para detectar un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa y ciertos otros flavivirus. Los flavivirus que pueden ser detectados de acuerdo con estos métodos se describen en la sección 3.4, anterior.

10 En ciertas realizaciones, se puede utilizar cualquier método conocido para un experto en la técnica que utiliza una sonda de ácido nucleico para detectar un ácido nucleico para detectar un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa y ciertos otros flavivirus. Las sondas de ácido nucleico que se pueden utilizar para detectar ácidos nucleicos de los miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa y ciertos otros flavivirus se describen en la Sección 3.2, anterior.

15 En ciertas realizaciones, las sondas se pueden usar para determinar si las secuencias víricas de ácidos nucleicos de los miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa y ciertos otros flavivirus están presentes en una muestra mediante la determinación de la unión de las sondas a las secuencias víricas presentes en la muestra. Por ejemplo, la detección puede realizarse utilizando un formato de transferencia dot-blot. En el formato de transferencia dot-blot, la muestra amplificada no marcada se une a un soporte sólido, tal como una membrana, la membrana se incubaba con la sonda marcada bajo condiciones de hibridación adecuadas, la sonda no hibridada se elimina por lavado, y el filtro se analiza para detectar la presencia de sonda unida. Cuando se analizan múltiples muestras con una única sonda, el formato de transferencia dot-blot es bastante útil. Muchas muestras pueden inmovilizarse en posiciones concretas sobre una única membrana e hibridarse simultáneamente sumergiendo la membrana en una solución de sonda.

20 Un método alternativo que es bastante útil cuando un gran número de diferentes sondas van a utilizarse es un formato "inverso" de dot blot, en el que la secuencia amplificada contiene un marcaje, y la sonda se une al soporte sólido. Este formato sería útil si se utilizan los métodos de ensayo de la presente invención como un método entre una batería de métodos para llevar a cabo simultáneamente en una muestra. En este formato, las sondas no marcadas se unen a la membrana y se exponen a la muestra marcada en condiciones de hibridación apropiadamente restrictivas. Las muestras marcadas no hibridadas se eliminan por lavado en condiciones adecuadamente restrictivas, y el filtro se analiza a continuación para la presencia de secuencias unidas.

25 Tanto los ensayos de dot blot directo e inverso se pueden llevar a cabo convenientemente en una placa de microtitulación; véase la solicitud de patente de Estados Unidos Nº 695072, depositada el 3 de mayo de 1991, que es una CIP de la solicitud de patente de Estados Unidos número 414.542, depositada el 29 de septiembre de 1989, patente concedida 5.232.829. Las sondas pueden estar unidas a la albúmina de suero bovino (BSA), por ejemplo, que se adhiere a la placa microtitulada, inmovilizando de ese modo la sonda.

30 Otro ejemplo de un método de utilización de una sonda para detectar un ácido nucleico de los miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa y ciertos otros flavivirus se describe en la patente de Estados Unidos Nº 6.383.756, que proporciona un método para detectar un ácido nucleico unido a una membrana.

35 En otro ejemplo, un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa se puede detectar usando métodos basados en DNA ramificado. En tales métodos, un monómero de dendrímero se construye de dos hebras de DNA que comparten una región de complementariedad de secuencia situado en la porción central de cada hebra. Cuando las dos hebras hibridan para formar el monómero la estructura resultante tiene un centro de doble hebra bordeado por cuatro extremos de una sola hebra. Un dendrímero puede ensamblarse a partir de monómeros mediante la hibridación de los extremos monocatenarios de los monómeros entre sí, mientras que se deja todavía muchos extremos libres de una sola hebra. Estos extremos monocatenarios libres pueden tener las secuencias de cualquiera de los cebadores o sondas de la invención. Un dendrímero puede estar detectablemente marcado con cualquier porción detectable conocida para un experto en la técnica sin limitación, como se ha descrito anteriormente en relación con las sondas de la invención.

40 Los dendrímeros pueden usarse entonces como una sonda, en, por ejemplo, los ensayos de "dot blot" descritos a continuación. Además, un dendrímero puede ser utilizado como una sonda en cualquier método conocido para un experto en la técnica en el que se detecta directamente la sonda. Una sonda se detecta directamente cuando la presencia de la sonda puede determinarse sin ninguna reacción o modificación posterior, tal como una transferencia dot-blot o hibridación de Southern. Se puede encontrar orientación adicional sobre la selección y uso de los dendrímeros como sondas para detectar un ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa u otros flavivirus detectables en la patente de Estados Unidos Nº 6.261.779 y en Nilsen et al., 1997, J. Theoretical Biology 187: 273-284, Capaldi et al., 2000, Nucleic Acids Res., 28 (7): 21e, Wang et al., 1998, J. Am. Chem. Soc. 120: 8281 a 8282, y Wang et al., 1998, Electroanalysis 10 (8): 553-556.

Un experto en la técnica reconocerá que las sondas se pueden utilizar en combinación con cualquier cebador que se hibride selectivamente a un virus que se puede detectar con las sondas de la invención. En consecuencia, se pretende que los métodos de detección de un flavivirus detectable con una sonda en combinación con cualquier cebador que se hibrida selectivamente a un flavivirus detectable está dentro del alcance de la presente descripción.

Cualquier método que utiliza un único cebador o sonda que se puede utilizar para detectar un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa se describe en la Sección 4.2, anterior, se puede utilizar con una sonda de la invención para detectar otros flavivirus descritos en la sección 3.4, más arriba.

## 5. Equipos

En otro aspecto, la presente descripción proporciona equipos que se pueden utilizar para detectar un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa y / o ciertos otros flavivirus. Los miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa que se pueden detectar con los equipos de la invención se describen en la sección 3.3, más arriba, mientras que los ácidos nucleicos de otros flavivirus que se pueden detectar con los equipos de la invención se describen en la sección 3.4, más arriba .

En ciertas realizaciones, el equipo comprende una sonda. En algunas realizaciones, el equipo comprende un cebador. En algunas realizaciones, el equipo comprende una combinación de uno o más de los cebadores y sondas.

Por ejemplo, en una realización, el equipo comprende un primer cebador de ácido nucleico que se hibrida con un ácido nucleico de Id. de Sec. N°: 1 y un segundo cebador de ácido nucleico que se hibrida con un ácido nucleico de Id. de Sec. N°: 9. En otras realizaciones, los equipos comprenden un cebador (por ejemplo, al menos uno corriente arriba y / o un cebador corriente abajo) que comprenden un polinucleótido que se hibrida con Id. de Sec. N°: 29, Id. de Sec. N°: 30, Id. de Sec. N°: 31, Id. de Sec. N° : 32, Id. de Sec. N°: 33, Id. de Sec. N°: 34, Id. de Sec. N°: 35, Id. de Sec. N°: 36, Id. de Sec. N°: 37, Id. de Sec. N°: 38, Id. de Sec. N°: 39, Id. de Sec. N°: 40 o un complementario del mismo. Los ejemplos de cebadores se pueden seleccionar de, por ejemplo, Id. de Sec. N°: 64, Id. de Sec. N°: 65, Id. de Sec. N°: 66, e Id. de Sec. N°: 67.

En algunas realizaciones, los equipos comprenden al menos un cebador corriente arriba y / o un cebador corriente abajo seleccionado del Id. de Sec. N°: 41, Id. de Sec. N°: 42, Id. de Sec. N°: 43, Id. de Sec. N°: 44, Id. de Sec. N°: 45, Id. de Sec. N°: 46, Id. de Sec. N°: 47, Id. de Sec. N°: 48, Id. de Sec. N°: 49, Id. de Sec. N°: 50, Id. de Sec. N°: 51, Id. de Sec. N°: 52, Id. de Sec. N°: 53, Id. de Sec. N°: 54, o Id. de Sec. N°: 55.

En otras realizaciones, los equipos comprenden al menos un cebador corriente arriba y / o un cebador corriente abajo seleccionado del Id. de Sec. N°: 56, Id. de Sec. N°: 57, Id. de Sec. N°: 58, Id. de Sec. N°: 59, Id. de Sec. N°: 60, Id. de Sec. N°: 61, Id. de Sec. N°: 62, o Id. de Sec. N°: 63.

En algunas de las realizaciones descritas anteriormente, los equipos también comprenden una sonda de ácido nucleico que se hibrida con un ácido nucleico de Id. de Sec. N°: 16, o el complementario del mismo, como se describe aquí.

En ciertas realizaciones, los equipos comprenden dos cebadores de ácido nucleico y una sonda de ácido nucleico para la detección de un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa. Los cebadores de ácido nucleico que pueden ser un componente de los equipos de la invención se describen extensamente en la Sección 3.1, anteriormente, mientras que las sondas de ácido nucleico que pueden ser un componente de los equipos de la descripción se describen en la Sección 3.2, anteriormente. Las sondas pueden marcarse opcionalmente como se describió anteriormente. En ciertas realizaciones, los equipos comprenden una polimerasa de DNA termoestable. En ciertas realizaciones, la polimerasa de DNA termoestable tiene actividad de transcripción inversa. En ciertas realizaciones, los equipos comprenden instrucciones para la detección de un ácido nucleico de un flavivirus detectable de acuerdo con los métodos de la invención. En otras realizaciones, los equipos comprenden instrucciones para la detección de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa. En otras realizaciones, los equipos comprenden uno o más recipientes para mantener los componentes del equipo.

En ciertas realizaciones, los equipos pueden contener una composición que comprende un cebador de la invención. Los equipos pueden contener también una composición que comprende una sonda. Los equipos pueden contener además una composición que comprende una polimerasa de DNA termoestable. Las composiciones que comprenden un cebador o sonda o una polimerasa de DNA termoestable pueden comprender adicionalmente reactivos adicionales. Por ejemplo, las composiciones pueden comprender conservantes adecuados para prevenir la degradación de la composición, tampones adecuados para modular el pH de la composición, diluyentes adecuados para modificar la viscosidad de las composiciones, y similares.

Los equipos pueden comprender adicionalmente otros reactivos para llevar a cabo una reacciones nucleasa 5', como se ha descrito anteriormente. Además, los equipos pueden comprender reactivos para facilitar la detección de una sonda fragmentada que indica la presencia de un ácido nucleico de un miembro de serogrupo del virus de la

encefalitis japonesa. Los equipos que se pueden utilizar para detectar un ácido nucleico de secuencia definida se describen en las patentes de EE.UU. nº 6.514.736, 6.197.563, 6,040166, y 5.641.864. Un experto en la técnica puede utilizar fácilmente los cebadores y sondas para modificar las descripciones de estas patentes de Estados Unidos para diseñar equipos adicionales que están también dentro del alcance de la presente descripción.

5 En resumen, la descripción se refiere a un método para detectar un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa, que comprende:

10 a) poner en contacto una muestra con una sonda de ácido nucleico marcado de forma detectable que hibrida con un ácido nucleico de Id. de Sec. Nº: 16, o el complementario del mismo, un cebador que se hibrida con un ácido nucleico de Id. de Sec. Nº: 1, o el complementario del mismo, y una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde con actividad exonucleasa 5'-3', bajo condiciones que permiten que la polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde fragmente la sonda de ácido nucleico marcada de forma detectable; y

15 b) detectar la fragmentación de la sonda de ácido nucleico marcada de forma detectable, en el que la fragmentación de la sonda marcada de forma detectable indica la presencia del ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa.

20 En realizaciones preferidas, la sonda marcada de forma detectable comprende al menos 20 nucleótidos consecutivos de cualquiera de las Id. de Sec. Nº: 17, Id. de Sec. Nº: 18, Id. de Sec. Nº: 28, o el complementario de las mismas. Preferiblemente, la sonda marcada de forma detectable comprende una porción fluorescente. La porción fluorescente se selecciona preferentemente del grupo que consiste de colorantes de la familia de la fluoresceína, colorantes de la familia de la polihalofluoresceína, colorantes de la familia de la hexaclorofluoresceína, colorantes de la familia de la cumarina, colorantes de la familia de la rodamina, colorantes de la familia de la cianina, colorantes de la familia de la oxazina, colorantes de la familia de la tiazina, colorantes de la familia de la escuarina, colorantes de la familia de los lantánidos quelados y colorantes de la familia de BODIPY®. Una porción fluorescente muy preferida es 6-carboxifluoresceína.

30 Para la realización preferida de un ensayo TaqMan®, la sonda marcada de forma detectable comprende además una porción atenuadora. La porción atenuadora se selecciona preferiblemente del grupo que consiste de colorantes de la familia de la fluoresceína, colorantes de la familia de la polihalofluoresceína, colorantes de la familia de la hexaclorofluoresceína, colorantes de la familia de la cumarina, colorantes de la familia de la rodamina, colorantes de la familia de la cianina, colorantes de la familia de la oxazina, colorantes de la familia de la tiazina, colorantes de la familia de la escuarina, colorantes de la familia de los lantánidos quelados y colorantes de la familia de BODIPY®, y porciones atenuadoras no fluorescentes. Las porciones atenuadoras no fluorescentes más preferidas es Cy5™. Las porciones atenuadoras no fluorescentes se seleccionan del grupo de colorantes de la familia de BHQ™, Iowa Black, o Dabcyl. Las porciones atenuadoras no fluorescentes preferidas se seleccionan del grupo de BHQ™-1, BHQ™-2, y BHQ™-3. En los ensayos TaqMan®, la fragmentación de la sonda marcada de forma detectable por una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde con actividad nucleasa 5'-3' separa la porción fluorescente de la porción atenuadora. Preferiblemente, la fragmentación de la sonda se detecta mediante fluorescencia inducida por láser. Más preferiblemente, la porción fluorescente se posiciona en relación con la porción atenuadora de manera que un fotón emitido por la porción fluorescente es absorbido por la porción atenuadora cuando la sonda está intacta, pero la fragmentación de la sonda por una enzima con actividad nucleasa 5'-3' separa la porción fluorescente de la porción atenuadora de manera que un fotón emitido por la porción fluorescente se puede detectar.

45 En un método, el ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa se amplifica con un primer cebador que comprende un ácido nucleico que se hibrida con un ácido nucleico de Id. de Sec. Nº: 1. Más preferible, el ácido nucleico se amplifica con un primer cebador que comprende al menos 16 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. Nº: 2. Más preferible, el primer cebador comprende el Id. de Sec. Nº: 3 o Id. de Sec. Nº: 8.

50 Cuando se utilizan residuos modificados, preferiblemente el residuo en la posición 23 del Id. de Sec. Nº: 8 es N<sup>6</sup>-alquil-desoxiadenosina o el residuo en la posición 23 del Id. de Sec. Nº: 8 es N<sup>6</sup>-metil-desoxiadenosina o el residuo en la posición 24 del Id. de Sec. Nº: 8 es N<sup>6</sup>-alquil-desoxiadenosina, más preferiblemente es N<sup>6</sup>-terc-butil-bencil-desoxiadenosina. Es más preferible que el residuo en la posición 23 de Id. de Sec. Nº: 8 sea N<sup>6</sup>-metil-desoxiadenosina y el residuo en la posición 24 de Id. de Sec. Nº: 8 sea N<sup>6</sup>-bencil-terc-butil-desoxiadenosina.

60 Preferiblemente, el segundo cebador comprende un ácido nucleico que se hibrida con un ácido nucleico de Id. de Sec. Nº: 9, más preferiblemente al menos 16 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. Nº: 10, más preferiblemente comprende el Id. de Sec. Nº: 11 o 15. Cuando se utilizan residuos modificados, preferiblemente el segundo cebador comprende N<sup>6</sup>-alquil-desoxiadenosina en la posición 24 del Id. de Sec. Nº: 15, es más preferido N<sup>6</sup>-terc-butilbencil-desoxiadenosina.

65 Los oligonucleótidos de acuerdo con la descripción son cebadores y sondas tal como se utiliza en el método descrito anteriormente. Dependiendo de su posición y secuencia, los cebadores se pueden usar como sondas o viceversa. Los oligonucleótidos preferidos contienen al menos 16 nucleótidos consecutivos contenidos en cualquiera de las Id.

de Sec. Nº 2, 9, y 17, o los complementos de los mismos. Otros oligonucleótidos preferidos contienen al menos 16 nucleótidos consecutivos contenidos en cualquiera de las Id. de Sec. Nº 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, y 28, o los complementarios de los mismos.

5 Equipos preferidos comprenden los oligonucleótidos preferidos como se ha mencionado anteriormente. Más preferido, el equipo comprende

a) un primer cebador de ácido nucleico que hibrida con un ácido nucleico de Id. de Sec. Nº: 1 o un complementario del mismo

10 b) un segundo cebador de ácido nucleico que hibrida con un ácido nucleico de Id. de Sec. Nº: 9 o un complementario del mismo; y

15 c) una sonda de ácido nucleico que hibrida con un ácido nucleico de Id. de Sec. Nº: 16, o el complementario del mismo. Equipos más preferidos comprenden los cebadores y sondas preferidas, opcionalmente o preferiblemente marcadas y modificadas como se ha descrito anteriormente. Además, el equipo comprende adicionalmente una polimerasa de DNA termoestable. Dicha polimerasa de DNA termoestable puede tener actividad de transcripción inversa. Esta polimerasa de DNA termoestable con actividad de transcripción inversa se selecciona preferentemente entre el grupo de polimerasa de DNA de Carboxydotherrnus hydrogenformans, polimerasa de DNA de Thermosiphon africanus, polimerasa de DNA de Bacillus pallidus, polimerasa de DNA de Thermus especies Z05, polimerasa de DNA de Thermus aquaticus, polimerasa de DNA de Thermus thermophilus, y polimerasa de DNA de Thermus sp.17.

20 El equipo puede comprender adicionalmente instrucciones para detectar un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa.

25 También se describe una composición para la detección de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa que comprende un cebador de ácido nucleico que se hibrida con un ácido nucleico de Id. de Sec. Nº: 1 o un complementario del mismo y un tampón. Los cebadores y sondas preferidas son como se ha descrito anteriormente.

30 También se describe un método para detectar un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa o del virus del Dengue, un virus de la fiebre amarilla, un virus Modoc, o un virus de la leucoencefalitis del Myotis de Montana en una muestra, que comprende:

35 a) poner en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico que se hibrida con Id. de Sec. Nº: 16; y  
b) detectar la hibridación de la sonda de ácido nucleico con el ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa o de un virus del Dengue, un virus de la fiebre amarilla, un virus Modoc, o un virus de la leucoencefalitis del Myotis de Montana, detectando así la presencia del ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa o de un virus del Dengue, un virus de la fiebre amarilla, un virus Modoc, o un virus de la leucoencefalitis del Myotis de Montana.

También se describe un método para detectar un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa en una muestra, que comprende:

45 a) amplificar el ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa en presencia de una sonda de ácido nucleico que hibrida con el Id. de Sec. Nº: 16 y una polimerasa de DNA dependiente de molde que tiene actividad exonucleasa 5'-3'; y  
b) detectar la fragmentación de la sonda, detectando así la presencia de ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa.

50 También se describe un método para detectar un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa, que comprende:

55 a) poner en contacto la muestra con un cebador de ácido nucleico o sonda que se hibrida a cualquiera de Id. de Sec. Nº. 1, 9, 16 o 29, en el que el cebador del ácido nucleico o sonda se une covalentemente a un soporte sólido bajo condiciones que permiten a un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa hibridar con el cebador de ácido nucleico o sonda;

60 b) poner en contacto un cebador marcado de forma detectable o sonda que se hibrida a cualquiera de Id. de Sec. Nº: 1, 9, 16 o 29, pero no es el mismo cebador o sonda que está unido covalentemente al soporte sólido; y

c) detectar el ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa mediante la detección de la hibridación del cebador o sonda marcado de forma detectable con el ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa.

65

También se describe un método para cuantificar una cantidad de un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa en una muestra, que comprende:

- 5 a) poner en contacto una muestra para detectar un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa con una sonda de ácido nucleico marcada fluorescentemente que se hibrida con un ácido nucleico de Id. de Sec. N°: 16, o el complementario del mismo, y una polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde con actividad exonucleasa 5'-3';
- 10 b) detectar una cantidad de fragmentación de la sonda de ácido nucleico marcada con fluorescencia mediante la polimerasa de ácido nucleico dependiente de molde con actividad exonucleasa 5'-3', en el que la cantidad de fragmentación de la sonda marcada con fluorescencia es proporcional a la cantidad del ácido nucleico de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa presente en la muestra; y
- 15 c) determinar la cantidad de fragmentación de la sonda marcada con fluorescencia mediante la comparación de una cantidad de fluorescencia emitida por la sonda marcada fluorescentemente con una cantidad de fluorescencia emitida por la sonda marcada con fluorescencia en una reacción de control.

También se describe un método para detectar un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa, que comprende:

- 20 a) amplificar el ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa;
- b) hibridar una sonda marcada de forma detectable, que se hibrida con Id. de Sec. N°: 16 para el ácido nucleico amplificado de un miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa; y
- 25 c) detectar la sonda marcada de forma detectable, detectando de este modo el ácido nucleico del miembro del serogrupo de la encefalitis japonesa.

30 También se describe un polinucleótido aislado que comprende el Id. de Sec. N°: 29, Id. de Sec. N°: 30, Id. de Sec. N°: 31, Id. de Sec. N°: 32, Id. de Sec. N°: 33, Id. de Sec. N°: 34, Id. de Sec. N°: 35, Id. de Sec. N°: 36, Id. de Sec. N°: 37, Id. de Sec. N°: 38, Id. de Sec. N°: 39, o Id. de Sec. N°: 40.

35 También se describe un vector que comprende un polinucleótido que comprende Id. de Sec. N°: 29, Id. de Sec. N°: 30, Id. de Sec. N°: 31, Id. de Sec. N°: 32, Id. de Sec. N°: 33, Id. de Sec. N°: 34, Id. de Sec. N°: 35, Id. de Sec. N°: 36, Id. de Sec. N°: 37, Id. de Sec. N°: 38, Id. de Sec. N°: 39, o Id. de Sec. N°: 40.

40 También se describe un oligonucleótido que comprende una secuencia de al menos 10 nucleótidos contiguos que se hibrida con Id. de Sec. N°: 29 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 30 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 31 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 32 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 33 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 34 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 35 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 36 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 37 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 38 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 39 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 40 o un complementario del mismo. El oligonucleótido tiene preferiblemente menos de 100 nucleótidos. Más preferiblemente, el oligonucleótido se hibrida al Id. de Sec. N°: 68 o un complemento del Id. de Sec. N°: 69 y / o comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 64, Id. de Sec. N°: 65, Id. de Sec. N°: 66 e Id. de Sec. N°: 67. Aún más preferido el oligonucleótido se selecciona del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 64, Id. de Sec. N°: 65, Id. de Sec. N°: 66, e Id. de Sec. N°: 67. Los oligonucleótidos más preferidos son los oligonucleótidos seleccionados del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 64 e Id. de Sec. N°: 65 o de Id. de Sec. N°: 66 e Id. de Sec. N°: 67.

50 También se describe una mezcla de reacción que comprende cualquiera de los oligonucleótidos anteriores. La mezcla de reacción comprende además preferiblemente un oligonucleótido marcado de forma detectable que hibrida con Id. de Sec. N°: 16 o un complementario de los mismos, más preferiblemente cualquiera de las sondas marcadas como se describió anteriormente, preferiblemente para el uso del ensayo TaqMan®. Más preferible, la mezcla de reacción comprende una polimerasa de DNA.

60 También se describe un método de detección de un virus de la encefalitis de St. Louis, que comprende la amplificación de un ácido nucleico del virus de la encefalitis de St. Louis con al menos un oligonucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que se hibrida con Id. de Sec. N°: 29 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 30 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 31 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 32 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 33 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 34 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 35 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 36 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 37 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 38 o un complementario del mismo, Id. de Sec. N°: 39 o un complementario del mismo, o Id. de Sec. N°: 40, o un complementario del mismo, bajo condiciones que permiten la iniciación de la amplificación de al menos parte de la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido; y detectar el ácido nucleico amplificado, detectando de ese modo un

5 virus de la encefalitis de St. Louis. Preferiblemente, el oligonucleótido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 64, Id. de Sec. N°: 65, Id. de Sec. N°: 66, e Id. de Sec. N°: 67 y más preferiblemente se selecciona entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N° : 64, Id. de Sec. N°: 65, Id. de Sec. N°: 66, e Id. de Sec. N°: 67. La mayoría de los oligonucleótidos preferibles hibridan con Id. de Sec. N°: 68 o un complementario de Id. de Sec. N°: 69. El oligonucleótido tiene preferiblemente menos de 100 nucleótidos. Se prefiere un método que utiliza un cebador seleccionado del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 64 e Id. de Sec. N°: 65; y un cebador seleccionado del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 66 e Id. de Sec. N°: 67.

10 El método comprende preferiblemente un paso de detección que comprende hibridar un oligonucleótido marcado de forma detectable que hibrida con Id. de Sec. N°: 16 con el ácido nucleico amplificado del ácido nucleico del virus de la encefalitis de St. Louis; y detectar la hibridación de la sonda con el ácido nucleico amplificado. Las sondas preferidas se han descrito anteriormente. Preferiblemente, la cantidad de ácido nucleico amplificado se determina durante el paso de amplificación. El más preferido es el método TaqMan®.

15 También se describe un equipo que comprende los oligonucleótidos mencionados anteriormente en relación con el método.

20 También se describe un oligonucleótido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 56, Id. de Sec. N°: 57, Id. de Sec. N°: 58, Id. de Sec. N°: 59, Id. de Sec. N°: 60, Id. de Sec. N° : 61, Id. de Sec. N°: 62, e Id. de Sec. N°: 63. Un oligonucleótido preferido se selecciona del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 56, Id. de Sec. N°: 57, Id. de Sec. N°: 58, Id. de Sec. N°: 59, Id. de Sec. N°: 60, Id. de Sec. N°: 61, Id. de Sec. N°: 62, e Id. de Sec. N°: 63.

25 También se describe una mezcla de reacción que comprende aquellos oligonucleótidos, que comprende preferentemente además un oligonucleótido marcado de forma detectable que se hibrida con Id. de Sec. N°: 25 o un complementario del mismo. Más preferiblemente, el oligonucleótido marcado de forma detectable se hibrida con Id. de Sec. N°: 16 o un complementario del mismo. Lo más preferible, el oligonucleótido comprende la secuencia marcada de forma detectable FGGTCTAGAI GGTTAGAGGAGACCCTCCAG, en el que F es CY5; I es FAM; P es PO4; U es propinil dU; y E es 5-metil-dC. Preferiblemente, la mezcla de reacción comprende al menos un cebador corriente arriba y al menos un cebador corriente abajo.

35 También se describe un método de detección de un virus de la fiebre amarilla, que comprende la amplificación de un ácido nucleico del virus de la fiebre amarilla con al menos un oligonucleótido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 56, Id. de Sec. N°: 57, Id. de Sec. N°: 58, Id. de Sec. N°: 59, Id. de Sec. N°: 60, Id. de Sec. N°: 61, Id. de Sec. N°: 62, e Id. de Sec. N°: 63 en condiciones que permiten la iniciación de la amplificación de al menos parte de la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido; y detectar el ácido nucleico amplificado, detectando de ese modo un virus de la fiebre amarilla. Más preferible, el oligonucleótido se selecciona del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 56, Id. de Sec. N°: 57, Id. de Sec. N°: 58, Id. de Sec. N°: 59, Id. de Sec. N°: 60, Id. de Sec. N°: 61, Id. de Sec. N°: 62, e Id. de Sec. N°: 63. Preferiblemente, el paso de detección comprende hibridar un oligonucleótido marcado de forma detectable que se hibrida con Id. de Sec. N°: 25, o un complementario del mismo, con el ácido nucleico amplificado del ácido nucleico del virus de la fiebre amarilla; y detectar la hibridación del oligonucleótido marcado de forma detectable con el ácido nucleico amplificado. El oligonucleótido marcado de forma detectable comprende preferiblemente F-5'-GGTCTAGAI GGTTAGAGGAGACCCTCCAG- 3'-P, en el que F es CY5; I es FAM y P es PO4; o se hibrida a Id. de Sec. N°: 16, o un complementario del mismo. Preferiblemente, el oligonucleótido marcado de forma detectable comprende al menos 20 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 17, o el complementario del mismo, comprende Id. de Sec. N°: 18, o el complementario del mismo, comprende el Id. de Sec. N°: 28, o el complementario del mismo. Para los ensayos TaqMan® preferidos, el oligonucleótido marcado de forma detectable comprende preferiblemente una porción fluorescente y una porción atenuadora. Preferiblemente, la cantidad de ácido nucleico amplificado se determina durante el paso de amplificación, cuantificando de ese modo el virus en la muestra.

50 El equipo para la detección de virus de la fiebre amarilla comprende los oligonucleótidos mencionados anteriormente para el método.

55 También se describe un oligonucleótido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 41, Id. de Sec. N°: 42, Id. de Sec. N°: 43, Id. de Sec. N°: 44, Id. de Sec. N°: 45, Id. de Sec. N° : 46, Id. de Sec. N°: 47, Id. de Sec. N°: 48, Id. de Sec. N°: 49, Id. de Sec. N°: 50, Id. de Sec. N°: 51, Id. de Sec. N°: 52, Id. de Sec. N°: 53, Id. de Sec. N°: 54 e Id. de Sec. N°: 55. Preferiblemente, el oligonucleótido se selecciona del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 41, Id. de Sec. N°: 42, Id. de Sec. N°: 43, Id. de Sec. N°: 44, Id. de Sec. N°: 45, Id. de Sec. N°: 46, Id. de Sec. N° : 47, Id. de Sec. N°: 48, Id. de Sec. N°: 49, Id. de Sec. N°: 50, Id. de Sec. N°: 51, Id. de Sec. N°: 52, Id. de Sec. N°: 53, Id. de Sec. N°: 54, e Id. de Sec. N°: 55.

60 También se describe una mezcla de reacción que comprende dicho oligonucleótido. Preferiblemente, el oligonucleótido comprende un marcador detectable.

65

También se describe un método de detección de un virus de la fiebre del Dengue, que comprende la amplificación de un ácido nucleico del virus de la fiebre del Dengue con al menos un oligonucleótido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 41, Id. de Sec. N°: 42, Id. de Sec. N°: 43, Id. de Sec. N°: 44, Id. de Sec. N°: 45, Id. de Sec. N°: 46, Id. de Sec. N°: 47, Id. de Sec. N°: 48, Id. de Sec. N°: 49, Id. de Sec. N°: 50, Id. de Sec. N°: 51, Id. de Sec. N°: 52, Id. de Sec. N°: 53, Id. de Sec. N°: 54, e Id. de Sec. N°: 55 en condiciones que permiten la iniciación de la amplificación de al menos parte de la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido; y detectar el ácido nucleico amplificado, detectando de ese modo un virus de la fiebre del Dengue. Preferiblemente, el método comprende además la hibridación de un oligonucleótido marcado de forma detectable que hibrida con Id. de Sec. N°: 16 con el ácido nucleico del virus de la fiebre del Dengue amplificado; y detectar la hibridación del oligonucleótido con el ácido nucleico amplificado. El oligonucleótido marcado de forma detectable comprende preferiblemente Id. de Sec. N°: 24 o un complementario del mismo. Más preferible, el oligonucleótido se selecciona del grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 41, Id. de Sec. N°: 42, Id. de Sec. N°: 43, Id. de Sec. N°: 44, Id. de Sec. N°: 45, Id. de Sec. N°: 46, Id. de Sec. N°: 47, Id. de Sec. N°: 48, Id. de Sec. N°: 49, Id. de Sec. N°: 50, Id. de Sec. N°: 51, Id. de Sec. N°: 52, Id. de Sec. N°: 53, Id. de Sec. N°: 54, e Id. de Sec. N°: 55. El ácido nucleico se amplifica con al menos un cebador corriente arriba y al menos un cebador corriente abajo. Preferiblemente, el oligonucleótido marcado de forma detectable comprende al menos 20 nucleótidos consecutivos de Id. de Sec. N°: 17, o el complementario del mismo, comprende Id. de Sec. N°: 18, o el complementario del mismo, o comprende Id. de Sec. N°: 28, o el complementario del mismo. Para los ensayos TaqMan® y de cuantificación, se aplican las características anteriormente mencionadas.

También se describe un equipo para detectar el virus del Dengue, el equipo comprende un oligonucleótido como el que se ha mencionado anteriormente para el método.

#### Ejemplos

Ejemplo 1: Amplificación y detección del RNA del virus del Nilo occidental.

Se recibió un lisado de un sobrenadante de un cultivo celular infectado con virus del Dr. R. Lanciotti del Centro para el Control y Prevención de enfermedades. Los ácidos nucleicos se purificaron a partir del lisado utilizando reactivos del QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizaron diluciones seriadas de 10 veces ( $10^{-2}$  -  $10^{-7}$ ) de los ácidos nucleicos purificados. Cincuenta microlitros de cada dilución se amplificaron en ensayos de reacción de nucleasa 5' utilizando reactivos TaqMan® y los métodos mediante RT-PCR en reacciones de 100 µl que contiene cebadores 1 µM (cada uno de Id. de Sec. N°: 8 e Id. de Sec. N°: 15), tricina 55 mM (pH 7,7, Sigma, cat. T-5816), dNTP 450 µM (cada uno de dATP, dCTP, dGTP, and dUTP, Pharmacia), manganeso 2,7 mM (Fluka, cat. 63537), acetato de potasio 135 µM (Fluka, cat. 60035), 7% (v/v) DMSO (Sigma, cat. D8418), 6% (V/V) glicerol (USB, cat. 16347), 5 unidades de uracil-N-glicosilasa (Roche Diagnostics), 40 unidades de polimerasa de DNA ZO5 (Roche Diagnostics), y sonda 0,15 µM (Id. de Sec. N°: 28, marcado con FAM y CY5). La transcripción reversa /PCR se realizó en un Instrumento COBAS TaqMan™ (Roche Diagnostics, Pleasanton, CA) utilizando los siguientes parámetros de termociclado: 4 minutos a 50°C → 30 minutos a 59°C → 2 ciclos de 15 segundos a 95°C, 50 segundos a 58°C → 60 ciclos de 15 segundos a 91°C, 50 segundos a 58°C → 2 minutos a 40°C. Un ejemplo de los resultados de la amplificación se muestra en la Figura 6.

#### Listado de secuencias

<110> Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG  
 <120> Composiciones y métodos para detectar ciertos Flavivirus, incluyendo miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa  
 <130> 21640-WO  
 <150> US 60/459,491  
 <151> 2003-03-31  
 <150> US 60/sin asignar  
 <151> 2004-03-12  
 <150> US 60/ sin asignar  
 <151> 2004-03-22  
 <160> 74  
 <170> Patent In versión 3.2  
 <210> 1  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Región de secuencia conservada en 3' región sin traducir de los genomas de flavivirus  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (8)..(8)  
 <220>



<221> característica\_misclánea  
 <222> (8)..(8)  
 <223> n es a, c, g, o t  
 <400> 1  
 5 gtaagccnct cagaaccgtc tcggaaggag gaccc 35  
 <210> 2  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> Complementario a Id. de Sec. Nº1, primer cebador  
 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (28)..(28)  
 15 <223> n = g, a, c o t  
 <400> 2  
 gggctcctct tccgagacgg ttctgagngg cttac 35  
 <210> 3  
 <211> 26  
 20 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador 1 del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa  
 <220>  
 25 <221> característica\_misclánea  
 <222> (8)..(8)  
 <223> n = t o ausente  
 <400> 3  
 gwaasccnsy crramcysyy tcggrw 26  
 30 <210> 4  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 35 <223> Cebador 1 del virus del Nilo occidental  
 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (8)..(8)  
 <223> n = t o ausente  
 40 <400> 4  
 gtaagccncy cagaaccggy tcggaa 26  
 <210> 5  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 45 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador 1 del virus de la encefalitis japonesa  
 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 50 <222> (8)..(8)  
 <223> n = ausente  
 <400> 5  
 gaaasccnct crraacygty tcggaa 26  
 <210> 6  
 55 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador 1 Del virus de la encefalitis del valle de Murray  
 60 <400> 6  
 gaaagcctcc cagamccgty tcggaa 26  
 <210> 7  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 65 <213> Artificial  
 <220>

<223> Cebador 1 del virus Koutango  
 <400> 7  
 gtaagccctc agaaccgtct cggaa 25  
 <210> 8  
 5 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Ejemplo de cebador 1  
 10 <400> 8  
 gtaagccctc agaaccgtct cggaa 25  
 <210> 9  
 <211> 52  
 <212> DNA  
 15 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Región de secuencia conservada en 3' región sin traducir de los genomas de flavivirus  
 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 20 <222> (29)..(29)  
 <223> n = g, a, c o t  
 <400> 9  
 caacaaaaca gcatattgac acctgggant agactaggag atcttctgct ct 52  
 <210> 10  
 25 <211> 52  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Complementario a Id. de Sec. Nº9, segundo cebador  
 30 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (24)..(24)  
 <223> n = g, a, c o t  
 <400> 10  
 35 agagcagaag atctcctagt ctantccag gtgtcaatat gctgtttgt tg 52  
 <210> 11  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 40 <220>  
 <223> Cebador 2 del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa  
 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (11)..(11)  
 45 <223> n = t o ausente  
 <400> 11  
 yccyastmtw nyccaggtr tcaa 24  
 <210> 12  
 <211> 23  
 50 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador 2 del virus del Nilo occidental  
 <400> 12  
 55 ycctagtcta tcccaggtrt caa 23  
 <210> 13  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 60 <220>  
 <223> Cebador 2 del virus de la encefalitis japonesa  
 <400> 13  
 cccyastmta tyccagggtg tcaa 24  
 <210> 14  
 65 <211> 24  
 <212> DNA

<213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador 2 del virus de la encefalitis del valle de Murray  
 <400> 14  
 5 tcctagtctt ttcccaggtg tcaa 24  
 <210> 15  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> Ejemplo de cebador 2  
 <400> 15  
 tcctagtcta tcccaggtgt caa 23  
 <210> 16  
 15 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Región de secuencia conservada en 3' región sin traducir de los genomas de flavivirus  
 20 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1)..(37)  
 <223> n = g, a, c o t  
 <400> 16  
 25 ggcganaagg actagaggtt agaggagacc nccgcgg 37  
 <210> 17  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> Complementario de Id. de Sec. Nº16, sonda de ácido nucleico  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (1)..(37)  
 35 <223> n = g, a, c o t  
 <400> 17  
 ccgcgnggt ctctctaac ctctagtct tntgcc 37  
 <210> 18  
 <211> 28  
 40 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda para detectar flavivirus  
 <220>  
 45 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (25)..(25)  
 <223> n = g, c, t, a o ausente  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 50 <222> (26)..(26)  
 <223> n = c, t, g o ausente  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (27)..(28)  
 55 <223> n is a, c, g, t o ausente  
 <400> 18  
 ggwctagwgg ttagaggaga cccynnnn 28  
 <210> 19  
 <211> 28  
 60 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda para detectar miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa  
 <400> 19  
 65 ggactagwgg ttagaggaga ccccrykk 28  
 <210> 20

<211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 5 <223> Sonda para detectar virus del Nilo occidental  
 <400> 20  
 ggactagwgg ttagaggaga cccrcgk 28  
 <210> 21  
 <211> 28  
 10 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda para detectar virus de la encefalitis japonesa  
 <400> 21  
 15 ggactagagg ttagaggaga ccccgagg 28  
 <210> 22  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> Sonda para detectar virus de la encefalitis del valle de Murray  
 <400> 22  
 ggactagagg ttagaggaga cccactc 28  
 <210> 23  
 25 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda para detectar virus Kunjin  
 30 <400> 23  
 aataytgga ttacatgast tcaytgaag 29  
 <210> 24  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 35 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda para detectar virus del Dengue  
 <400> 24  
 ggactagagg ttagaggaga ccccyssv 28  
 40 <210> 25  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 45 <223> Sonda para detectar virus de la fiebre amarilla  
 <400> 25  
 ggtctagagg ttagaggaga cctccag 28  
 <210> 26  
 <211> 28  
 50 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda para detectar el virus de la leucoencefalitis del Myotis de Montana  
 <400> 26  
 55 ggactagagg ttagaggaga cccctcc 28  
 <210> 27  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 60 <220>  
 <223> Sonda para detectar el virus Modoc  
 <400> 27  
 ggactagagg ttagaggaga ccccggc 28  
 <210> 28  
 65 <211> 28  
 <212> DNA

ES 2 524 048 T3

<213> Artificial  
 <220>  
 <223> Ejemplo de sonda 1  
 <400> 28  
 5 ggactagagg ttagaggaga ccccgagg 28  
 <210> 29  
 <211> 418  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> región no traducida 3' del genoma del virus de la encefalitis de St. Louis (VESL) aislado BFS1750  
 <400> 29  
 ttgccaccgg atgtcaggta aacgggtgctg tctgtaacct ggccccaggt gactgggtta 60  
 tcaaagccaa tctggccgag tgcaaagccc ctcatccga ctctgggaggg tccttagcac 120  
 gtaggctgga gaggacgcaa aagtcagacc agaaatgcca cctgaaagca tgctaaaggt 180  
 gctgtctgta catgccccag gaggactggg ttaacaaagc ttaacagccc cagcggccca 240  
 aaccatggag tgcgtgacca tggcgtaagg actagaggtt agaggagacc cgcgtgcaac 300  
 ttggcaaggc ccaaaccgc tcgaagctgt agagacgggg gaaggactag aggttagagg 360  
 agacccttg ccgtaacgc aaacaacagc atattgacac ctggaaagac aggagatc 418  
 <210> 30  
 15 <211> 342  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> región no traducida 3' del genoma del virus de la encefalitis de St. Louis (VESL) aislado 1750-Std  
 20 <400> 30  
 ttgccaccgg atgtcaggta aacgggtgctg tctgtaacct ggccccaggt gactgggtta 60  
 tcaaagccaa tctggccgag tgcaaagccc ctcatccga ctctgggaggg tccttagcac 120  
 gtaggctgga gaggacgcaa aagtcagacc agaaatgcca cctgaaagca tgctaaaggt 180  
 gctgtctgta catgccccag gaggactggg ttaacaaagc ttaacagccc cagcggccca 240  
 aaccatggag tgcgtgacca tggcgtaagg actagaggtt agaggagacc cgcgcgaact 300  
 tggcaaggcc caaaccgct cgaagctgta gagacggggg aa 342  
 <210> 31  
 <211> 418  
 <212> DNA  
 25 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> región no traducida 3' del genoma del virus de la encefalitis de St. Louis (VESL) aislado TD6-4G  
 <400> 31  
 ttgccaccgg atgtcaggta aacgggtgctg cctgtaacct ggccccaggt gactgggtta 60  
 tcaaagccaa tctggccgag tgcaaagccc ctcatccga ctctgggaggg tcctggcac 120  
 gtaggctgga gaggacgcaa aagtcagacc agaaatgcca cctgaaagca tgctaaaggt 180  
 gctgtctgta catgccccag gaggactggg ttaacaaagc ttaacagccc cagcggccca 240  
 aaccatggag tgcgtgacca tggcgtaagg actagaggtt agaggagacc cgcgtgcaac 300  
 tcggcaaggc ccaaaccgc tcgaagctgt agagatgggg gaaggactag aggttagagg 360  
 agacccttg ccgtaacgc aaacaacagc atattgacac ctggaaagac aggagatc 418  
 30 <210> 32  
 <211> 342  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

ES 2 524 048 T3

<220>

<223> región no traducida 3' del genoma del virus de la encefalitis de St. Louis (VESL) aislado CoaV750

<400> 32

```

ttgccaccgg atgtcaggta aacgggtgctg cctgtaacct ggccccaggt gactgggtta      60
ccaaagccaa tctggctgag tgcaaagccc ctcgttccga ttcgggaggg tccctggcac      120
gtaggctgga gaggacgcaa aagtcagacc agaaatgcc a cctgaaagca tgctaaaggt      180
gctgtctgta catgccccag gaggactggg ttaacaaagc ttaacagccc cagcggccca      240
aaccatggag tgcgtgacca tggcgttaagg actagaggtt agaggagacc ccgcgcaact      300
tggcaaggcc aaaaccgct cgaagctgta gagatggggg aa                          342

```

5

<210> 33

<211> 418

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

10 <223> región no traducida 3' del genoma del virus de la encefalitis de St. Louis (VESL) aislado L695121.05

<400> 33

```

ttgccaccgg atgtcaggta aacgggtgctg tctgtaacct ggccccaggt gactgggtta      60
tcaaagccaa tccggctggg tgcaaagccc ctcatccga ctcgggaggg tccctggcat      120
gtaggctgga gaggacgcac aagtcagacc agaaatgcc a cctgaaagca tgctaaaggt      180
gctgtctgta catgccccag gaggactggg ttaacaaagc ttaacagccc cagcggccca      240
aaccatggag tgcgtgacca tggcgttaagg actagaggtt agaggagacc ccgctgtaac      300
ttggcaaggc ccaaaccgc tcgaagctgt agagacgggg gaaggactag aggttagagg      360
agacccttg ccgttaacgc aaacaacagc atattgacac ctggaaagac aggagatc      418

```

<210> 34

<211> 418

15

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> región no traducida 3' del genoma del virus de la encefalitis de St. Louis (VESL) aislado TNM771K

<220>

20 <221> característica\_miscelánea

<222> (384)..(384)

<223> n = g, a, c o t

<400> 34

```

ttgccaccgg atgtcaggta aacgggtgctg tctgtaacct ggccccaggt gactgggtca      60
tcaaagccaa tctggctggg tgcaaagccc ctcatccga ctcgggaggg tccctggcac      120
gtaggctgga gaggacgcac aagtcagacc agaaatgcc a cctgaaagca tgctaaaggt      180
gctgtctgta catgccccag gaggactggg ttaacaaagc ttaacagccc cagcggccca      240
aaccatggag agcgtgacca tggcgttaagg actagaggtt agaggagacc ccgctgtaac      300
ttggcaaggc ccaaaccgc tcgaagctgt agagacgggg gaaggactag aggttagagg      360
agacccttg ccgttaacgc aaanaacagc atattgacac ctggaaagac aggagatc      418

```

25

<210> 35

<211> 418

<212> DNA

<213> Artificial

ES 2 524 048 T3

<220>  
 <223> región no traducida 3' del genoma del virus de la encefalitis de St. Louis (VESL) aislado MSI-7  
 <400> 35

ttgccaccgg atgtcaggta aacgggtgctg tctgtaacct ggccccaggc gactgggtta 60  
 tcaaagccaa tccggctggg tgcaaagccc ctcatccga ctctggaggg tccctggcac 120  
 gtaggctgga gaggacgcac aagtcagacc agaaatgcca cctgaaagca tgctaaaggt 180  
 gctgtctgta catgccccag gaggactggg ttaacaaagc ttaacagccc cagcggccca 240  
 aaccatggag tgcgtgacca tggcgttaagg actagagggt agaggagacc ccgctgtaac 300  
 ttggcaaggc ccaaaccgc tcaaagctgt agagacgggg gaaggactag aggttagagg 360  
 agacccttg ccgttaacgc aaacaacagc atattgacac ctggaaagac aggagatc 418

5 <210> 36  
 <211> 405  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>

10 <223> región no traducida 3' del genoma del virus de la encefalitis de St. Louis (VESL) aislado Kern217  
 <400> 36

ccgatgtca ggtaaaccgg gctgtctgta acctggcccc aggtcactgg gttatcaaag 60  
 ccaaccggc tgggtgcaaa gccctcatt ccgactcggg agggccctg gcacgtaggc 120  
 tggagaggac gcacaagtca gaccagaaat gccacctgaa agcatgctaa aggtgctgtc 180  
 tgtacatgcc ccaggaggac tgggttaaca aagcttaaca gcccagcgg cccaaacct 240  
 ggagtgcgtg accatggcgt aaggactaga ggtagagga gaccocgtg taacttggca 300  
 aggccaaaac ccgtcaaag ctgtagagac gggggaagga ctagaggta gaggagacc 360  
 cttgcgtta acgcaaaca cagcatattg acacctgga agaca 405

<210> 37  
 <211> 375  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>

15 <223> región no traducida 3' del genoma del virus de la encefalitis de St. Louis (VESL) aislado CoaV608  
 <400> 37

cccaggcgac tgggttatca aagccaatcc ggctgggtgc aaagcccctc attccgactc 60  
 gggaggggtcc ctggcacgta ggctggagag gacgcacaag tcagaccaga aatgccacct 120  
 gaaagcatgc taaaggtgct gtctgtacat gcccaggag gactgggtta acaaagctta 180  
 acagccccag cggcccaaac catggagtgc gtgaccatgg cgtaaggact agaggtaga 240  
 ggagaccccg ctgtaacttg gcaaggcca aaccgctca aagctgtaga gacgggggaa 300  
 ggactagagg ttagaggaga ccccttgccg ttaacgcaaa caacagcata ttgacacctg 360

20 gaaagacagg agatc 375

<210> 38  
 <211> 411  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>

25 <223> región no traducida 3' del genoma del virus de la encefalitis de St. Louis (VESL) aislado TBH-28  
 <400> 38

ES 2 524 048 T3

ttgccaccgg atgtcaggta aacgggtgctg tctgtaacct ggccccaggt gactggggtta 60  
 tcaaagccaa cccggctggg tgcaaagccc ctcattccga ctcgggaggg tccttgccac 120  
 gtaggcgga gaggacgcac aagtcagacc agaaatgcca cctgaaagca tgctaaaggt 180  
 gctgtctgta catgccccag gaggactggg ttaacaaagc ttaacagccc cagcggccca 240  
 aaccatggag tgcgtgacca tggcgtaagg actagaggtt agaggagacc ccgctgtaat 300  
 ttggcaaggc ccaaaccgc tcgaagctgt agagacgggg gaaggactag aggttagagg 360  
 agacccttg cgttaacgc aaacaacagc atattgacac ctggaaagac a 411

<210> 39  
 <211> 402  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>

5 <223> región no traducida 3' del genoma del virus de la encefalitis de St. Louis (VESL) aislado VR1265  
 <400> 39

ccggaagtca ggtaaacggg gctgtctgta acctggcccc aggtgactgg gttatcaaag 60  
 ccaatctggc tgggtgcaaa gccctcatt ccgactcggg aggttccttg gcacgtaggc 120  
 tggagcggac gcacaagtca gaccagaaat gccacctgaa agcatgctaa aggtgctgtc 180  
 tgtacatgcc ccaggaggac tgggtaaca aagcttaaca gcccagcgg ccaaaccat 240  
 ggagtgcgtg accatggcgt aaggactaga ggtagagga gaccccgctg taacttggca 300  
 aggcccaaac ccgctcgaag ctgtagagac gggggaagga ctagaggtta gaggagacc 360  
 cttgccgtca acgcaaaca cagcatattg acacctgga ag 402

10 <210> 40  
 <211> 374  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>

15 <223> región no traducida 3' del genoma del virus de la encefalitis de St. Louis (VESL) aislado CoaV353  
 <400> 40

cccagggtgac tgggttatca aagccaatct agctgagtgc aaagcccctc attccgactc 60  
 gggaggggtcc ctggcacgta ggctggagag gacgcaaaag tcagaccaga aatgccacct 120  
 gaaagcatgc taaaggtgct gtctgtacat gcccaggag gactggggtta acaaagctta 180  
 acagccccag cgccccaaac catggagtgc gtgacctgg cgtaaggact agagggttaga 240  
 ggagaccccc ctgcaacttg gcaaggccca aaccgctcg aagctgtaga gacgggggaa 300  
 ggactagagg ttagaggaga ccccttgccg ttaacgcaaa caacagcata ttgacacctg 360  
 gaaagacagg agat 374

20 <210> 41  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador consenso corriente arriba del virus del Dengue

25 <400> 41  
 gagccccgtc caaggacgta aaaagaa 27  
 <210> 42

<211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>

30



<223> cebador consenso corriente arriba del virus del Dengue  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (27)..(27)  
 5 <223> n = t-butyl-bencil-dA  
 <400> 42  
 gagccccgtc caaggacgta aaaagan 27  
 <210> 43  
 <211> 27  
 10 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador consenso corriente arriba del virus del Dengue  
 <220>  
 15 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (26)..(26)  
 <223> n = metil-dA  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 20 <222> (27)..(27)  
 <223> n = t-butyl-bencil-dA  
 <400> 43  
 gagccccgtc caaggacgta aaaagnn 27  
 <210> 44  
 25 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador corriente arriba del virus del Dengue tipo I  
 30 <400> 44  
 gagccccgtc caaggacgta aatgaa 27  
 <210> 45  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 35 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador corriente arriba del virus del Dengue tipo I  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 40 <222> (27)..(27)  
 <223> n = t-butyl-benzly-dA  
 <400> 45  
 gagccccgtc caaggacgta aatgan 27  
 <210> 46  
 45 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador corriente arriba del virus del Dengue tipo I  
 50 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (26)..(26)  
 <223> N = metil-dA  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 55 <222> (27)..(27)  
 <223> n = t-butyl-bencil-dA  
 <400> 46  
 gagccccgtc caaggacgta aatggnn 27  
 60 <210> 47  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 65 <223> cebador corriente arriba del virus del Dengue tipos II y III  
 <400> 47

gagccccgtc caaggacgtt aaaagaa 27  
 <210> 48  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 5 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador corriente arriba del virus del Dengue tipos II y III  
 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 10 <222> (27)..(27)  
 <223> n = t-butil-bencil-dA  
 <400> 48  
 gagccccgtc caaggacgtt aaaagan 27  
 <210> 49  
 15 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador corriente arriba del virus del Dengue tipos II y III  
 20 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (26)..(26)  
 <223> n = metil-dA  
 <220>  
 25 <221> característica\_misclánea  
 <222> (27)..(27)  
 <223> n = t-butil-bencil-dA  
 <400> 49  
 gagccccgtc caaggacgtt aaaagnn 27  
 30 <210> 50  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 35 <223> cebador corriente arriba del virus del Dengue tipo IV  
 <400> 50  
 attgaagtca ggccactgt gccca 24  
 <210> 51  
 <211> 24  
 40 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador corriente arriba del virus del Dengue tipo IV  
 <220>  
 45 <221> característica\_misclánea  
 <222> (24)..(24)  
 <223> n = t-butil-bencil-dA  
 <400> 51  
 attgaagtca ggccactgt gccn 24  
 50 <210> 52  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 55 <223> cebador corriente arriba del virus del Dengue tipo IV  
 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (23)..(23)  
 <223> n = etil-dC  
 60 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (24)..(24)  
 <223> n = t-butil-bencil-dA  
 <400> 52  
 65 attgaagtca ggccactgt gcnn 24  
 <210> 53

<211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 5 <223> cebador corriente abajo del virus del Dengue  
 <400> 53  
 gatctctggt ctttcccagc gtaa 25  
 <210> 54  
 <211> 25  
 10 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador corriente abajo del virus del Dengue  
 <220>  
 15 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (25)..(25)  
 <223> n = t-butil-bencil-dA  
 <400> 54  
 gatctctggt ctttcccagc gtcan 25  
 20 <210> 55  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 25 <223> cebador corriente abajo del virus del Dengue  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (24)..(24)  
 <223> n = metil-dA  
 30 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (25)..(25)  
 <223> n = t-butil-bencil-dA  
 <400> 55  
 35 gatctctggt ctttcccagc gtcnn 25  
 <210> 56  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 40 <220>  
 <223> cebador corriente arriba del virus de la fiebre amarilla  
 <400> 56  
 aaccgggata aaaactacgg gtggagaa 28  
 <210> 57  
 45 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador corriente arriba del virus de la fiebre amarilla  
 50 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (28)..(28)  
 <223> n = t-butil-bencil-dA  
 <400> 57  
 55 aaccgggata aaaactacgg gtggagan 28  
 <210> 58  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 60 <220>  
 <223> cebador corriente arriba del virus de la fiebre amarilla  
 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (27)..(27)  
 65 <223> n = metil-dA  
 <220>

<221> característica\_misclánea  
 <222> (28)..(28)  
 <223> n = t-butil-bencil-dA  
 <400> 58  
 5 aaccgggata aaaactacgg gtggagnn 28  
 <210> 59  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> cebador corriente arriba del virus de la fiebre amarilla  
 <400> 59  
 ataaaaacta cgggtggaga accgga 26  
 <210> 60  
 15 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador corriente arriba del virus de la fiebre amarilla  
 20 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (26)..(26)  
 <223> n = t-butil-bencil-dA  
 <400> 60  
 25 ataaaaacta cgggtggaga accggn 26  
 <210> 61  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> cebador corriente abajo del virus de la fiebre amarilla  
 <400> 61  
 actccgtct ttcctggcg tcaa 24  
 <210> 62  
 35 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador corriente abajo del virus de la fiebre amarilla  
 40 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (24)..(24)  
 <223> n = t-butil-bencil-dA  
 <400> 62  
 45 actccgtct ttcctggcg tcan 24  
 <210> 63  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 50 <220>  
 <223> cebador corriente abajo del virus de la fiebre amarilla  
 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (23)..(23)  
 55 <223> n = metil-dA  
 <220>  
 <221> característica\_misclánea  
 <222> (24)..(24)  
 <223> n = t-butil-bencil-dA  
 60 <400> 63  
 actccgtct ttcctggcg tcnn 24  
 <210> 64  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 65 <213> Artificial  
 <220>

<223> cebador corriente arriba del virus de la encefalitis de St. Louis  
 <400> 64  
 caaagcccct cattccgact cgga 25  
 <210> 65  
 5 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador corriente arriba del virus de la encefalitis de St. Louis  
 10 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (25)..(25)  
 <223> n = t-butil-bencil-dA  
 <400> 65  
 15 caaagcccct cattccgact cggn 25  
 <210> 66  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> cebador corriente arriba del virus de la encefalitis de St. Louis  
 <400> 66  
 tctcctgtct ttccaggtgt caa 23  
 <210> 67  
 25 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador corriente arriba del virus de la encefalitis de St. Louis  
 30 <220>  
 <221> característica\_miscelánea  
 <222> (23)..(23)  
 <223> n = t-butil-bencil-dA  
 <400> 67  
 35 tctcctgtct ttccaggtgt can 23  
 <210> 68  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 40 <220>  
 <223> complementario del primer cebador del virus de la encefalitis de St. Louis (VESL)  
 <400> 68  
 ttgacacctg gaaagacagg aga 23  
 <210> 69  
 45 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> segundo cebador del virus de la encefalitis de St. Louis (VESL)  
 50 <400> 69  
 caaagcccct cattccgact cggg 24  
 <210> 70  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 55 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> sonda antisentido de Flavivirus  
 <400> 70  
 ggtctcctc taacctctag tcctccccc 30  
 60 <210> 71  
 <211> 100  
 <212> DNA  
 <213> Artificial  
 <220>  
 65 <223> Región de secuencia conservada en 3' región sin traducir de los genomas de flavivirus, AF196835  
 <220>

# ES 2 524 048 T3

```

<221> característica_misclánea
<222> (1)..(100)
<223> n = g, a, c o t
<400> 71
    caaccccagg aggactgggt gaacaaagcc gcgaagtgan tccatgtaag ccnctcagaa      60
5    ccgtctcgga aggaggaccc cacatgttgt aacttcaaag                          100
    <210> 72
    <211> 183
    <212> DNA
    <213> Artificial
10    <220>
    <223> Región de secuencia conservada en 3' región sin traducir de los genomas de flavivirus, AF196835
    <220>
    <221> característica_misclánea
    <222> (1)..(183)
15    <223> n = g, a, c o t
    <400> 72
    gaagctgtag gtcaggngga aggactagag gttagtggag accccgtgcc acaaaacacc      60
    acaacaaaac agcatattga cacctgggan tagactagga gatcttctgc tctngcacia      120
    cncagccac acggcacagt gcgccgacia tggtagctgg tggtagcna gaacacagga      180
    tct                                                                    183
    <210> 73
    <211> 120
    <212> DNA
    <213> Artificial
20    <220>
    <223> Región de secuencia conservada en 3' región sin traducir de los genomas de flavivirus, AF196835
    <220>
    <221> característica_misclánea
    <222> (1)..(120)
    <223> n = g, a, c o t
25    <400> 73
    acgcgccct agcncgcng tanntnatgg tgnnttaac ncagggcgan aaggactaga      60
    ggtagagga gaccncgcg gtnntnnnn nnaaagtgca nncggcccag ccnntgactn      120
30    <210> 74
    <211> 25
    <212> DNA
    <213> Artificial
    <220>
35    <223> Ejemplo de cebador 2
    <400> 74
    tctctagtc tatccaggt gtaa 25

```

## REIVINDICACIONES

1. Un equipo para la detección de un ácido nucleico de varios miembros del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa en una muestra biológica en condiciones de hibridación restrictivas, que comprende:
- 5 a) un primer oligonucleótido cebador que comprende el Id. de Sec. N°: 8 o un complementario del mismo;  
 b) un segundo oligonucleótido cebador que comprende el Id. de Sec. N°: 15 o un complementario del mismo; y  
 c) un tercer oligonucleótido sonda marcado de forma detectable que comprende el Id. de Sec. N°: 28, o el  
 10 complementario del mismo, en el que el marcador detectable en el tercer oligonucleótido sonda es una porción fluorescente.
2. El equipo de la reivindicación 1, en el que el residuo en la posición 24 del Id. de Sec. N°: 8 es N<sup>6</sup>-alquil-desoxiadenosina.
- 15 3. El equipo de la reivindicación 1, en el que el tercer oligonucleótido sonda marcado de forma detectable comprende además una porción atenuadora.
4. El equipo de la reivindicación 1, en el que la porción fluorescente se selecciona del grupo que consiste en colorantes de la familia de la fluoresceína, colorantes de la familia de la polihalofluoresceína, colorantes de la familia de la hexaclorofluoresceína, colorantes de la familia de la cumarina, colorantes de la familia de la rodamina, colorantes de la familia de la cianina, colorantes de la familia de la oxazina, colorantes de la familia de la tiazina, colorantes de la familia de la escuarina, colorantes de la familia de los lantánidos quelados y colorantes de la familia de BODIPY®.
- 20 5. El equipo de la reivindicación 1, en el que la porción fluorescente es 6-carboxifluoresceína.
6. El equipo de la reivindicación 3, en el que la porción atenuadora se selecciona del grupo que consiste en colorantes de la familia de la fluoresceína, colorantes de la familia de la polihalofluoresceína, colorantes de la familia de la hexaclorofluoresceína, colorantes de la familia de la cumarina, colorantes de la familia de la rodamina, colorantes de la familia de la cianina, colorantes de la familia de la oxazina, colorantes de la familia de la tiazina, colorantes de la familia de la escuarina, colorantes de la familia de los lantánidos quelados y colorantes de la familia de BODIPY®-familia, y porciones atenuadoras no fluorescentes.
- 30 7. El equipo de la reivindicación 6, en el que la porción atenuadora no fluorescente es un colorante de la familia BHQ<sup>TM</sup>, Iowa Black<sup>TM</sup>, o Dabcyl.
- 35 8. El equipo de la reivindicación 3, en el que la porción atenuadora es Cy5<sup>TM</sup>.
9. El equipo de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una polimerasa de DNA termoestable.
- 40 10. El equipo de la reivindicación 9, en el que la polimerasa de DNA termoestable se selecciona entre el grupo de polimerasa de DNA de Carboxydotherrnus hydrogenformans, polimerasa de DNA de Thermosipho africanus, polimerasa de DNA de Bacillus pallidus, polimerasa de DNA de especies de Thermus Z05, polimerasa de DNA de Thermus aquaticus, polimerasa de DNA de Thermus thermophilus, polimerasa de DNA de Thermatoga maritima, polimerasa de DNA de Thermatoga neapolitana, y polimerasa de DNA de Thermus sps17.
- 45 11. El equipo de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente instrucciones para detectar un ácido nucleico de un miembro del serogrupo del virus de la encefalitis japonesa.

FIGURA 1

Id. de Sec. 8	GTANGCC	CTCAGAACCGTCTCGGAA	(→)
AF196835	CAJCCCCAGGACTGGTGTGAACAAAGCCGGGAAGTGA	TCCATGTANGCC	CTCAGAACCGTCTCGGAGGAGGCCACCCACATGTTGTAACCTTCAJAG
AF260968	.....T.....	.....	.....
AF260969	.....C.....	.....C.....	.....G.C.T..G.C.....
AF481864	.....T.....	.....	.....
M12294	.....T.....	.....	.....
AF206518	.....T.....	.....	.....
AF317203	.....	.....	.....
AF202541	.....	.....	.....
AF404757	.....T.....	.....	.....
AF404753	.....	.....	.....
AF404754	.....	.....	.....
AF404755	.....	.....	.....
AF404756	.....	.....	.....
AF017254	.....T.....	.....	.....
L48977	.....C.....	.....C.....	.....G.C.T..G.C.....
AF196536	.....T.....	.....	.....
AF196537	.....T.G.C.....	.....T.....	.....G.C.....
AF196538	.....T.G.C.....	.....T.....	.....GT.C.....
AF196540	.....T.G.C.....	.....T.....	.....GT.C.....
AF196541	.....	.....	.....
AF196542	.....	.....	.....
AF196543	.....T.C.....	.....G.....	.....A.....T.G.C.....G.....
AF297840	.....T.....	.....C.....	.....A.....G.....G.....G.....
AF458343	.....	.....C.....	.....G.....
AF458344	.....T.....	.....	.....
AF458347	.....T.....	.....	.....
AF458348	.....	.....	.....
AF458350	.....	.....	.....
AF458352	.....T.G.C.....	.....C.....	.....T.....GT.Y.....
AF458353	.....T.G.C.....	.....T.....	.....GT.C.....
AF458355	.....T.....	.....	.....
AF458358	.....T.C.....	.....G.....	.....C.....A.....G.....T.G.C.....G.....
AF458360	.....	.....	.....
AF458361	.....	.....	.....



AF208017 .....C.....T.....G.....C.....G.....G.....C.T.G.C.....  
 AF196539 .....C.....T.....G.....C.....G.....G.....C.T.G.C.....  
 AF196535 .....C.....G.....C.....G.....G.....C.T.G.C.....G.....  
 AF458359 .....C.....T.....G.....C.....G.....G.....C.T.G.C.....  
 AF458357 .....C.....G.....C.....G.....G.....G.....C.T.G.C.....  
 AF458354 .....C.....T.....G.....C.....G.....G.....C.T.G.C.....  
 AF458349 .....C.....C.T.....G.....C.....G.....G.....C.T.G.C.....  
 AF458345 .....C.....T.....G.....C.....G.....G.....C.T.G.C.....  
 AF458346 .....C.....T.....G.....C.....T.....G.....G.....C.T.G.C.C.....  
 AF533540 .....  
 AY187012 .....G.....  
 AY187013 .....  
 AY187014 .....  
 AY187015 .....  
 AY262283 .....  
 AY277251 .....AT.....AT.G.C.....C.....T.....C.....G.....G.....  
 AY277252 .....  
 AY278441 .....  
 AY278442 .....A.....  
 AY268132 .....  
 AY268133 .....  
 AY490240 .....T.....  
 Kunjin .....  
 D00246 .....T.....T.....A.....G.....G.....G.....  
 AY274504 .....T.....T.....A.....G.....G.....G.....  
 AY274505 .....T.....T.....A.....G.....G.....G.....  
 L49311 .....T.....G.....C.....A.....G.....T.G.C.....G.....  
 L48978 .....T.....T.....A.....G.....G.....G.....  
 L48979 .....T.....T.....A.....G.....G.....G.....  
 AF297840 .....T.....T.....C.....A.....G.....G.....G.....  
 AF297841 .....T.....T.....A.....G.....G.....G.....  
 AF297842 .....T.....T.....A.....G.....G.....G.....  
 AF297843 .....T.....T.....A.....G.....G.....G.....  
 AF297844 .....T.....T.....A.....G.....G.....G.....  
 AF297845 .....T.....T.....A.....G.....G.....G.....  
 AF297846 .....T.....T.....C.....A.....G.....T.....G.....G.....  
 AF297847 .....T.....T.....C.....A.....G.....G.....G.....  
 AF297848 .....T.....T.....A.....G.....G.....G.....

AF297849 .....T.....A.....G.....G.....  
 AF297850 .....T.....C.....G.....G.....  
 AF297851 .....T.....GTA.....GAG.....GC  
 AF297852 .....T.....C.....G.....G.....G.....  
 AF297853 .....T.....A.....G.....G.....G.....  
 AF297854 .....T.....A.....G.....G.....GA  
 AF297855 .....T.....A.....G.....G.....G.....  
 AF297856 .....T.....A.....G.....G.....G.....  
 AF297857 .....T.....A.....G.....G.....G.....  
 AF297858 .....T.....G.....CCT.....GA.....G.....  
 AF297859 .....T.....A.....G.....G.....G.....  
 AF458351 .....T.....GA.....G.....G.....G.....  
 AF458356 .....T.....C.....G.....G.....G.....  
 L24512 .....T.....A.....G.....G.....G.....  
 JEV  
 AB051292 .....T.T.AC.CG.AGGTGG.A.....T.T.GCACCC.G.G.G.....  
 AF014160 .....T.T.AC.TA.AAGTGA.A.....C.T.TG.TCAC..G.G.G.G.  
 AF014161 .....T.T.AC.TA.AAGTGA.A.....C.T.TG.TCAC..G.G.G.G.  
 AF045551 .....T.T.AC.CG.AGGTGG.A.....C.T.TG.TCAC..G.G.G.G.  
 AF069076 .....T.T.AC.CA.AAGTGA.A.....C.T.TG.TCAC..G.G.G.G.  
 AF075723 .....T.T.AC.CA.CAGTGA.A.....C.T.TG.TCAC..G.G.G.G.  
 AF080251 .....T.T.AC.CA.AAGTGA.A.....G.....T.T.TG.TCAC..G.G.G.G.  
 AF098735 .....T.T.AC.CA.AAGTGA.A.....C.T.TG.TCAC..G.G.G.G.  
 AF098736 .....T.T.AC.CA.AAGTGA.A.....C.T.TG.TCAC..G.G.G.G.  
 AF098737 .....T.T.AC.CA.AAGTGA.A.....C.T.TG.TCAC..G.G.G.G.  
 AF217620 .....T.T.AC.CA.AAGTGA.A.....C.T.TG.TCAC..G.G.G.G.  
 AF221499 .....T.T.AC.CA.AGGTGA.A.....T.T.TG.TCAC..G.G.G.G.  
 AF221500 .....T.T.AC.CA.AAGTGA.A.....T.T.TG.TCAC..G.G.G.G.  
 AF254452 .....T.T.AC.CA.AAGTGA.A.....T.T.TG.TCAC..G.G.G.G.  
 AF254453 .....T.T.AC.CA.AAGTGA.A.....C.T.TG.TCAC..G.G.G.G.  
 AF315119 .....T.T.AC.CA.AAGTGA.A.....T.....T.T.TG.TCAC..G.G.G.G.  
 AF416457 .....T.T.AC.CMA.AAGTGA.A.....T.T.TG.TCAC..G.G.G.G.  
 AF486638 .....T.T.AC.CA.AAGTGA.A.....C.T.TG.TCAC..G.G.G.G.  
 U14163 .....T.T.AC.CA.AAGTGA.A.....T.T.TG.TCAC..G.G.G.G.  
 U15763 .....T.T.AC.CA.AAGTGA.A.....T.T.TG.TCAC..G.G.G.G.  
 L48961 .....T.T.AC.CG.AAGTGA.A.....T.T.TG.TCAC..G.G.G.G.  
 U47032 .....T.T.AC.CA.AAGTGA.A.....T.T.TG.TCAC..G.G.G.G.  
 M18370 .....T.T.AC.CA.AAGTGA.A.....T.T.TG.TCAC..G.G.G.G.

M55506 .GT.....T.....T.T.AC.CA.AAGTGA.A.....T.....T.....TG.TCAC.G.G.G.....  
D90195 .GT.....T.....T.T.AC.CA.AAGTGA.A.....T.....T.....TG.TCAC.G.G.G.....  
D90194 .GT.....T.....T.T.AC.CA.AAGTGA.A.....T.....T.....TG.TCAC.G.G.G.....  
AF311748 .GT.....T.....T.T.AC.CA.AAGTGA.A.....T.....T.....TG.TCAC.G.G.G.....  
AF092550 .GTT.....T.....T.T.AC.CA.AGGTGA.A.....T.....T.....TG.TCAC.G.G.G.....  
AF092552 .GTT.....T.....T.T.AC.CA.AGGTGA.A.....T.....T.....TG.TCAC.G.G.G.....  
AF092553 .GTT.....T.....T.T.AC.CA.AGGTGA.A.....T.....T.....TG.TCAC.G.G.G.....  
AF139531 .GTT.....T.....T.T.AC.CA.AGGTGA.A.....T.....T.....TG.TCAC.G.G.G.....  
AF148900 .GTT.....T.....T.T.AC.CA.AGGTGA.A.....T.....T.....TG.TCAC.G.G.G.....  
AF148901 .GTT.....T.....T.T.AC.CA.AGGTGA.A.....T.....T.....TG.TCAC.G.G.G.....  
AF148902 .GTT.....T.....T.T.AC.CA.AGGTGA.A.....T.....T.....TG.TCAC.G.G.G.....  
AF218068 .GTT.....T.....T.T.AC.CA.AGGTGA.A.....T.....T.....TG.TCAC.G.G.G.....  
AF289816 .GT.....T.....T.T.AC.CG.AGGTGG.A.....T.....T.....TG.TCAC.G.G.G.....  
AF318291 .GT.....T.....T.T.AC.CG.AGGTGG.A.....T.....T.....TG.TCAC.G.G.G.....  
L48967 .GTT.....T.....T.T.AC.CA.AGGTGA.A.C.....T.....T.....TG.TCAC.G.G.G.....  
L48968 .GT.....C.....T.T.AC.CG.GAGTGA.A.....A.....T.....TG.TCAC.G.G.G.....  
AY184212 .GT.....T.....T.T.AC.CG.AGGTGG.A.....T.....T.....TG.TCAC.G.G.G.....  
AY251616 .GTT.....T.....T.T.AC.CG.AGGTGG.A.....C.....T.....TG.TCAC.G.G.G.....  
AY278556 .GTT.....T.....T.T.AC.CG.AGGTGG.A.....A.....T.....TG.TCAC.G.G.G.....  
AY316157 .GTT.....T.....T.T.AC.CA.AGGTGA.A.....T.....T.....TG.TCAC.G.G.G.....  
L54067 .GTT.....T.....T.T.AC.CA.AGGTGA.A.....T.....T.....TG.TCAC.G.G.G.....  
L54068 .GTT.....T.....T.T.AC.CA.AGGTGA.A.....T.....T.....TG.TCAC.G.G.G.....  
L54069 .GTT.....T.....T.T.AC.CA.AGGTGA.A.....T.....T.....TG.TCAC.G.G.G.....  
L54070 .GTT.....T.....T.T.AC.CA.AGGTGA.A.....T.....T.....TG.TCAC.G.G.G.....  
L54071 .GTT.....T.....T.T.AC.CA.AGGTGA.A.....T.....T.....TG.TCAC.G.G.G.....  
L54072 .GTT.....T.....T.T.AC.CA.AGGTGA.A.....T.....T.....TG.TCAC.G.G.G.....  
L54122 .GTT.....T.....T.T.AC.CA.AGGTGA.A.....T.....T.....TG.TCAC.G.G.G.....  
L54123 .GTT.....T.....TTT.AC.CG.AGGTGG.A.....CTCCT.....TT.TCAC.G.G.G.....  
AF306514 .GT.....G.....C.....TTT.AC.CG.AGGTGG.A.....T.....T.....TT.TCAC.G.G.G.....  
AF306515 .TT.....T.....TTT.AC.CA.AAGTGA.A.....T.....T.....TT.TCAC.G.G.G.....  
AF306516 .GT.....T.....T.T.AC.CA.AGGTGA.A.....A.....T.....TT.TCAC.G.G.G.....  
AF306517 .VESI

BFS1750-C TGG.....T.....T.....T.T.....AATCT.GCCGAGT.GCA.....C.....TT.....A.....G.....GTCC.TAGCACGCTAG.CTGGAGAGG.C  
1750-Std TGG.....T.....T.....T.T.....AATCT.GCCGAGT.GCA.....C.....TT.....A.....G.....GTCC.TAGCACGCTAG.CTGGAGAGG.C  
TD6-4G-C TGG.....T.....T.....T.T.....AATCT.GCCGAGT.GCA.....C.....TT.....A.....G.....GTCC.TGGCACGCTAG.CTGGAGAGG.C  
TD6-4G-20 TGG.....T.....T.....T.T.....AATCT.GCCGAGT.GCA.....C.....TT.....A.....G.....GTCC.TGGCACGCTAG.CTGGAGAGG.C  
CoaV750 TGG.....T.....T.C.....AATCT.GCTGAGT.GCA.....C.....G.TT.....AT.....G.....GTCC.TGGCACGCTAG.CTGGAGAGG.C

L695121.05 TGG.....T.....T.T.....AATCC.GCTGGGT GCA.....C.....TT...A.....G...GTCC.TGGCATTGTAG.CTGGAGAGG.C  
 TNM771K-C TGG.....T.....C.T.....AATCT.GCTGGGT GCA.....C.....TT...A.....G...GTCC.TGGCACGTAG.CTGGAGAGG.C  
 MSI-7-C TGG.....C.....T.T.....AATCC.GCTGGGT GCA.....C.....TT...A.....G...GTCC.TGGCACGTAG.CTGGAGAGG.C  
 Kern217 TGG.....C.....T.T.....AATCC.GCTGGGT GCA.....C.....TT...A.....G...GTCC.TGGCACGTAG.CTGGAGAGG.C  
 CoaV608 TGG.....C.....T.T.....AATCC.GCTGGGT GCA.....C.....TT...A.....G...GTCC.TGGCACGTAG.CTGGAGAGG.C  
 TBH-28 TGG.....T.....T.T.....AATCC.GCTGGGT GCA.....C.....TT...A.....G...GTCC.TGGCACGTAG.CTGGAGAGG.C  
 VR1265 TGG.....T.....T.T.....AATCT.GCTGGGT GCA.....C.....TT...A.....G...GTCC.TGGCACGTAG.CTGGAG.GG.C  
 CoaV353 TGG.....T.....T.T.....AATCTAGCTGAGT GCA.....C.....TT...A.....G...GTCC.TGGCACGTAG.CTGGAGAGG.C  
 MVEV  
 VR77 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACAATGGAGATG.A  
 AF161266 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACAATGGAGATG.A  
 M35172 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACAATGGAGATG.A  
 L48972 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACAATGGAGATG.A  
 L48973 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACAATGGAGATG.A  
 L48974 TGG.....T.....T.C.....T.ACTCTCT.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGCCAAACAATGGAGATG.A  
 L48975 TGG.....T.....T.C.....A.T.ACTCTCT.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TTCCAAACAATGGAGATG.A  
 L48976 TGG.....T.....T.C.....T.ATTCTCC.CGGTTG.A.....T.C.....AG.AGT...TGC.AACAATGGAGATG.A  
 Koutango virus  
 L48980 TGG.....T.....T.T.....G.A.....C.....T.....G.....T...TTC.....

FIGURA 2

				(←)	AACTGTGGACCCCT ATCTGATCCCTCT
Id. de Sec. Nº 74	TGACT	GANGCTGTAGGTCAGG	GGANGGACTAGAGGTTAGTGGAGACCCCGTCCACNAAMACACACACNAACAGCATATTGGACACCTGGGA	TAGACTAGGAGA	
AF196835	.G.	.....	.....	.....	.....
AF260967	.G.	.....	.....	.....	.....
AF260968	.G.	.....	.....	.....	.....
AF260969	.G.	.....	.....	.....	.....
AF481864	.G.	.....	.....	.....	.....
M12294	.G.	.....A.C.A.	.....A.	.....A.G.	.....G.
AF206518	.G.	.....	.....	.....	.....
AF317203	.G.	.....	.....	.....	.....
AF202541	.G.	.....	.....	.....	.....
AF404757	.G.	.....	.....	.....	.....
AF404753	.G.	.....	.....	.....	.....
AF404754	.G.	.....	.....	.....	.....
AF404755	.G.	.....	.....	.....	.....
AF404756	.G.	.....	.....	.....	.....
AF017254	.G.	.....	.....	.....	.....T
AF533540	.G.	.....	.....	.....	.....
AY262283	.G.	.....	.....G.	.....	.....
AY278441	.G.	.....	.....	.....	.....
AY268132	.G.	.....	.....	.....	.....
AY268133	.G.	.....	.....	.....	.....
Kunjin	.G.	.....	.....	.....G.	.....C.
AY274504	.G.	.....	.....	.....G.	.....C.
AY274505	.G.	.....	.....	.....G.	.....C.
L24512	.G.	.....	.....	.....G.	.....C.
VEJ					
AB051292	CCC.C.	.....G.AGG..T	.....A.	.....CAT	TTG.T. ....A....G
AF014160	CCC.C.	.....AGG..T	.....A.	.....CAT	TTG.T. ....A....G
AF014161	CCC.C.	.....AGG..T	.....A.	.....CAT	TTG.T. ....A....G
AF045551	CCC.C.	.....AGG..T.T	.....A.	.....CAA	TTTG.T. ....A....G.G
AF069076	CCC.C.	.....AGG..T	.....A.	.....CAT	TTG.T. ....A....G
AF075723	CCC.C.	.....AGG..T	.....A.	.....CAT	TTG.T. ....A....G
AF080251	CCC.C.	.....AGG..T	.....A.	.....CAT	TTG.T. ....A....G
AF098735	CTC.C.	.....AGG..T	.....A.	.....CAT	TTG.T. ....A....G
AF098736	CCC.C.	.....AGG..T	.....A.	.....CAT	TTG.T. ....A....G
AF098737	CCC.C.	.....AGG..T	.....A.	.....CAT	TTG.T. ....AGA....G

AP217620 .TC. C. . . . . AGG. A. T. . . . . A. . . . . CAT TTTG. T. . . . . A. . . . . G. . . . .  
 AF221499 CTC. C. . . . . AGG. T. . . . . A. . . . . CAT TTTG. T. . . . . A. . . . . G. . . . .  
 AF221500 CTC. C. . . . . AGG. T. . . . . A. . . . . CAT TTTG. T. . . . . A. . . . . G. . . . .  
 AF254452 CCC. C. . . . . AGG. T. . . . . A. . . . . CAT TTTG. T. . . . . A. . . . . G. . . . .  
 AF254453 CCC. C. . . . . AGG. T. . . . . A. . . . . CAT TTTG. T. . . . . A. . . . . G. . . . .  
 AF315119 CCC. C. . . . . AGG. T. . . . . A. . . . . CAT TTTG. T. . . . . A. . . . . G. . . . .  
 AF416457 CCC. C. . . . . AGG. T. . . . . A. . . . . CAT TTTG. T. . . . . A. . . . . G. . . . .  
 AF486638 CCC. C. . . . . AGG. T. . . . . A. . . . . CAT TTTG. T. . . . . A. . . . . G. . . . .  
 U14163 CCC. C. . . . . AGG. T. . . . . A. . . . . CAT TTTG. T. . . . . A. . . . . G. . . . .  
 L48961 CTC. C. . . . . AGG. T. . . . . A. . . . . CAT TTTG. T. . . . . A. . . . . G. . . . .  
 U47032 CCC. C. . . . . AGG. T. . . . . A. . . . . CAT TTTG. T. . . . . A. . . . . G. . . . .  
 M18370 CCC. C. . . . . AGG. T. . . . . A. . . . . CAT TTTG. T. . . . . A. . . . . G. . . . .  
 M55506 CCC. C. . . . . AGG. T. . . . . A. . . . . CAT TTTG. T. . . . . A. . . . . G. . . . .  
 L78128 CCC. C. . . . . AGG. T. . . . . A. . . . . CAT TTTG. T. . . . . A. . . . . G. . . . .  
 D90195 CCC. C. . . . . AGG. T. . . . . A. . . . . CAT TTTG. T. . . . . A. . . . . G. . . . .  
 D90194 CCC. C. . . . . AGG. T. . . . . A. . . . . CAT TTTG. T. . . . . A. . . . . G. . . . .  
 AF311748 CCC. C. . . . . AGG. T. . . . . A. . . . . CAT TTTG. T. . . . . A. . . . . G. . . . .  
 AY184212 CCCT. C. . . . . AAG. T. . . . . A. . . . . CAT TTTG. T. . . . . A. . . . . G. . . . .  
 AY316157 CCC. C. . . . . AGG. T. . . . . A. . . . . CAA TTTG. T. . . . . A. . . . . G. . . . .  
 AF306514 CCC. C. . . . . AGG. T. T. . . . . A. . . . . CAA TTTG. T. . . . . A. . . . . G. . . . .  
 AF306515 CCC. C. . . . . AGG. T. . . . . A. . . . . CAT TTTG. T. . . . . A. . . . . G. . . . .  
 AF306516 CCC. C. . . . . AGGG. T. . . . . A. . . . . CAT TTTG. T. . . . . A. . . . . G. . . . .  
 AF306517 CCC. C. . . . . AGG. T. . . . . A. . . . . CAT TTTG. T. . . . . A. . . . . G. . . . .  
 D00037 CCT. T. T. . . . . T. T. AGGT. TT. . . . . T. T. . . . . T. A. . . . . T. . . . . CT TTTG. T. . . . . A. . . . . G. . . . .  
 M14933 CCT. T. T. . . . . T. T. AGGT. TT. . . . . T. T. . . . . T. A. . . . . T. . . . . CT TTTG. T. . . . . A. . . . . G. . . . .  
 VESL  
 BFS1750-C CCG. C. . . . . AGAC. G. . . . . A. . . . . T. . . . . G TT. . . . . G. A. . . . . A. . . . .  
 1750-Std CCG. C. . . . . AGAC. G. . . . . A. . . . . C. GA TTTG. T. . . . . A. . . . . G. . . . .  
 TD6-4G-C CCG. C. . . . . AGAT. G. . . . . A. . . . . T. . . . . G TT. . . . . G. A. . . . . A. . . . .  
 TD6-4G-20 CCG. C. . . . . AGAT. G. . . . . A. . . . . T. . . . . G TT. . . . . G. A. . . . . A. . . . .  
 CoaV750 CCG. C. . . . . AGAT. G. . . . . A. . . . . C. G TTTG. T. . . . . A. . . . . G. . . . .  
 L695121.05 CCG. C. . . . . AGAC. G. . . . . A. . . . . T. . . . . G TT. . . . . G. A. . . . . A. . . . .  
 TNM771K-C CCG. C. . . . . AGAC. G. . . . . A. . . . . T. . . . . G TT. . . . . G. A. . . . . A. . . . .  
 MSI-7-C CCG. CA. . . . . AGAC. G. . . . . A. . . . . T. . . . . G TT. . . . . G. A. . . . . A. . . . .  
 Kern217 CCG. CA. . . . . AGAC. G. . . . . A. . . . . T. . . . . G TT. . . . . G. A. . . . . A. . . . .  
 CoaV608 CCG. CA. . . . . AGAC. G. . . . . A. . . . . T. . . . . G TT. . . . . G. A. . . . . A. . . . .  
 TBH-28 CCG. C. . . . . AGAC. G. . . . . A. . . . . T. . . . . G TT. . . . . G. A. . . . . A. . . . .

VR1265 CCG..C.....AGAC..G.....T...G TC...G. A..... A. ..  
 Coav353 CCG..C.....AGAC..G.....T...G TT...G. A..... A. ....  
VEVM  
 VR77 .CG.C .....A.G.G.T...C.....ACT.T .....G .AT... C.....AA.....  
 AP161266 .CG.C .....A.G.G.T...C.....ACT.T .....G .AT... C.....AA.....  
 M35172 .CG.C .....A.G.G.T...C.....ACT.T .....G .AT... C.....AA.....

FIGURA 3\*

Id. de Sec. 70	CCGCTTCCTGATCTCCGATCTCCTCTCGGG	TT	TAAAGT	GC	A	CGGCCAGCCCTRACT	GAGCTGTAGGTCAGG	CCCCCTTCCTGATCTCCGATCTCCTCTCGGG	(←)
Id 28	GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCGCGG							GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCGCGG	(→)
West Nile virus	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AF260967	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AF260968	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AF260969	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AF481864	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
M12294	.....	AAA	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AF206518	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AF317203	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AF202541	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AF404757	.....	.....	G..A	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AF404753	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AF404754	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AF404755	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AF404756	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AF017254	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AF208017	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AF533540	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AY262283	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AY277251	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AY277252	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AY278441	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AY278442	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AY268132	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AY268133	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AY490240	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Virus Kanjin	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AY274504	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AY274505	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
L24512	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Virus encefalitis japonesa	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AB091292	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AF014160	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AF014161	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AF045551	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AF069076	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AF075723	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AF080251	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AF098735	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AF098736	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AF098737	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AF217620	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....



AF221499	GA..T.T.	..T..T.	AAA	C..TA	A..	TG.....AG.CTC..C	..AGG..T	..A	..CAITTCG.TCA
AF221500	.GA..T.T.	..T..T.	AAA	C..TA	A..	TG.....AG.CTC..C	..AGG..T	..A	..CAITTCG.TCA
AF254452	.GA..T.T.	..T..T.	AAA	C..CA	A..	TG.....AG.CCC..C	..AGG..T	..A	..CAITTCG.TCA
AF254453	.GA..T.T.	..T..T.	AAA	C..CA	A..	TG.....AG.CCC..C	..AGG..T	..A	..CAITTCG.TCA
AF315119	.GA..T.T.	..T..T.	AAA	C..CA	A..	TG.....AG.CCC..C	..AGG..T	..A	..CAITTCG.TCA
AF416457	.GA..T.T.	..T..T.	AAA	C..CA	A..	TG.....AG.CCC..C	..AGG..T	..A	..CAITTCG.TCA
AF486638	.GA..T.T.	..T..T.	AAA	C..CA	A..	TG.....AG.CCC..C	..AGG..T	..A	..CAITTCG.TCA
U14163	.GA..T.T.	..T..T.	AAA	C..CA	A..	TG.....AG.CCC..C	..AGG..T	..A	..CAITTCG.TCA
U15763	.GA..T.T.	..T..T.	AAA	C..CA	A..	TG.....AG.CCC..C	..AGG..T	..A	..CAITTCG.TCA
L48961	.GA..T.T.	..T..T.	AAA	C..CA	A..	TG.....AG.CCC..C	..AGG..T	..A	..CAITTCG.TCA
U47032	.GA..T.T.	..T..T.	AAA	C..CA	A..	TG.....AG.CCC..C	..AGG..T	..A	..CAITTCG.TCA
M18370	.GA..T.T.	..T..T.	AAA	C..CA	A..	TG.....AG.CCC..C	..AGG..T	..A	..CAITTCG.TCA
M55506	.GA..T.T.	..T..T.	AAA	C..CA	AT	TG.....AG.CCC..C	..AGG..T	..A	..CAITTCG.TCA
L78128	.GA..T.T.	..T..T.	AAA	C..CA	A..	TG.....AG.CCC..C	..AGG..T	..A	..CAITTCG.TCA
D90195	.GA..T.T.	..T..T.	AAA	C..CA	A..	TG.....AG.CCC..C	..AGG..T	..A	..CAITTCG.TCA
D90194	.GA..T.T.	..T..T.	AAA	C..CA	AT	TG.....AG.CCC..C	..AGG..T	..A	..CAITTCG.TCA
AF311748	.GA..T.T.	..T..T.	AAA	C..CA	A..	TG.....AG.CCC..C	..AGG..T	..A	..CAITTCG.TCA
AY184212	.GA..AT.T.	..T..T.	AAA	C..CA	A..	TG.....AG.CCC..C	..AGG..T	..A	..CAITTCG.TCA
AY316157	.TA..T.T.	..T..T.	AAA	C..CA	A..	TG.....AG.CCC..C	..AGG..T	..A	..CAITTCG.TCA
AF306514	TTA..T.T.	..T..T.	AAA	C..CA	T	TG.....AG.CCC..C	..AGG..T	..A	..CAITTCG.TCA
AF306515	.GA..T.T.	..T..T.	AAA	C..AA	TT	TG.....AG.CCC..C	..AGG..T	..A	..CAITTCG.TCA
AF306516	.GA..T.T.	..T..T.	AAA	C..AA	AA	TG.....AG.CCC..C	..AGG..T	..A	..CAITTCG.TCA
AF306517	.CA..T.T.	..T..T.	AAA	C..AA	AA	TG.....AG.CCC..C	..AGG..T	..A	..CAITTCG.TCA
AF306518	.CA..T.T.	..T..T.	AAA	C..AA	AA	TG.....AG.CCC..C	..AGG..T	..A	..CAITTCG.TCA
Virus encefalitis de S. Louis									
BFS1750	.T..T..T.	..T..T.	CA	.CTTG	..	..AA.CCG..C	..AGAC..G	..A	..T...GTT..CGC
L750-Std	.T..T..T.	..T..T.	CA	.CTTG	..	..AA.CCG..C	..AGAC..G	..A	..T...GTT..CGC
TD6-4G	.T..T..T.	..T..T.	CA	.CTOS	..	..AA.CCG..C	..AGAT..G	..A	..T...GTT..CGC
CoaV750	.T..T..T.	..T..T.	CA	.CTTG	..	..AA.CCG..C	..AGAC..G	..A	..T...GTT..CGC
L695121_05	.T..T..T.	..T..T.	CA	.CTTG	..	..AA.CCG..C	..AGAC..G	..A	..T...GTT..CGC
TNM771K	.T..T..T.	..T..T.	CA	.CTTG	..	..AA.CCG..C	..AGAC..G	..A	..T...GTT..CGC
MSI-7	.T..T..T.	..T..T.	A	.CTTG	..	..AA.CCG..C	..AGAC..G	..A	..T...GTT..CGC
Keim217	.T..T..T.	..T..T.	A	.CTTG	..	..AA.CCG..C	..AGAC..G	..A	..T...GTT..CGC
CoaV608	.T..T..T.	..T..T.	A	.CTTG	..	..AA.CCG..C	..AGAC..G	..A	..T...GTT..CGC
TBH-28	.T..T..T.	..T..T.	A	.TTTG	..	..AA.CCG..C	..AGAC..G	..A	..T...GTT..CGC
VR1265	.T..T..T.	..T..T.	A	.CTTG	..	..AA.CCG..C	..AGAC..G	..A	..T...GTT..CGC
CoaV143	.T..T..T.	..T..T.	CA	.CTTG	..	..AA.CCG..C	..AGAC..G	..A	..T...GTT..CGC
Virus encefalitis del valle de Murray									
VR77	.CC.....	..T..T.	ANG	..	.A	..AG..CG.C	..A.G.G..T..C	..A	..ACT.T
AF161266	.CC.....	..T..T.	ANG	..	.A	..AG..CG.C	..A.G.G..T..C	..A	..ACT.T
M26177	.....	..T..T.	ANG	..	.A	..AG..CG.C	..A.G.G..T..C	..A	..ACT.T
Virus del Dengue de tipo I									
UB8537	AT..GT.GCA	..T..T.	T.CCAGAC	AC..CCAGCA	..	..A.ACC.GG.G	..CCCTG.TG.T	..A	..CC..ACA.C
UB8536	AT..GT.GCA	..T..T.	T.CCAGAC	AC..CCAGCA	..	..A.ACC.GG.G	..CCCTG.TG.T	..A	..CC..ACA.C
UB8535	AT..GT.GCA	..T..T.	T.CCAGAC	AC..CCAGCA	..	..A.ACC.GG.G	..CCCTG.TG.T	..A	..CC..ACA.C
M87512	AT..GT.GCA	..T..T.	T.CCAGAC	AT..CCAGCA	..	..A.ACC.GG.G	..CCCTG.TG.T	..A	..CG..ATA.C.T
AY206457	AT..GT.GCA	..T..T.	T.CCAGAC	AC..CCAGCA	..	..A.ACC.GG.G	..CC.TG.TG.T	..A	..CC..ACA.C
AY145123	AT..GT.GCA	..T..T.	T.CCAGAC	AC..CCAGCA	..	..A.ACC.GG.G	..CC.TG.TG.T	..A	..CC..ACA.C





M29095	AT	.CGT.GT	C	.CGT.GT	T	.CGTT.AC	A	.TGCAGCAACATGGG	.AGG	.GA	T	.TCTCACT	A	.CCCGA	A	C	.A	.A
M84727	AT	.CGT.GT	C	.TCCGCAACATGGG	.AGGC	.GA	T	.TCTCACT	A	.CCCGA	A	C	.A	.A	.CCCGA	A	C	.A
M84728	AT	.CGT.GT	C	.TCCGCAACATGGG	.AGGC	.GA	T	.TCTCACT	A	.CCCGA	A	C	.A	.A	.CCCGA	A	C	.A
U61245	AT	.CGT.GT	C	.TCCGCAACATGGG	.AGGC	.GA	T	.TCTCACT	A	.CCCGA	A	C	.A	.A	.CCCGA	A	C	.A
U61246	AT	.CGT.GT	C	.TCCGCAACATGGG	.AGGC	.GA	T	.TCTCACT	A	.CCCGA	A	C	.A	.A	.CCCGA	A	C	.A
U61247	AT	.CGT.GT	C	.TCCGCAACATGGG	.AGGC	.GA	T	.TCTCACT	A	.CCCGA	A	C	.A	.A	.CCCGA	A	C	.A
U61248	AT	.CGT.GT	C	.TCCGCAACATGGG	.AGGC	.GA	T	.TCTCACT	A	.CCCGA	A	C	.A	.A	.CCCGA	A	C	.A
U87411	AT	.CGT.GT	C	.TCCGCAACATGGG	.AGGC	.GA	T	.TCTCACT	A	.CCCGA	A	C	.A	.A	.CCCGA	A	C	.A
U87412	AT	.CGT.GT	C	.TCCGCAACATGGG	.AGGC	.GA	T	.TCTCACT	A	.CCCGA	A	C	.A	.A	.CCCGA	A	C	.A
VR345-2	AT	.CGT.GT	C	.TCCGCAACATGGG	.AGGC	.GA	T	.TCTCACT	A	.CCCGA	A	C	.A	.A	.CCCGA	A	C	.A
Virus del Dengue de tipo 3																		
AF310149	AC	.TGT.GCA	C	.TGT.GCA	T	.CCATGAC	AC	.CCGACGA	CCGG	.GAG	.ACTGAGG	.CC	.CTTGCA	.A	.CC	.A	A	T
M93130	AC	.TGT.GCA	T	.CCATGAC	T	.CCATGAC	AC	.CCGACGA	CCGG	.GAG	.ACTGAGG	.CC	.CTTGCA	.TA	.CC	.A	A	C
AF317645	AC	.TGT.GCA	T	.CCATGAC	T	.CCATGAC	AC	.CCGACGA	CCGG	.GAG	.ACTGAGG	.CC	.CTTGCA	.TA	.CC	.A	A	C
AY099336	AC	.TGT.GCA	C	.TGT.GCA	T	.CCATGAC	AC	.CCGACGA	CCGG	.GAG	.ACTGAGG	.CC	.CTTGCA	.A	.CC	.A	A	T
AY099337	AC	.TGT.GCA	C	.TGT.GCA	T	.CCATGAC	AC	.CCGACGA	CCGG	.GAG	.ACTGAGG	.CC	.CTTGCA	.A	.CC	.A	A	T
AY099343	AC	.TGT.GCA	C	.TGT.GCA	T	.CCATGAC	AC	.CCGACGA	CCGG	.GAG	.ACTGAGG	.CC	.CTTGCA	.A	.CC	.A	A	T
AY099344	AC	.TGT.GCA	C	.TGT.GCA	T	.CCATGAC	AC	.CCGACGA	CCGG	.GAG	.ACTGAGG	.CC	.CTTGCA	.A	.CC	.A	A	T
AY099345	AC	.TGT.GCA	C	.TGT.GCA	T	.CCATGAC	AC	.CCGACGA	CCGG	.GAG	.ACTGAGG	.CC	.CTTGCA	.A	.CC	.A	A	T
AY099346	AC	.TGT.GCA	C	.TGT.GCA	T	.CCATGAC	AC	.CCGACGA	CCGG	.GAG	.ACTGAGG	.CC	.CTTGCA	.A	.CC	.A	A	T
AY099347	AC	.TGT.GCA	C	.TGT.GCA	T	.CCATGAC	AC	.CCGACGA	CCGG	.GAG	.ACTGAGG	.CC	.CTTGCA	.A	.CC	.A	A	T
VR1256-3	AC	.TGT.GCA	T	.CCATGAC	T	.CCATGAC	AC	.CCGACGA	CCGG	.GAG	.ACTGAGG	.CC	.CTTGCA	.TA	.CC	.A	A	C
VR1256-5	AC	.TGT.GCA	T	.CCATGAC	T	.CCATGAC	AC	.CCGACGA	CCGG	.GAG	.ACTGAGG	.CC	.CTTGCA	.TA	.CC	.A	A	C
Virus del Dengue de tipo 4																		
M14931	GT	.CAT.TT	C	.TCCATCTGAC	C	.CCGACGA	AA	.GGG	.GAGCC	.GGAG	.CTC	T	.T	.A	.CCGACGA	C	.A	.A
AF289029	GT	.CAT.TT	C	.TCCATCTGAC	C	.CCGACGA	AA	.GGG	.GAGCC	.GGAG	.CTC	T	.T	.A	.CCGACGA	C	.A	.A
AF310150	GT	.CAT.TT	T	.CCATTA	CAACA	.CCGACGA	AA	.GGG	.GAG	.C	.GGAT	.CTC	T	.AT	.CCGACGA	C	.A	.A
AF310152	GT	.CAT.TT	T	.CCATTA	CAACA	.CCGACGA	AA	.GGG	.GAG	.C	.GGAT	.CTC	T	.AT	.CCGACGA	C	.A	.A
AF310153	GT	.CAT.TT	C	.TCCATCTGAC	C	.CCGACGA	AA	.GGG	.GAGCC	.GGAG	.CTC	T	.T	.A	.CCGACGA	C	.A	.A
AF326573	GT	.CAT.TT	C	.TCCATCTGAC	C	.CCGACGA	AA	.GGG	.GAGCC	.GGAG	.CTC	T	.T	.A	.CCGACGA	C	.A	.A
AF326825	GT	.CAT.TT	C	.TCCATCTGAC	C	.CCGACGA	AA	.GGG	.GAGCC	.GGAG	.CTC	T	.T	.A	.CCGACGA	C	.A	.A
AF326827	GT	.CAT.TT	C	.TCCATCTGAC	C	.CCGACGA	AA	.GGG	.GAGCC	.GGAG	.CTC	T	.T	.A	.CCGACGA	C	.A	.A
AF326828	GT	.CAT.TT	C	.TCCATCTGAC	C	.CCGACGA	AA	.GGG	.GAGCC	.GGAG	.CTC	T	.T	.A	.CCGACGA	C	.A	.A
AY152039	GT	.CAT.TT	C	.TCCATCTGAC	C	.CCGACGA	AA	.GGG	.GAGCC	.GGAG	.CTC	T	.T	.A	.CCGACGA	C	.A	.A
AY152043	GT	.CAT.TT	C	.TCCATCTGAC	C	.CCGACGA	AA	.GGG	.GAGCC	.GGAG	.CTC	T	.T	.A	.CCGACGA	C	.A	.A
AY152047	GT	.CAT.TT	C	.TCCATCTGAC	C	.CCGACGA	AA	.GGG	.GAGCC	.GGAG	.CTC	T	.T	.A	.CCGACGA	C	.A	.A
AY152051	GT	.CAT.TT	C	.TCCATCTGAC	C	.CCGACGA	AA	.GGG	.GAGCC	.GGAG	.CTC	T	.T	.A	.CCGACGA	C	.A	.A
AY152055	GT	.CAT.TT	C	.TCCATCTGAC	C	.CCGACGA	AA	.GGG	.GAGCC	.GGAG	.CTC	T	.T	.A	.CCGACGA	C	.A	.A
AY152059	GT	.CAT.TT	C	.TCCATCTGAC	C	.CCGACGA	AA	.GGG	.GAGCC	.GGAG	.CTC	T	.T	.A	.CCGACGA	C	.A	.A
AY152063	GT	.CAT.TT	C	.TCCATCTGAC	C	.CCGACGA	AA	.GGG	.GAGCC	.GGAG	.CTC	T	.T	.A	.CCGACGA	C	.A	.A
AY152067	GT	.CAT.TT	C	.TCCATCTGAC	C	.CCGACGA	AA	.GGG	.GAGCC	.GGAG	.CTC	T	.T	.A	.CCGACGA	C	.A	.A
AY152071	GT	.CAT.TT	C	.TCCATCTGAC	C	.CCGACGA	AA	.GGG	.GAGCC	.GGAG	.CTC	T	.T	.A	.CCGACGA	C	.A	.A
AY152075	GT	.CAT.TT	C	.TCCATCTGAC	C	.CCGACGA	AA	.GGG	.GAGCC	.GGAG	.CTC	T	.T	.A	.CCGACGA	C	.A	.A
AY152079	GT	.CAT.TT	C	.TCCATCTGAC	C	.CCGACGA	AA	.GGG	.GAGCC	.GGAG	.CTC	T	.T	.A	.CCGACGA	C	.A	.A
AY152083	GT	.CAT.TT	C	.TCCATCTGAC	C	.CCGACGA	AA	.GGG	.GAGCC	.GGAG	.CTC	T	.T	.A	.CCGACGA	C	.A	.A
AY152087	GT	.CAT.TT	C	.TCCATCTGAC	C	.CCGACGA	AA	.GGG	.GAGCC	.GGAG	.CTC	T	.T	.A	.CCGACGA	C	.A	.A



AY152283	GT..CAT..TT.....C.....T..CCATCACTGACA...CCGAGCA	AA..GGG.....GAGGCC..GGAG.....CTC..T..T.....A.....CCCRACA C...
AY152287	GT..CAT..TT.....C.....T..CCATCACTGACA...CCGAGCA	AA..GGG.....GAGGCC..GGAG.....CTC..T..T.....A.....CCCRACA C...
AY152291	GT..CAT..TT.....C.....T..CCATCACTGACA...CCGAGCA	AA..GGG.....GAGGCC..GGAG.....CTC..T..T.....A.....CCCRACA C...
AY152295	GT..CAT..TT.....C.....T..CCATCACTGACA...CCGAGCA	AA..GGG.....GAGGCC..GGAG.....CTC..T..T.....A.....CCCRACA C...
AY152299	GT..CAT..TT.....C.....T..CCATCACTGACA...CCGAGCA	AA..GGG.....GAGGCC..GGAG.....CTC..T..T.....A.....CCCRACA C...
AY152303	GT..CAT..TT.....C.....T..CCATCACTGACA...CCGAGCA	AA..GGG.....GAGGCC..GGAG.....CTC..T..T.....A.....CCCRACA C...
AY152307	GT..CAT..TT.....C.....T..CCATCACTGACA...CCGAGCA	AA..GGG.....GAGGCC..GGAG.....CTC..T..T.....A.....CCCRACA C...
AY152311	GT..CAT..TT.....C.....T..CCATCACTGACA...CCGAGCA	AA..GGG.....GAGGCC..GGAG.....CTC..T..T.....A.....CCCRACA C...
AY152315	GT..CAT..TT.....C.....T..CCATCACTGACA...CCGAGCA	AA..GGG.....GAGGCC..GGAG.....CTC..T..T.....A.....CCCRACA C...
AY152319	GT..CAT..TT.....C.....T..CCATCACTGACA...CCGAGCA	AA..GGG.....GAGGCC..GGAG.....CTC..T..T.....A.....CCCRACA C...
AY152323	GT..CAT..TT.....C.....T..CCATCACTGACA...CCGAGCA	AA..GGG.....GAGGCC..GGAG.....CTC..T..T.....A.....CCCRACA C...
AY152327	GT..CAT..TT.....C.....T..CCATCACTGACA...CCGAGCA	AA..GGG.....GAGGCC..GGAG.....CTC..T..T.....A.....CCCRACA C...
AY152331	GT..CAT..TT.....C.....T..CCATCACTGACA...CCGAGCA	AA..GGG.....GAGGCC..GGAG.....CTC..T..T.....A.....CCCRACA C...
AY152335	GT..CAT..TT.....C.....T..CCATCACTGACA...CCGAGCA	AA..GGG.....GAGGCC..GGAG.....CTC..T..T.....A.....CCCRACA C...
AY152339	GT..CAT..TT.....C.....T..CCATCACTGACA...CCGAGCA	AA..GGG.....GAGGCC..GGAG.....CTC..T..T.....A.....CCCRACA C...
AY152343	GT..CAT..TT.....C.....T..CCATCACTGACA...CCGAGCA	AA..GGG.....GAGGCC..GGAG.....CTC..T..T.....A.....CCCRACA C...
AY152347	GT..CAT..TT.....C.....T..CCATCACTGACA...CCGAGCA	AA..GGG.....GAGGCC..GGAG.....CTC..T..T.....A.....CCCRACA C...
AY152351	GT..CAT..TT.....C.....T..CCATCACTGACA...CCGAGCA	AA..GGG.....GAGGCC..GGAG.....CTC..T..T.....A.....CCCRACA C...
AY152355	GT..CAT..TT.....C.....T..CCATCACTGACA...CCGAGCA	AA..GGG.....GAGGCC..GGAG.....CTC..T..T.....A.....CCCRACA C...
AY152359	GT..CAT..TT.....C.....T..CCATCACTGACA...CCGAGCA	AA..GGG.....GAGGCC..GGAG.....CTC..T..T.....A.....CCCRACA C...
AY152363	GT..CAT..TT.....C.....T..CCATCACTGACA...CCGAGCA	AA..GGG.....GAGGCC..GGAG.....CTC..T..T.....A.....CCCRACA C...
AY152171	GT..CAT..TT.....C.....T..CCATCACTGACA...CCGAGCA	AA..GGG.....GAGGCC..GGAG.....CTC..T..T.....A.....CCCRACA C...
VR217-1	GT..CAT..TT.....C.....T..CCATCACTGACA...CCGAGCA	AA..GGG.....GAGGCC..GGAG.....CTC..T..T.....A.....CCCRACA C...

\*En esta región se pueden encontrar dos lugares de unión potenciales para Id. de Sec. Nº: 28 y 70. Estos se identifican mediante subrayado para Id. de Sec. Nº: 28 y sombreado para Id. de Sec. Nº:70

FIGURA 4

KY1129      5'-GTAAGCC CTCAGAACCGTCTCGGAA-3'

WNV

AF317203      .....  
 AF196835      .....  
 AF260967      .....  
 AF260968      .....  
 AF260969      .....  
 AF481864      .....  
 M12294      .....  
 AF206518      .....  
 AF317203      .....  
 AF202541      .....  
 AF404757      .....  
 AF404753      .....  
 AF404754      .....  
 AF404755      .....  
 AF404756      .....  
 AF017254      .....  
 L48977      .....  
 AF196536      .....  
 AF196537      .....  
 AF196538      .....  
 AF196540      .....  
 AF196541      .....  
 AF196542      .....  
 AF196543      .....  
 AF458343      .....C.....  
 AF458344      .....  
 AF458347      .....  
 AF458348      .....  
 AF458350      .....  
 AF458352      .....C.....  
 AF458353      .....  
 AF458355      .....  
 AF458358      .....  
 AF458360      .....  
 AF458361      .....  
 AF208017      .....  
 AF196539      .....  
 AF196535      .....  
 AF458359      .....  
 AF458357      .....  
 AF458354      .....  
 AF458349      .....  
 AF458345      .....  
 AF458346      .....T.....T.....  
 AF533540      .....

VEJ

AB051292	.A.....
AF014160	.A.....
AF014161	.A.....
AF045551	.A.....
AF069076	.A.....
AF075723	.A.....
AF080251	.A.....G.....
AF098735	.A.....
AF098736	.A.....
AF098737	.A.....
AF217620	.A.....
AF221499	.A.....
AF221500	.A.....
AF254452	.A.....
AF254453	.A.....
AF315119	.A.....T.....
AF416457	.A.....
AF486638	.A.....
U14163	.A.....
U15763	.A.....

KY1129      5' -GTAAGCC CTCAGAACCGTCTCGGAA-3'

VEJ cont.

L48961	.A.....
U47032	.A.....
M18370	.A.....
M55506	.A.....
L78128	.A.....
D90195	.A.....
D90194	.A.....
AF311748	.A.....
AF092550	.A.....
AF092552	.A.....
AF092553	.A.....
AF139531	.A.....
AF148900	.A.....
AF148902	.A.....
AF218068	.A.....
AF289816	.A.....
AF318291	.A.....
L48967	.A.....
L48968	.A..C..
L54067	.A.....
L54068	.A.....
L54069	.A.....
L54070	.A.....
L54071	.A.....
L54072	.A.....
L54122	.A.....
L54123	.A.....
AF306514	.A.....
AF306515	.A.....T.....



AF306516 .A.....T.....  
 AF306517 .A.....A.....T.....

VEVM

AF161266 .A.....T.C.....  
 M35172 .A.....T.C.....  
 L48972 .A.....T.C.....  
 L48973 .A.....T.C.....  
 L48974 .A.....T.C...C.....  
 L48975 .A.....T.C.....  
 L48976 .A.....T.C.....T.....

KUNJIN

AF458351 .....G.  
 AF458356 .....  
 AF297840 .....C.....  
 AF297841 .....  
 AF297842 .....  
 AF297843 .....  
 AF297844 .....  
 AF297845 .....  
 AF297846 .....C.....  
 AF297847 .....C.....  
 AF297848 .....  
 AF297849 .....  
 AF297850 .....C.....  
 AF297851 .....C...GT  
 AF297852 .....C.....  
 AF297853 .....C.....  
 AF297854 .....  
 AF297855 .....  
 AF297856 .....  
 AF297857 .....G.....  
 AF297858 .....  
 AF297859 .....  
 L48978 .....  
 L49311 .....  
 D00246 .....  
 L48979 .....  
 L24512 .....

KOUTANGO

L48980 .....

KY1130 5'-TCCTAGTCTA TCCCAGGTGTCAA-3'

VNO

AF196835 .....  
 AF260967 .....  
 AF260968 .....  
 AF260969 .....

AF481864 .....  
M12294 C.....  
AF206518 .....  
AF317203 .....  
AF202541 .....  
AF404757 .....  
AF404753 .....  
AF404754 .....  
AF404755 .....  
AF404756 .....  
AF017254 .....A.....  
L24512 .....

VEJ

AB051292 ...C.....T.....  
AF014160 ...C.....T.....  
AF014161 ...C.....T.....  
AF045551 ...C.C....T.....  
AF069076 ...C.....T.....  
AF075723 ...C.....T.....  
AF080251 ...C.....T.....  
AF098735 ...C.....T.....  
AF098736 ...C.....T.....  
AF098737 ...G.....TCT.....  
AF217620 ...C.....T.....  
AF221499 ...C.....T.....  
AF221500 ...C.....T.....  
AF254452 ...C.....T.....  
AF254453 ...C.....T.....  
AF315119 ...C.....T.....  
AF416457 ...C.....T.....  
AF486638 ...C...A..T.....  
U14163 ...C.....T.....  
U15763 ...C.....T.....  
L48961 ...C.....T.....  
U47032 .....T.....  
M18370 ...C.....T.....  
M55506 ...C.....T.....  
L78128 ...C.....T.....  
D90195 ...C.....T.....  
D90194 ...C.....T.....  
AF311748 ...C.....T.....  
AF306514 ...C.C....T.....  
AF306515 ...C.....T.....  
AF306516 ...C.....T.....  
AF306517 ...C.C....T.....  
D00037 ...C.....T.....  
M14933 ...C.....T.....

VEVM

AF161266 .....TT.....  
M35172 .....TT.....

KY11131 5' -GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCGCGG-3'

VNO

AF196835 .....  
 AF260967 .....  
 AF260968 .....  
 AF260969 .....  
 AF481864 .....  
 M12294 .....T  
 AF206518 .....  
 AF317203 .....  
 AF202541 .....  
 AF404757 .....  
 AF404753 .....  
 AF404754 .....  
 AF404755 .....  
 AF404756 .....  
 AF017254 .....  
 AF208017 .....T.....A..T  
 L24512 .....T

VEJ

AB051292 .....T..  
 AF014160 .....T..  
 AF014161 .....T..  
 AF045551 .....T..  
 AF069076 .....T..  
 AF075723 .....T..  
 AF080251 .....T..  
 AF098735 .....T..  
 AF098736 .....T..  
 AF098737 .....T..  
 AF217620 .....T..  
 AF221499 .....T..  
 AF221500 .....T..  
 AF254452 .....T..  
 AF254453 .....T..  
 AF315119 .....T..  
 AF416457 .....T..  
 AF486638 .....T..  
 U14163 .....T..  
 U15763 .....T..  
 L48961 .....T..  
 L24512 .....  
 U47032 .....T..  
 M18370 .....T..  
 M55506 .....T..  
 L78128 .....T..  
 D90195 .....T..  
 D90194 .....T..  
 AF311748 .....T..  
 AF306514 .....T..  
 AF306515 .....T..

AF306516 .....T..  
 AF306517 .....T..

VEVM

AF161266 .....A.TC  
 M35172 .....A.TC

FIGURA 5

KY1131      5' -GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCGCGG-3'

DENGUE

AF226685	.....C..C
AF311956	.....C..C
AF311957	.....C..C
AF311958	.....C..C
AY145121	.....C..C
AY145122	.....C..C
AF514878	.....C..C
AF514885	.....C..C
AF514889	.....C..C
AF489932	.....C.CA
AF226687	.....C..C
AX224213	.....C..C
AX224215	.....C..C
AX224217	.....C..C
AX224219	.....C..C
AX224225	.....C..C
AX224227	.....C..C
AX224233	.....C..C
AB074760	.....C..C
AB074761	.....C..C
A75711	.....CG.C
AX224221	.....C..C
AX224223	.....C..C
U87412	.....C..C
U61246	.....C..C
U61247	.....C..C
AF100465	.....C.CA
AF100466	.....C.CA
AX224209	.....C..C
AF180818	.....C..C
AF326573	.....C.CA
AF350498	.....C..C
AF359579	.....C..C
AY037116	.....C..C
AF309950	.....C..C
AF309953	.....C.CA
AF309954	.....C.CA
AF309959	.....C.CA
AF309962	.....C..C
AF309963	.....C..C
AF309964	.....C..C
AF309965	.....C.CA
AF289029	.....C.CA
AF208496	.....C.CA
AF310146	.....C..C
AF310149	.....C..C
AF310153	.....C.CA
AF226686	.....C..C
AF276619	.....C..C

AF169678	.....	C.C.
AF169679	.....	C.C.
AF169680	.....	C.C.
AF169681	.....	C.C.
AF169682	.....	C.C.
AF169683	.....	C.C.
AF169684	.....	C.C.
AF169685	.....	C.C.
AF169686	.....	C.C.
AF169687	.....	C.C.
AF169688	.....	C.C.
AF100145	.....	C.CA
AF100467	.....	T.CC
AF100468	.....	T.CC
AF100149	.....	T.CC
M20558	.....	C.CA
M29095	.....	C.CA
M19197	.....	C.CA
M14931	.....	C.CA
U87411	.....	C.C.
U88536	.....	C..C

KY1131      5' -GGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCGCGG-3'

DENGUE, cont.

U88537	.....	C..C
AF038403	.....	C.CA
AF326826	.....	C.CA
AF326827	.....	C.CA

VIRUS DE LA LEUCOENCEFALITIS DEL MYOTIS DE MONTANA

NC_004119	.....	TTCC
-----------	-------	------

VIRUS MODOC

NC_003635	.....	CG.C
-----------	-------	------

VIRUS DE LA FIEBRE AMARILLA

X03700	..T.....	TC.A.
U52393	..T.....	TC.A.
U52407	..T.....	TC.A.
AF052448	..T.....	TC.A.

FIGURA 6

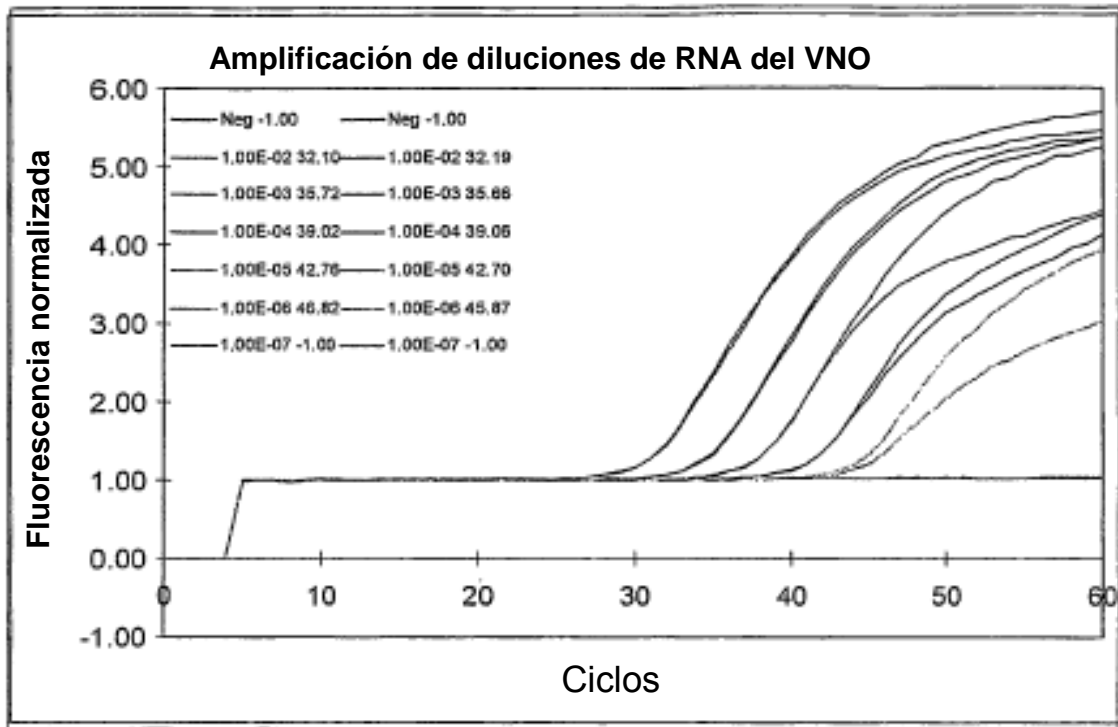


FIGURA 7

```

BFS1750      TTGCCACCGGATGTCAGGTAAACGGTGTCTGTAACTGGCCCCAGGTGACTGGGTTATCANAGCCAAATCTGGCCGAGTGCAAAGCCC 90
1750-Std
TD6-4G      .....C.....
CoaV750      .....C.....C.....T.....
L695121.05  .....C.....C.....T.G.....
TNM771K      .....C.....T.G.....
MSI-7        .....C.....C.....T.G.....
Kern217      .....C.....C.C.....T.G.....
CoaV608      .....C.....C.C.....T.G.....
TBH-28       .....C.....C.C.....T.G.....
VR1265       .....A.....T.G.....
CoaV353      .....A.T.....

BFS1750      CTCATTCGGACTCGGAGGGTCCCTAGCNCGTAGGTGGAGGACGCAAAAGTACAGACCAGAAANTGCCACCTGAAAGCATGCTAAAGGT 180
1750-Std
TD6-4G      .....G.....
CoaV750      .....T.....G.....
L695121.05  .....G.T.....G.....
TNM771K      .....G.....C.....
MSI-7        .....G.....C.....
Kern217      .....G.....C.....
CoaV608      .....G.....C.....
TBH-28       .....G.....C.....
VR1265       .....G.....C.....
CoaV353      .....G.....

BFS1750      GCTGTCTGTACATGCCCCAGGAGGACTGGGTTAACAAAGCTTAACAGCCCCAGCGGCCAAACCANTGGAGTGGCGTGACCATGGCCGTAAGG 270
1750-Std
TD6-4G      .....
CoaV750      .....
L695121.05  .....

```

TNM771K .....A.....  
 MSI-7 .....  
 Kern217 .....  
 CoaV608 .....  
 TBH-28 .....  
 VR1265 .....  
 CoaV353 .....  
  
 BFS1750 ACTAGAGTTAGAGGACCCCGCTGCAACTTGGCAAGGCCCAACCCGCTCGAAGCTGTAGAGACGGGGGAAGGACTAGAGGTTAGAGG 360  
 1750-Std .....  
 TD6-4G .....C.....T.....T.....  
 CoaV750 .....A.....  
 L695121.05 .....T.....T.....  
 TNM771K .....T.....A.....  
 MSI-7 .....T.....A.....  
 Kern217 .....T.....A.....  
 CoaV608 .....T.....A.....  
 TBH-28 .....T.T.....  
 VR1265 .....T.....  
 CoaV353 .....

BFS1750 .....  
 1750-Std .....  
 TD6-4G .....  
 CoaV750 .....  
 L695121.05 .....N.....  
 TNM771K .....  
 MSI-7 .....  
 Kern217 .....  
 CoaV608 .....  
 TBH-28 .....  
 VR1265 .....C.....  
 CoaV353 .....  
  
 BFS1750 .....  
 1750-Std .....  
 TD6-4G .....  
 CoaV750 .....  
 L695121.05 .....  
 TNM771K .....  
 MSI-7 .....  
 Kern217 .....  
 CoaV608 .....  
 TBH-28 .....  
 VR1265 .....  
 CoaV353 .....