

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 537**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2011 PCT/US2011/066392**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.07.2012 WO2012092054**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2011 E 11813620 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2659007**

54 Título: **Procedimientos para identificar y diferenciar componentes víricos de vacunas multivalentes contra la fiebre del transporte**

30 Prioridad:
27.12.2010 US 201061427404 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.05.2017

73 Titular/es:
**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:
**WEISE, DALE, WADE y
HARRIS, JAMES, ROBERT**

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 613 537 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

Procedimientos para identificar y diferenciar componentes víricos de vacunas multivalentes contra la fiebre del transporte

Campo técnico

- 5 La presente divulgación se refiere en general al campo de la biología molecular, y más específicamente a procedimientos de diagnóstico de laboratorio clínico veterinario. En particular, se proporciona un procedimiento, composiciones para la identificación, amplificación, cuantificación y/o detección de segmentos de ácido nucleico, procedentes de especies, tipos y/o subtipos de virus específicos, incluyendo las especies implicadas como agentes causantes o contribuidores en el complejo de la enfermedad respiratoria bovina (BRDC, *bovine respiratory disease complex*). En particular, se desvelan procedimientos para identificar el virus de la diarrea vírica bovina (BVDV) 1b.

Descripción de la técnica relacionada

"Fiebre del transporte"

- 15 La "fiebre del transporte" es una expresión dada a un síndrome septicémico agudo, muy contagioso, en ganado y ovejas que se caracteriza clínicamente por fiebre, inflamación aguda de las vías respiratorias, secreción nasal, anorexia, depresión, neumonía fibrosa y necrosis de los tejidos infectados. Más frecuentemente encontrada en lotes de alimentos después del transporte, la fiebre del transporte es la causa principal de muerte entre el ganado joven y es responsable de una pérdida anual estimada en la industria de más de medio billón de dólares. Sólo en 1991, se estimó que la fiebre del transporte costaba a la industria del ganado de Estados Unidos casi 624 millones de dólares, debido principalmente a los costes de tratamiento, a la pérdida de producción y a la muerte.
- 20 La patogénesis de la fiebre del transporte se considera generalmente que está implicada en influencias externas adversas que predisponen al animal a una infección respiratoria vírica inicial, que, a su vez, produce condiciones favorables para la proliferación de una o más infecciones bacterianas secundarias.

Complejo (BRDC) de la enfermedad respiratoria bovina (BRD)

- 25 El BRDC (con frecuencia comúnmente denominado "fiebre del transporte") es un complejo de enfermedad multifactorial que frecuentemente afecta a sistemas intensivos de cría y engorde de terneros en canales comerciales y al pasto o lote de alimento de destino. Se caracteriza por infección secuencial o simultánea concomitante causada por patógenos tanto víricos como bacterianos, el BRDC es una causa principal de pérdida económica en la industria del ganado vacuno y lácteo.

- 30 La enfermedad, que infecta al ganado de todas las edades (incluyendo terneros lactantes), se caracteriza por respiración rápida, tos, depresión, pérdida de apetito, secreción ocular y nasal y temperatura elevada. En un brote agudo, la muerte puede producirse 24 horas después de la aparición de los síntomas. Los terneros que presentan depresión tendrán las orejas descolgadas, la cabeza agrandada, el lomo arqueado y/o con frecuencia se auto aíslan del resto del ganado. Dado que la salud de los terneros se deteriora progresivamente, dejan de alimentarse, muestran una tasa respiratoria aumentada y desarrollan una fiebre intensa (típicamente en el intervalo de 40-42 °C).

- 35 En el BRDC al menos se han implicado cuatro patógenos víricos. Estos incluyen el herpesvirus bovino de tipo 1 (BHV-1) (el agente causante de la rinotraqueitis bovina infecciosa [RBI]), el virus paragripal bovino de tipo 3 (PI₃), una o más variantes genéticas del virus de la diarrea vírica bovina (BVDV), y el virus sinticial respiratorio bovino (BRSV).

- 40 Después de producirse la infección vírica, los animales afectados desarrollan una o más infecciones bacterianas posteriores (por ejemplo, *Mannheimia* [anteriormente *Pasteurella*] *haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni* (anteriormente *Haemophilus somnus*), *Actinomyces pyogenes*, y diversos *Mycoplasma* spp.) que a menudo se manifiestan en neumonía aguda.

Virus de la diarrea vírica bovina (BVDV, *Bovine Viral Diarrhea Virus*)

- 45 El BVDV se reconoce ahora como un agente etiológico importante en el BRDC. Propagado a través de un rebaño por vía fecal-oral, el virus causa infecciones agudas (que incluyen diarrea, fiebre y síndrome hemorrágico) y puede atravesar la placenta de las hembras de ganado en gestación, lo que a menudo produce el nacimiento de terneros persistentemente infectados (PI) que son inmunotolerantes al virus y persistentemente virémicos durante el resto de sus vidas. Los bóvidos PI normalmente representan el mayor reservorio del virus; estos animales están muy predispuestos a infecciones ocasionadas por microorganismos que causan neumonía o enfermedad entérica, y proporcionan los reservorios víricos necesarios para epidemias de enfermedades mucosas (MD) letales en ganado (véase, por ejemplo, Liess y col., 1974; Barber y col., 1985; Olafson y col., 1946; Ramsey y col., 1953; Malmquist, 1968; y Ross y col., 1986).

Los virus de la diarrea vírica bovina son un grupo de virus dispar que puede clasificarse tanto fenotípicamente (véase, por ejemplo, Baker, 1995) (citopáticos o no citopáticos) como genotípicamente (véase, por ejemplo, Ridpath

y col., 1994; Vilcek y col., 2001; y Flores y col., 2002). El establecimiento de inmunidad protectora contra el BVDV en la ganadería ha sido problemático por diversas razones. Al igual que en algunas otras enfermedades mediadas por virus, los niveles de anticuerpos en suero contra el BVDV no se correlacionan necesariamente con protección contra la enfermedad. El establecimiento de inmunidad protectora en terneros lactantes presenta obstáculos adicionales ya que los anticuerpos maternos contra el BVDV pueden agotar el inmunógeno inyectado y neutralizar de un modo eficaz la vacuna.

Un estudio de Fulton y col. (2006) evaluó 21.743 terneros que se incorporaban en comederos en los Estados Unidos y determinaron que 88 terneros estaban persistentemente infectados (PI) con BVDV. De los 88 terneros PI, el 77,9 % estaban infectados con BVDV-1b; solo el 11,6 % estaban infectados con BVDV-1a, y solo el 10,5 % lo estaban con BVDV-2a.

Breve resumen de la invención

La presente divulgación supera estas y otras limitaciones intrínsecas en la técnica anterior proporcionando favorablemente un procedimiento para detectar secuencias de nucleótidos específicas de virus en una población de polinucleótidos en una muestra, u obtenida de una muestra, y particularmente muestras de origen biológico o veterinario. La presente invención también supera deficiencias en la técnica en otra realización proporcionando favorablemente procedimientos para detectar específicamente una partícula de virus BVDV1b vivo de entre dos o más poblaciones de polinucleótidos genéticamente relacionadas, incluyendo, por ejemplo, ácidos nucleicos obtenidos de dos o más especies, cepas, tipos o subtipos de virus genéticamente relacionados. En el presente documento se desvelan cebadores de amplificación oligonucleotídicos específicos y sondas de detección oligonucleotídicas marcadas (así como kits de ensayo de diagnóstico que los contienen), para diferenciar entre polinucleótidos específicos con los subtipos genéticos conocidos de BVDV (por ejemplo, Tipo 1a, Tipo 1b y Tipo 2) y para identificar y cuantificar cada componente vírico presente en una población polivalente de partículas víricas.

En el presente documento se desvelan pares de cebadores de amplificación y sondas de detección oligonucleotídicas marcadas, así como procedimientos para el uso de dichas composiciones en varias realizaciones para la preparación de sistemas altamente sensibles, de detección específica de virus, que pueden aprovecharse para determinar con mayor precisión la fuerza de un virus vivo modificado (VVM) individual en formulaciones de vacunas multivalentes, incluyendo, por ejemplo, una vacuna hexavalente contra la fiebre del transporte de los documentos US 9238843 y US 2013/0280294.

También se desvelan artículos de fabricación, incluyendo kits de diagnóstico que contienen dichos cebadores y sondas específicos de virus. Los análisis rápidos y la sensibilidad aumentada proporcionados usando ensayos cuantitativos (y en particular, cuantitativos en tiempo real) de reacción en cadena de la polimerasa (cPCR), que emplean las composiciones desveladas en el presente documento (particularmente cuando se usan junto con uno o más marcadores detectables, incluyendo, por ejemplo, metodologías de detección fluorogénicas y cromogénicas, tales como sistemas de detección basados en transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET, del inglés *fluorescence resonance energy transfer*)), ilustran justo dos de las muchas ventajas que la invención puede ofrecer al entorno de laboratorio clínico veterinario.

En el presente documento se desvela una composición que incluye al menos un cebador de amplificación oligonucleotídico específico de virus; al menos un segundo cebador de amplificación oligonucleotídico específico de virus; y al menos una primera sonda de detección específica de virus, marcada, adecuados para realizar un ensayo de amplificación/detección basado en PCR en una población de polinucleótidos.

Como se indica en el presente documento, dichas sondas de detección específicas de virus que incluyen preferentemente al menos un marcador detectable, incluyen, pero sin limitación, uno o más radicales radioactivos o marcados con spin, fluorogénicos, cromogénicos, o cualquier combinación de los mismos.

Adicionalmente, en el presente documento se desvela una composición para su uso en la detección de una o más secuencias de ácido nucleico específicas de virus en una muestra acuosa. Preferentemente la muestra es una muestra de origen biológico (incluyendo, sin limitación, células, tejidos, sangre, plasma, suero y cualquier combinación de los mismos) o una composición farmacéutica, de diagnóstico o de laboratorio o una formulación que se sabe que contiene, o que se sospecha que contiene, uno o más ácidos nucleicos específicos de virus. Preferentemente, dicha composición es una formulación de vacuna de mamífero, o una composición inmunogénica capaz de suscitar una respuesta inmunitaria en una o más especies de ganado de mamíferos.

Preferentemente, dichas composiciones incluyen uno o más cebadores de amplificación directos, y uno o más cebadores de amplificación inversos que se hibridan específicamente con, y facilitan la amplificación dependiente de polimerasa, una secuencia de ácido nucleico que es específica para una o más especies, cepas, tipos y/o subtipos de virus patógenos bovinos.

Adicionalmente, en el presente documento se desvelan kits de ensayo de diagnóstico y/o molecular, como se describe con mayor detalle en el presente documento, que contienen una o más de las composiciones anteriormente mencionadas, preferentemente adecuados para realizar una reacción en cadena de la polimerasa para amplificar una secuencia de ácido nucleico específica de virus de una muestra que comprende una vacuna de uso veterinario,

de virus vivo modificado, en condiciones apropiadas para producir una pluralidad de segmentos de ácido nucleico amplificados mediante PCR que son detectables y/o cuantificables usando una o más sondas de detección oligonucleotídicas marcadas adecuadas, incluyendo, sin limitación, las secuencias sonda descritas e ilustradas en el presente documento.

5 En el presente documento también se desvela el uso de una o más de dichas composiciones en la fabricación de un artículo para amplificar y/o detectar uno o más polinucleótidos específicos de virus en una población de polinucleótidos obtenida de una muestra biológica. En realizaciones ilustrativas, dicho uso incluye la amplificación, detección y/o cuantificación de una o más partículas de BVDV, y preferentemente una o más de dichas partículas de virus que están comprendidas con un VVM. El uso se demuestra para dichas composiciones en la amplificación, 10 detección y cuantificación de polinucleótidos específicos de BVDV de Tipo 1b y de Tipo 2 de una pluralidad de partículas de virus vivos atenuados comprendida dentro de una vacuna multivalente contra la fiebre del transporte bovino. Utilizando combinaciones de sonda/cebador que son específicas para diversas especies, cepas, tipos o subtipos de virus, los procedimientos de la invención pueden emplearse adicionalmente en la caracterización de fuerzas de vacunas, y particularmente en vacunas polivalentes para animales, tales como las que son preventivas para enfermedades tales como BRDC y fiebres relacionadas con el transporte que tienen agentes etiológicos de 15 origen vírico conocido.

En un sentido global y general, se desvelan procedimientos que permiten la detección rápida, precisa y fácil de polinucleótidos específicos de virus de poblaciones de polinucleótidos, y en particular, de formulaciones de vacunas multivalentes eficaces en la prevención, tratamiento, control y/o mejora de uno o más síntomas de enfermedades multifactoriales (y, particularmente, enfermedades de orígenes multietiológicos), tales como BRDC y fiebres relacionadas con el transporte. Dicho procedimiento generalmente implica realizar al menos una etapa de ciclado, comprendiendo dicha etapa de ciclado al menos una primera etapa de amplificación y al menos una primera etapa de hibridación, y en el que la al menos una primera etapa de amplificación comprende poner en contacto la muestra con una composición de sonda/cebador como se desvela en el presente documento, para producir un producto de 20 amplificación específico de virus si en la muestra está presente una molécula de ácido nucleico específica de virus, en el que la al menos una primera etapa de hibridación comprende poner en contacto la muestra con la composición; y poner en contacto el producto de amplificación así producido con al menos una primera sonda de detección oligonucleotídica marcada en condiciones eficaces para detectar específicamente el producto de hibridación resultante. El par de cebadores de amplificación específico de virus comprende: un primer cebador de amplificación oligonucleotídico de menos de aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, que comprende, consta esencialmente de, o como alternativa, consta de, una secuencia de ácido nucleico seleccionada de una o más de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, y SEQ ID NO: 16; y un segundo cebador de amplificación oligonucleotídico de menos de aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, que comprende, consta esencialmente de, o como alternativa, consta de, una secuencia de ácido nucleico 30 seleccionada de una o más de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 17.

La composición puede comprender adicionalmente al menos una primera sonda de detección específica de virus marcada. Dichas sondas de detección tienen preferentemente una longitud de menos de aproximadamente 50 nucleótidos, y comprenden, constan esencialmente de, o como alternativa, constan de, una secuencia de ácido nucleico seleccionada de una o más de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 18. 40

La primera etapa de ciclado incluye preferentemente poner en contacto la población de polinucleótidos con un par de cebadores de amplificación específicos de virus para producir un producto de amplificación cuando una molécula de ácido nucleico específica de virus está presente en la población de polinucleótidos, y adicionalmente en el que la al menos una primera etapa de hibridación comprende poner en contacto la población de polinucleótidos con al menos una primera sonda de detección específica de virus marcada en condiciones eficaces para detectar el producto de amplificación así producido. La etapa de detección puede realizarse en tiempo real, y opcionalmente además puede incluir la etapa adicional de determinar la temperatura de fusión entre la sonda de detección específica de virus y el producto de amplificación vírico. 45

Más específicamente, se proporciona un procedimiento para detectar la presencia de una partícula de virus BVDV1b (virus de la diarrea vírica bovina de Tipo 1b) vivo, comprendiendo el procedimiento detectar un polinucleótido específico de BVDV1b en una población de polinucleótidos obtenida de una pluralidad de partículas de virus contenida en una muestra mediante las siguientes etapas: 50

- (A) Diluir la muestra en (i) una placa de ensayo que contenga células bovinas cultivadas en la que las partículas de virus puedan replicarse y (ii) una placa de referencia sin células;
- (B) Realizar al menos una etapa de ciclado de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real en la placa de ensayo y en la placa de referencia usando una composición que comprenda un primer cebador de amplificación oligonucleotídico específico de virus de menos de 50 nucleótidos de longitud que comprenda una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, un segundo cebador de amplificación oligonucleotídico específico de virus de menos de 50 nucleótidos de longitud que comprenda una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 y al menos una primera sonda de detección marcada específica de virus de menos de 50 nucleótidos de longitud 60

que comprenda una secuencia de nucleótidos marcada de SEQ ID NO: 3,

en el que el primer cebador de amplificación y el segundo cebador de amplificación producen un producto de amplificación específico de virus,

5 en el que el producto de amplificación así producido se pone en contacto con al menos la primera sonda de detección marcada en condiciones eficaces para detectar específicamente el producto de hibridación resultante, y en el que la detección del producto de hibridación resultante en la placa de ensayo, a un nivel más alto en comparación con el de la placa de referencia, indica la presencia del polinucleótido específico de BVDV1b de una partícula de virus de BVDV1b vivo.

10 Preferentemente, la población de polinucleótidos se obtiene a partir de una pluralidad de partículas de virus vivos, atenuados.

Además, preferentemente, la población de polinucleótidos se obtiene a partir de una pluralidad de partículas de virus vivos, atenuados, contenidas dentro de una vacuna de mamíferos.

Incluso adicionalmente de un modo preferido, la vacuna de mamíferos es una vacuna contra el complejo de la enfermedad respiratoria bovina (BRDC) o fiebre del transporte.

15 **Procedimientos y composiciones para la determinación de la fuerza de la vacuna**

Se desvela un procedimiento de identificación de secuencias polinucleotídicas de BVDV1b específicas de virus en una muestra de VVM, tal como las presentes en una vacuna para animales. La invención también proporciona un procedimiento para detectar específicamente, en una muestra, secuencias polinucleotídicas de BVDV1b específicas de virus, y particularmente en una vacuna para mamífero, o en un espécimen de procedencia biológica o veterinaria
20 obtenido de un bóvido, así como de un candidato de vacuna. Los procedimientos desvelados utilizan preferentemente composiciones y kits con pares de cebadores oligonucleotídicos y sondas oligonucleotídicas marcadas, y particularmente aquellos que comprenden una o más de las secuencias desveladas en el presente documento, para detectar productos de amplificación de PCR, marcando los productos de amplificación resultantes con un cebador hibridado, y cuantificando dichos productos de amplificación usando uno o más ensayos basados en
25 PCR, cPCR, RT-cPCR y PCR/FRET, particularmente en combinación con análisis posteriores de curvas de fusión (por ejemplo, C_T).

El procedimiento de la invención es adecuado para detectar la presencia o la ausencia de un polinucleótido específico de BVDV1b. En determinados aspectos, una o más muestras biológicas pueden extraerse de un individuo (por ejemplo, una formulación de vacuna, o una muestra biológica obtenida de ganado doméstico), y explorar para
30 determinar la presencia de dicha secuencia. En realizaciones particulares, la formulación de vacuna o la muestra biológica puede explorarse para determinar la presencia de un polinucleótido específico de BVDV1b.

El proceso de la PCR es muy conocido por los expertos habituales en la técnica de biología molecular (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 4.683.195 y 4.683.202). En la PCR, la extensión de cebadores dependiente de molde, está catalizada por un agente polimerizante en presencia de cantidades adecuadas de cuatro desoxirribonucleótidos trifosfatados (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) en un medio de reacción que comprende sales, cationes metálicos y un sistema de tampón de pH apropiados. Los agentes polimerizantes adecuados son enzimas que se sabe que catalizan la síntesis de ADN dependiente de molde. Por ejemplo, si el molde es ARN, un agente polimerizante adecuado para transformar el ARN en una secuencia de ADN complementaria (ADNC) es la transcriptasa inversa (RT, *reverse transcriptase*), tal como la RT del virus de la mieloblastosis aviar. Como se indica
40 en la patente de Estados Unidos n.º 5.614.388 (incorporada específicamente en el presente documento en su totalidad por referencia expresa en la misma), si la diana para la amplificación es ADN, las polimerasas adecuadas incluyen, sin limitación, la ADN polimerasa I de *E. coli* o su fragmento Klenow, la ADN polimerasa de T₄ y la Taq polimerasa (una ADN polimerasa termoestable aislada del microorganismo, *Thermus aquaticus*). La última enzima, conocida como "Taq polimerasa", se usa ampliamente en la amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos, y las
45 condiciones de reacción para el uso de dichas polimerasas son muy conocidas por los expertos habituales en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook and Russell, 2001). En una realización preferida del proceso de la PCR, la reacción está catalizada por una enzima de ADN polimerasa termoestable, tal como la ADN polimerasa de Taq, y se realiza a una temperatura elevada. La temperatura preferida es una en la cual la enzima es termoestable, y en la cual los ácidos nucleicos están en un equilibrio de cadenas sencillas y dobles, de tal manera que será suficiente que
50 el cebador se hibride con cadenas molde para permitir una tasa de polimerización razonable. La preparación de las cadenas se realiza calentando la reacción a una temperatura suficientemente alta durante un tiempo suficiente, para producir la desnaturalización del dúplex, pero sin producir una desnaturalización irreversible de la polimerasa.

En una aplicación particular, el procedimiento de la invención emplea favorablemente una etapa de amplificación por PCR cuantitativa en tiempo real, y preferentemente, al menos una primera etapa de amplificación basada en PCR
55 cuantitativa, que generalmente implica realizar al menos una etapa de ciclado (que incluye al menos una primera etapa de "amplificación" y al menos una primera etapa de "hibridación"). Esta etapa de amplificación incluye poner en contacto la muestra con un par de cebadores oligonucleotídicos específicos de virus para producir un producto de amplificación si en la muestra existe originalmente un polinucleótido diana vírico. (Por el contrario, si en la muestra

no existe originalmente ningún polinucleótido diana vírico, entonces no se produce ningún producto de amplificación específico durante el proceso de la PCR).

La etapa de hibridación incluye típicamente poner en contacto la muestra resultante de la etapa de amplificación con una o más sondas oligonucleotídicas marcadas que se hibridan específicamente (es decir, se unen con) el producto de amplificación así producido. En los casos de análisis de FRET, la sonda de detección puede comprender un primer y un segundo miembro de un par de sondas de detección, compatibles con FRET, oligonucleotídicas específicas de virus (incluyendo, por ejemplo, los pares compatibles con FRET que se hibridan con el producto de amplificación con no más de aproximadamente cuatro o cinco nucleótidos entre sí. En el caso de análisis FRET, la primera sonda del par de sondas de detección se marca típicamente con un radical fluorescente donador y una segunda sonda del par de sondas de detección se marca típicamente con un radical fluorescente aceptor correspondiente. Estas sondas de detección y el tipo de radicales que pueden unirse operativamente a las mismas para su uso en la etapa de hibridación, se han descrito con más detalle anteriormente en el presente documento.

El procedimiento también comprende adicionalmente al menos, la etapa de detectar la presencia o la ausencia del híbrido, producto de amplificación:sonda, usando un marcador adecuado (y típicamente uno que está unido operativamente a la sonda), en el que la presencia de una señal procedente de la sonda marcada es normalmente indicativa de la presencia del polinucleótido diana en la muestra. Por el contrario, en ausencia de un producto de amplificación producido, después de la etapa de hibridación de la sonda, se obtiene una señal sustancialmente no detectable, por lo tanto indicativa de la ausencia del polinucleótido diana en la población de secuencias de ácido nucleico originalmente presentes en la muestra analizada.

En determinadas realizaciones, las etapas de amplificación y detección pueden realizarse en tiempo real, y opcionalmente el procedimiento puede incluir adicionalmente una etapa de cuantificación o analítica adicional (incluyendo, por ejemplo, la determinación de la temperatura de fusión entre una o más sondas de detección y el correspondiente producto de amplificación para cuantificar o caracterizar adicionalmente la secuencia diana derivada de virus (si está presente) en la muestra analizada.

El proceso de determinar la temperatura de fusión entre una sonda y su diana correspondiente generalmente implica lo siguiente: un producto de amplificación por PCR y una o más sondas de detección correspondientes se refrigeran a aproximadamente 40 °C para facilitar el emparejamiento de una o más sondas con la secuencia o secuencias complementarias del producto o productos de amplificación por PCR diana. Una vez que la sonda, o las sondas, marcada(s) se ha(n) puesto en contacto con la mezcla de reacción en condiciones eficaces para emparejar la sonda o las sondas con el producto de PCR diana (si está presente), el marcador detectable (por ejemplo, fluoróforos, etc.) se detecta después (y posteriormente se cuantifica) usando técnicas convencionales conocidas por los expertos habituales en la materia de la biología molecular.

La detección de ácidos nucleicos es muy conocida por los expertos habituales en la materia y puede realizarse a través de la aplicación de numerosas estrategias. Estos procedimientos se basan generalmente en la detección de una etiqueta o un marcador, tal como cualquiera de las etiquetas o marcadores radiactivos, fluorescentes, biológicos o enzimáticos conocidos en la materia (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 y 4.366.241. Otros ejemplos de etiquetas detectables incluyen iones paramagnéticos, tales como cromo (III), manganeso (II), hierro (III), hierro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodimio (III), samario (III), iterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III), disprosio (III), holmio (III) y erbio (III), prefiriéndose particularmente el gadolinio. También pueden usarse radicales fluorescentes incluyendo, sin limitación, rodamina, fluoresceína y renografina, prefiriéndose particularmente enzimas que generan un producto con color después de ponerse en contacto con un sustrato cromogénico. También pueden usarse ligandos de unión secundarios (incluyendo, sin limitación, un anticuerpo secundario y/o una configuración de unión de ligandos de biotina/avidina), como saben los expertos habituales en la técnica de biología molecular.

Como se ha descrito anteriormente, como un marcador de una sonda oligonucleotídica puede usarse cualquier marcador siempre que cumpla los requisitos anteriormente mencionados e interaccione con un marcador específico de ácido nucleico. Como ejemplos se incluyen, pero sin limitación, LightCycler® RED 640, LightCycler® RED 705, TAMRA y Alexa 633. El marcador puede unirse a un oligonucleótido en cualquier posición siempre que la unión no influya en la hibridación del oligonucleótido. En aplicaciones particulares, el marcador está normalmente unido operativamente (es decir, conectado, fijado, unido, etc.) bien al extremo 5' o al 3' de la molécula de sonda oligonucleotídica.

Además de los oligonucleótidos específicamente expuestos en el presente documento, pueden diseñarse y sintetizarse otros ácidos nucleicos (por ejemplo, usando un programa informático tal como OLIGO [Molecular Biology Insights Inc., Cascade, CO, USA]) bien como cebadores de amplificación o como sondas de detección para su uso en los ensayos de fuerza de virus descritos en el presente documento. Típicamente, los cebadores y las sondas oligonucleotídicas(as) tienen una longitud de aproximadamente 7 u 8 a aproximadamente 60 u 80, más o menos, nucleótidos (por ejemplo, una longitud de aproximadamente 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, etc. nucleótidos). Un "cebador o cebadores específicos de virus", como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más cebadores oligonucleotídicos que se emparejan específicamente con la secuencia de ácido nucleico

presente dentro del genoma de un virus seleccionado particular, y que facilitan el inicio de la síntesis, a través de la polimerasa, de productos de amplificación de los mismos en condiciones apropiadas. Del mismo modo, una "sonda o sondas específicas de virus" se refiere a una o más sondas oligonucleotídicas que se emparejan específicamente con secuencias de ácido nucleico que están amplificadas por una polimerasa adecuada usando los pares de cebadores hibridados en condiciones apropiadas, y pueden detectarse, en serie, de manera simultánea, secuencial, y/o posteriormente (y, preferentemente, pueden cuantificarse) usando ensayos convencionales de detección de oligonucleótidos y de tipo similar.

Composiciones de oligonucleótidos

En el presente documento se desvelan sondas oligonucleotídicas y secuencias de cebadores específicas para polinucleótidos específicos de virus y productos de amplificación producidos a partir de las mismas, que son útiles en la hibridación con, y amplificación de, secuencias polinucleotídicas víricas homólogas correspondientes, y en particular con secuencias de partículas de virus vivos modificados, presentes en una vacuna animal. Se desvelan secuencias de cebadores oligonucleotídicos que son útiles en la detección y amplificación de cepas, tipos y subtipos genéticos particulares de secuencias de ácido nucleico específicas de BVDV.

Los cebadores y las sondas oligonucleótidos(as) desvelados en el presente documento se diseñan para la amplificación y detección selectiva de segmentos de ácidos nucleicos específicos de virus, y polinucleótidos específicos de BVDV (y productos de amplificación procedentes de los mismos) en particular. Las secuencias de cebadores desveladas son adecuadas para su uso en procedimientos de hibridación, y en procedimientos de amplificación de ADN, tales como los procedimientos de amplificación basados en PCRTM (incluyendo, por ejemplo, cPCR en tiempo real, RT-PCR, en análisis genéticos basados en RT-PCR/FRET). Del mismo modo, las sondas de detección oligonucleotídicas desveladas son adecuadas para el etiquetado con un medio de etiquetado apropiado para la detección y cuantificación de los productos resultantes de la amplificación de ácidos nucleicos usando uno o más pares de cebadores de amplificación específicos de virus desvelados en el presente documento.

Cuando se etiquetan con marcadores apropiados, las sondas de detección oligonucleotídicas son particularmente idóneas para la detección basada en fluorescencia, incluyendo, por ejemplo, análisis basados en PCR, PCR en tiempo real, PCR cuantitativa (cPCR), FRET y similares. Por ejemplo, las metodologías de detección etiquetadas con FRET son particularmente útiles en detección fluorimétrica basada en fluorimetría de microvolumen. El uso de uno o más de los pares de oligonucleótidos de detección y amplificación desvelados se contempla particularmente en las metodologías combinadas basadas en RT-PCRTM/ fluorimetría FRET de microvolumen (RT-PCRTM/FRET) y particularmente en análisis facilitados por el uso de instrumentos "LightCycler®" desarrollados por Idaho Technology, Inc. y ahora fabricados y comercializados por Roche Molecular Systems.

Se contempla que la longitud de las composiciones de sonda y cebador seleccionadas, tendrán, preferentemente, una longitud menor de aproximadamente 50 a 60, más o menos, y más preferentemente menor de aproximadamente 40 a 45, más o menos, nucleótidos, aunque otras sondas y cebadores desvelados en el presente documento pueden tener una longitud del orden de aproximadamente 30 a 35, más o menos, nucleótidos. En algunas realizaciones, la longitud de las secuencias de cebadores oligonucleotídicos seleccionados (por ejemplo, cebadores "directos" e "inversos") y/o la longitud de las secuencias de sondas de detección seleccionadas (por ejemplo, sondas de "anclaje" y "detectoras"), tendrán probablemente una longitud del orden de aproximadamente 20 a 30, más o menos, nucleótidos, aunque en algunos casos, los tamaños de las secuencias de sondas y cebadores particulares pueden ser más largos que estos, y del orden de aproximadamente 60 a 70 nucleótidos de longitud. Como alternativa, puede ser deseable emplear secuencias de sondas y/o cebadores más cortas, y como tal, los oligonucleótidos seleccionados para la práctica del procedimiento de la invención, pueden ser del orden de aproximadamente 15 a 20, más o menos, nucleótidos de longitud e incluso, en algunas realizaciones, ligeramente más cortas.

En el contexto de la presente solicitud, se entiende que se contemplan todas las longitudes de oligonucleótidos intermedias dentro de los diversos intervalos indicados en el presente documento. Para esta finalidad, los oligonucleótidos que tienen una "longitud menor de aproximadamente XX nucleótidos" incluyen todos los números enteros incluidos dentro del intervalo. Por ejemplo, los oligonucleótidos que tienen una "longitud menor de aproximadamente 60 nucleótidos" incluyen oligonucleótidos que tienen una longitud de 59, 58, 57, etc. a 4, 3, 2, o 1 nucleótido y cada uno está expresamente dentro del ámbito de la presente divulgación.

Los oligonucleótidos, como los desvelados en el presente documento, pueden sintetizarse mediante diversas estrategias convencionales conocidas por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Ozaki y col., 1992; Agrawal y col., 1990 o similares) usando metodologías convencionales, incluyendo química con fosforamidita (véase, por ejemplo, Beaucage e Iyer, 1992; las patentes de Estados Unidos n.º 4.980.460; 4.725.677; 4.415.732; 4.458.066; y 4.973.679; y similares). También pueden emplearse químicas alternativas, por ejemplo, resultantes de grupos estructurales no naturales, tales como fosforotioato, fosforamidato y similares, siempre que las eficacias de hibridación de los oligonucleótidos resultantes no se vean adversamente afectadas. Preferentemente, los oligonucleótidos están en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 120 nucleótidos de longitud; más preferentemente en el intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 100 nucleótidos de longitud, y más preferentemente aún, en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 80 nucleótidos de longitud,

aunque la secuencia y la longitud exactas de un oligonucleótido puede depender, entre otras cosas, de la naturaleza de la secuencia de ácido nucleico diana con la que se hibrida, dado que la localización de la unión y la longitud pueden modificarse para conseguir propiedades de emparejamiento y de fusión apropiadas para una realización particular. Pueden encontrarse pautas para preparar dichas elecciones de diseño en muchas de las referencias citadas anteriormente que describen los ensayos de "tipo Taqman®" empleados en el ejemplo, más adelante, y también descritas con detalle en Holland y col. (1991).

Cebadores de amplificación específicos de virus

En el presente documento se desvelan cebadores de amplificación directos e inversos para su uso en la amplificación de secuencias polinucleotídicas específicas de virus, y secuencias polinucleotídicas que codifican BVDV en específico, que comprenderán preferentemente, constarán esencialmente de, o como alternativa, constarán de, al menos aproximadamente 6 a al menos aproximadamente 25 (incluyendo cada número entero entre ellos) o más ácidos nucleicos contiguos de una cualquiera de las secuencias de cebadores oligonucleotídicos "directos" desvelados en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, o SEQ ID NO: 16 o las secuencias de cebadores oligonucleotídicos "inversos" desveladas en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, o SEQ ID NO: 17; o de secuencias oligonucleotídicas que tienen una identidad de al menos aproximadamente 90 % con una cualquiera de las secuencias de cebadores oligonucleotídicos "directos" desveladas en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, o SEQ ID NO: 16 o las secuencias de cebadores oligonucleotídicos "inversos" desvelados en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, o SEQ ID NO: 17; o incluso de secuencias de oligonucleótidos que tienen una identidad de al menos aproximadamente 95 % con una cualquiera de las secuencias de cebadores oligonucleotídicos "directos" desveladas en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, o SEQ ID NO: 16, o las secuencias de cebadores oligonucleotídicos "inversos" desveladas en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, o SEQ ID NO: 17.

Las secuencias de cebadores oligonucleotídicos de amplificación directa e inversa, desveladas en el presente documento, pueden comprender, constar esencialmente de, o como alternativa constar de, una cualquiera de las secuencias de cebadores oligonucleotídicos "directos" desveladas en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, o SEQ ID NO: 16 o las secuencias de cebadores oligonucleotídicos "inversos" desveladas en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, o SEQ ID NO: 17, aunque, como alternativa, puede ser deseable emplear secuencias de cebadores que constan esencialmente de una cualquiera de las secuencias de cebadores oligonucleotídicos "directos" desveladas en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, o SEQ ID NO: 16, o las secuencias de cebadores oligonucleotídicos "inversos" desveladas en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, o SEQ ID NO: 17, y aunque adicionalmente, como alternativa, puede ser deseable emplear secuencias de cebadores que constan de una cualquiera de las secuencias de cebadores oligonucleotídicos "directos" desveladas en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, o SEQ ID NO: 16, o las secuencias de cebadores oligonucleotídicos "inversos" desveladas en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, o SEQ ID NO: 17.

Las composiciones de cebadores de amplificación directos e inversos preferidas para la realización práctica de los procedimientos desvelados en el presente documento pueden comprender, constar esencialmente de, o como alternativa, constar de, una secuencia de ácido nucleico que representa una secuencia de ácido nucleico contigua de aproximadamente 6 a aproximadamente 25 (incluyendo cada número entero entre ellos) o más nucleótidos, como se desvela en una cualquiera de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

Del mismo modo, las composiciones de cebadores preferidas para la realización práctica de los procedimientos de amplificación desvelados en el presente documento pueden comprender, constar esencialmente de, o como alternativa, constar de, una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de aproximadamente 90 % con una secuencia de ácido nucleico contigua de aproximadamente 6 a aproximadamente 25 (incluyendo cada número entero entre ellos) o más nucleótidos, como se desvela en una cualquiera de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

Adicionalmente, las composiciones de cebadores de amplificación preferidas para la realización práctica de los procedimientos de amplificación desvelados en el presente documento pueden comprender, constar esencialmente de, o como alternativa, constar de, una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de al menos aproximadamente 95 % con una cualquiera de las secuencias oligonucleotídicas desveladas en una cualquiera de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

Las composiciones de cebadores preferidas para la realización práctica de los procedimientos desvelados en el presente documento pueden comprender, constar esencialmente de, o como alternativa, constar de, una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos aproximadamente de 6 a al menos aproximadamente 25 (de nuevo incluyendo cada número entero entre ellos) o más ácidos nucleicos contiguos seleccionados de una cualquiera de las secuencias de oligonucleótidos desveladas en una cualquiera de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17; o pueden constar esencialmente de una secuencia de oligonucleótidos que tiene una identidad de al menos aproximadamente 90 % con una cualquiera de las secuencias de oligonucleótidos desveladas en una cualquiera de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17; o incluso pueden constar esencialmente de una secuencia de oligonucleótidos que tiene una identidad de al menos aproximadamente 95 % con una cualquiera de las secuencias de oligonucleótidos desveladas en una cualquiera de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

Los cebadores de amplificación ilustrativos desvelados en el presente documento tienen una longitud de al menos aproximadamente 50 nucleótidos y comprenden, constan esencialmente de, o constan de una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos como se desvela en una cualquiera de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

Los cebadores de amplificación ilustrativos desvelados en el presente documento tienen una longitud de al menos aproximadamente 40 nucleótidos y comprenden, constan esencialmente de, o constan de una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos como se desvela en una cualquiera de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

Los cebadores de amplificación ilustrativos desvelados en el presente documento tienen una longitud de al menos aproximadamente 30 nucleótidos y comprenden, constan esencialmente de, o constan de una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos como se desvela en una cualquiera de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

Los cebadores de amplificación ilustrativos como se desvelan en el presente documento tienen una longitud de al menos aproximadamente 25 nucleótidos y comprenden, constan esencialmente de, o constan de una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos como se desvela en una cualquiera de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17, aunque en otros aspectos, los cebadores de amplificación ilustrativos como se desvela en el presente documento tienen una longitud de al menos aproximadamente 20 nucleótidos más o menos, y comprenden, constan esencialmente de, o constan de una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos como se desvela en una cualquiera de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

En ejemplos ilustrativos particulares, las composiciones de cebadores oligonucleotídicos como se desvela en el presente documento tienen una longitud de menos aproximadamente 50 nucleótidos y comprenden la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17, aunque en otros ejemplos ilustrativos, las composiciones de cebadores oligonucleotídicos como se desvela en el presente documento tienen una longitud de menos de aproximadamente 40 nucleótidos y comprenden la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17, y en otros ejemplos aún, las composiciones de cebadores oligonucleotídicos como se desvela en el presente documento tienen una longitud de menos de aproximadamente 30 nucleótidos y comprenden la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

En la práctica de los procedimientos desvelados en el presente documento, puede ser deseable emplear composiciones de cebadores oligonucleotídicos que tengan una longitud de menos de aproximadamente 45 más o menos nucleótidos y que consten esencialmente de la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17, o composiciones que tengan una longitud de menos de aproximadamente 35 más o menos nucleótidos y que consten esencialmente de la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ

ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17, aunque en otros ejemplos aún, puede ser deseable emplear composiciones de cebadores oligonucleotídicos que tengan una longitud de menos de aproximadamente 25 más o menos nucleótidos y que consten esencialmente de la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, o SEQ ID NO: 17.

Sondas de detección específicas de virus

Las sondas oligonucleotídicas para su uso en las secuencias polinucleotídicas específicas de virus (y en específico, secuencias polinucleotídicas específicas de BVDV) usando análisis RT-qPCR™ como se describe en el presente documento, comprenderán preferentemente al menos de aproximadamente 6 a al menos aproximadamente 25 (incluyendo cada número entero entre ellos) o más ácidos nucleicos contiguos de una cualquiera de las secuencias sonda oligonucleotídicas desveladas en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 18; o de secuencias oligonucleotídicas que tienen una identidad de al menos aproximadamente 90 % con una cualquiera de las secuencias sonda de detección oligonucleotídicas desveladas en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 18; o incluso de secuencias oligonucleotídicas que tienen una identidad de al menos aproximadamente 95 % con una cualquiera de las secuencias sonda oligonucleotídicas desveladas en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 18.

Las sondas de detección oligonucleotídicas preferidas, como se desvela en el presente documento, pueden comprender, constar esencialmente de, o como alternativa, constar de, una cualquiera de las secuencias sonda oligonucleotídicas desveladas en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 18, aunque, de manera alternativa, puede ser deseable emplear segmentos de ácido nucleico de sondas de detección que constan esencialmente de uno cualquiera de los oligonucleótidos como se desvela en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 18, y al mismo tiempo, aun adicionalmente como alternativa, puede ser deseable emplear secuencias sonda que constan de una cualquiera de las secuencias oligonucleotídicas desveladas en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 18.

Cuando se emplea análisis FRET para detectar los productos de amplificación producidos de este modo, las sondas de detección desveladas en el presente documento comprenderán preferentemente un par de sondas, siendo la primera de ellas una sonda de “anclaje” y la segunda una sonda “detectora”.

Las composiciones de sondas, preferidas para la realización práctica de los procedimientos desvelados en el presente documento, pueden comprender, constar esencialmente de, o como alternativa, constar de, un par de sondas de detección, cuyo primer y segundo miembros pueden constar de una secuencia de ácido nucleico que representa una secuencia de ácido nucleico contigua de aproximadamente 6 a aproximadamente 25 (incluyendo cada número entero entre ellos) o más nucleótidos, como se desvela en una cualquiera de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 18.

Del mismo modo, las composiciones de sondas, preferidas para la realización práctica de los procedimientos de detección basados en FRET, pueden comprender, constar esencialmente de, o como alternativa, constar de, un par de sondas de detección, cuyo primer miembro puede constar de una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de aproximadamente 80 %, de al menos aproximadamente 81 %, de al menos aproximadamente 82 %, de al menos aproximadamente 83 %, de al menos aproximadamente 84 % o de al menos aproximadamente 85 % con una secuencia de ácido nucleico contigua de aproximadamente 6 a aproximadamente 25 (incluyendo cada número entero entre ellos) o más nucleótidos, como se desvela en una cualquiera de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 18, mientras que el segundo miembro de este par de sondas de detección puede comprender preferentemente, constar esencialmente de, o como alternativa constar de, una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de al menos 90 %, de al menos aproximadamente 91 %, de al menos aproximadamente 92 %, de al menos aproximadamente 93 %, de al menos aproximadamente 94 % o de al menos aproximadamente 95 %, con una secuencia de ácido nucleico contigua de aproximadamente 6 a aproximadamente 25 (incluyendo cada número entero entre ellos), o más nucleótidos como se desvela en una cualquiera de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 18.

Adicionalmente, cuando se desean análisis basados en FRET de los productos de amplificación, las sondas oligonucleotídicas preferidas para la realización práctica de los procedimientos desvelados en el presente documento pueden comprender, constar esencialmente de, o como alternativa constar de, un par de sondas de detección FRET, cuyo primer y segundo miembros pueden comprender secuencias de ácido nucleico que tienen una identidad de al menos aproximadamente 95 %, de al menos aproximadamente 96 %, de al menos aproximadamente 97 % o de al menos aproximadamente 98 % o 99 % con una cualquiera de las secuencias de oligonucleótidos desveladas en una cualquiera de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 18. Como alternativa, las composiciones de sondas preferidas para la realización práctica de los procedimientos desvelados en el presente documento pueden comprender, constar esencialmente de, o como alternativa, constar de, un par de sondas FRET de anclaje/detectoras, cuyos primer y segundo miembros

pueden constar esencialmente de una secuencia de ácido nucleico que tenga al menos de aproximadamente 6 a al menos aproximadamente 25 (incluyendo cada número entero entre ellos) o más ácidos nucleicos contiguos, seleccionados de una cualquiera de las sondas oligonucleotídicas desveladas en una cualquiera de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 18; o pueden constar esencialmente de una secuencia oligonucleotídica que tenga una identidad de al menos aproximadamente 90 %, con una cualquiera de las secuencias oligonucleotídicas desveladas en una cualquiera de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 18; o incluso pueden constar esencialmente de una secuencia oligonucleotídica que tenga una identidad de al menos aproximadamente 95 %, de al menos aproximadamente 96 %, de al menos aproximadamente 97 %, o de al menos aproximadamente 98 % o 99 % con una cualquiera de las secuencias oligonucleotídicas desveladas en una cualquiera de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 18.

Las composiciones ilustrativas de sondas de detección oligonucleotídicas, específicas de productos de amplificación de virus, desveladas en el presente documento, tienen preferentemente una longitud de al menos aproximadamente 50 nucleótidos, más o menos, que comprenden, constan esencialmente de, o constan de, una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 18.

Las composiciones ilustrativas de sondas de detección desveladas en el presente documento son preferentemente oligonucleótidos de una longitud de al menos aproximadamente 40 nucleótidos, más o menos, que comprenden, constan esencialmente de, o constan de, una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 18.

Las composiciones de sondas de detección pueden ser oligonucleótidos con una longitud de al menos aproximadamente 30 nucleótidos, más o menos, que comprenden, constan esencialmente de, o constan de, una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 18, aunque, como alternativa, los oligonucleótidos de detección adecuados pueden tener una longitud de al menos aproximadamente 20 nucleótidos, más o menos, que comprenden, constan esencialmente de, o constan de, una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 18.

En ejemplos ilustrativos particulares, las composiciones de sondas de detección oligonucleotídicas desveladas en el presente documento tienen una longitud de al menos aproximadamente 50 nucleótidos, más o menos, y comprenden la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 18, aunque en otros ejemplos ilustrativos, las composiciones de sondas de detección oligonucleotídicas tienen una longitud menor de aproximadamente 40 nucleótidos y comprenden la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 18.

En otras aplicaciones, las sondas de detección oligonucleotídicas adecuadas pueden tener una longitud menor de aproximadamente 30 nucleótidos y pueden comprender una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 18.

Puede ser deseable emplear composiciones de sondas oligonucleotídicas en la realización práctica de los procedimientos desvelados en el presente documento, que tengan una longitud menor de aproximadamente 45 nucleótidos, más o menos, y que consten esencialmente de la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 18, o como alternativa, sondas oligonucleotídicas que tengan una longitud menor de aproximadamente 35 nucleótidos, más o menos, y que consten esencialmente de la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 18, aunque en otros ejemplos aún, puede ser deseable emplear composiciones de sondas de detección oligonucleotídicas que tengan una longitud menor de aproximadamente 25 nucleótidos, más o menos, y que consten esencialmente de la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 18.

Adicionalmente en el presente documento se desvelan sondas de detección y cebadores de amplificación específicos de virus que comprenden, constan esencialmente de, o constan de, secuencias de ácido nucleico que tienen preferentemente una identidad de al menos aproximadamente 80 %, de al menos aproximadamente 85 %, de al menos aproximadamente 90 %, de al menos aproximadamente 95 %, de al menos aproximadamente 96 %, de al menos aproximadamente 97 %, de al menos aproximadamente 98 %, o de al menos aproximadamente 99 % o más con una cualquiera o más de las secuencias oligonucleotídicas desveladas en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 18.

Aun adicionalmente, en el presente documento se desvelan conjuntos de cebadores y sondas diseñados basándose en su unión específica a una o más partes de un producto de amplificación específico de virus. Estas sondas y cebadores son particularmente útiles en un procedimiento para la detección e identificación rápida de secuencias

polinucleotídicas específicas de virus en una muestra biológica. En realizaciones particulares, estos procedimientos implican cuantificación en tiempo real, incluyendo, sin limitación, PCR cuantitativa (CPCR), PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR), y/o procedimientos de amplificación, detección y/o cuantificación basados en RT-PCR / transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET).

5 Descripción de realizaciones ilustrativas

PESTIVIRUS

Los *Pestivirus* causan enfermedades económicamente importantes en animales en todo el mundo. El género *Pestivirus*, dentro de la familia *Flaviviridae*, comprende tres especies de virus de ARN monocatenario de sentido positivo: el virus de la diarrea vírica bovina (BVDV), el virus de la fiebre porcina clásica (CSFV) y el virus de la enfermedad de la frontera (BDV). Recientemente, se ha identificado un cuarto grupo distinto de *Pestivirus*, que está genéticamente relacionado con el BVDV, y en la bibliografía recibe el nombre de virus de la diarrea vírica bovina de Tipo 2 (BVDV-2) (véase, por ejemplo, Thiel y col., 1996; y Becher y col., 1995). Por consiguiente, ahora los textos contemporáneos se refieren a la especie original del BVDV como "BVDV-1" para diferenciarla entre las dos especies.

La especie tipo de *Pestivirus* es el BVDV de Tipo 1 (BVDV-1), cuyo genoma tiene una longitud de aproximadamente 12,5 kb y contiene una fase de lectura abierta (ORF) grande (Collett y col., 1988, incorporado específicamente en el presente documento en su totalidad por referencia expresa en la misma). La ORF codifica una poliproteína grande de aproximadamente 450 kDa que se procesa, co-traduccionalmente y pos-traduccionalmente, por proteasas hospedadoras o víricas. El extremo N terminal de la poliproteína de BVDV convencional da como resultado una proteína no estructural p20 (Npro), una proteína de cápside p14 (C); glucoproteínas de envoltura gp48 (E0), gp25 (E1) y gp53 (E2); proteínas no estructurales p125 (NS23), p10 (NS4A), p32 (NS4B), p58 (NS5A) y p75 (NS5B) (véase, por ejemplo, Tautz y col., 1997; Xu y col., 1997; Elbers y col., 1996; y Wiskerchen y col., 1991). El BVDV-1 existe en dos biotipos, el citopático (denominado "cp") o no citopático ("ncp"), que típicamente se diferencian por la producción de un solo polipéptido de 80 kDa (proteína no estructural p80, NS3) en la variante citopática (véase, por ejemplo, Gillespie y col., 1960).

Basándose en análisis filogenéticos de diversos aislados del BVDV, se ha observado que el BVDV-1 comprende al menos 13 subgenotipos distintos (denominados BVDV-1a a BVDV-11), aunque se han identificado dos subgenotipos (BVDV-2a y BVDV-2b) para el BVDV-2 (véase, por ejemplo, Pellerin y col., 1994; Ridpath y col., 1994, y Xue y col., 2010).

En los últimos treinta años, se han comercializado cerca de ciento cincuenta vacunas para el BVDV, tanto de virus vivos modificados (VVM) como de virus atenuados inactivados o partículas de virus, en la industria del ganado con diversos grados de éxito; aún se comunican brotes de BVDV anualmente a pesar de la amplia disponibilidad y uso de formulaciones de vacunas comerciales. Las estrategias actuales para el control de la enfermedad implican la inoculación anual repetida con vacunas para el ganado y generalmente conlleva etapas adicionales en un intento para garantizar que no nazcan terneros como transportadores persistentemente infectados (PI). Se han desarrollado diversos procedimientos de ensayo diferentes para la detección del BVDV, y/o para la detección de animales infectados con BVDV, que incluyen la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), el inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA), las técnicas de aislamiento de virus convencionales y diversos ensayos inmunohistoquímicos.

40 ENSAYOS DE FUERZA VÍRICA

Uno de los principales obstáculos para certificar una vacuna determinada es, con frecuencia, el desarrollo de un ensayo de fuerza adecuado. Históricamente, el ensayo de fuerza del BVDV se ha realizado de acuerdo con el procedimiento de ensayo complementario para la titulación del virus de la diarrea vírica bovina en vacunas (SAM 101). Procedimientos tales como SAM101 utilizan antisuero monoespecífico neutralizante para neutralizar las fracciones del BHV, del PI₃ y del BRSV antes de la inoculación de una línea celular susceptible. Se observó el efecto citopático (ECP) de los cultivos y después se usó tinción directa con anticuerpo fluorescente (AF) y/o indirecta con AF (AFI) para determinar si un pocillo particular (dilución) era positivo o negativo para el BVDV de Tipo 1 o de Tipo 2. Después, en función de los pocillos que se determinó que eran positivos para ECP/AF, se calculó un título.

Sin embargo, procedimientos convencionales como estos, no son muy adecuados para diferenciar entre los subgenotipos del BVDV, principalmente debido a que existen anticuerpos para BVDV-1a, BVDV-1b y BVDV-2 que carecen de la especificidad necesaria para discriminar de manera precisa títulos individuales entre estos genotipos y subgenotipos.

Este problema puede superarse aprovechando las diferencias que existen en la región no traducida 5' del genoma de los *Pestivirus*. Estas diferencias se han usado para segregar a los *Pestivirus* en genotipos y subgenotipos (Paton, 1995; y Hofmann y col., 1994). Ridpath y Bolin (1998) indicaron un procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para diferenciar los virus BVDV-1a, BVDV-1b y BVDV-2. Los ensayos de PCR cuantitativa con transcripción inversa (RT-cPCR) se han vuelto cada vez más habituales en la biología humana, utilizándose para determinar la fuerza del virus del sarampión (Schalk y col., 2004); vacunas basadas en adenovirus (Wang y col.,

2005), vacunas basadas en rotavirus (Ranheim y col., 2006) y vacunas trivalentes contra las paperas, el sarampión y la rubeola (PSR) (Schalk y col., 2005).

5 En el documento US 2013/0280294, los autores de la presente invención indicaron el desarrollo de un protocolo de ensayo basado en modificaciones con ingeniería genética, útil para obtener una cuantificación vírica directa (es decir, "fuerza") de cada componente vírico individual en una vacuna multivalente. La invención sustituye ensayos con AF/AFI convencionales (tales como los descritos en el ensayo SAM 101 actual) con un ensayo de RT-cPCR para determinar la presencia o la ausencia de especies, tipos, o subtipos de virus particulares en pocillos de ensayo individuales (es decir, diluciones).

10 Los ensayos de fuerza para los componentes individuales de una vacuna multivalente, tal como la vacuna VVM hexavalente, descritos en el presente documento también pueden hacerse más objetivos sustituyendo los análisis de RT-cPCR/cPCR de pocillos individuales por observación visual del ECP (efecto citopático). Por ejemplo, la observación del ECP en ensayos de titulación de virus puede ser bastante subjetiva, y a menudo se considera que es fuente de diferencias en los títulos de vacunas VVM entre instalaciones donde se realizan ensayos. Sin embargo, al aumentar la objetividad del ensayo, también debería aumentar la reproducibilidad entre los laboratorios.

15 También pueden realizarse ensayos de fuerza para PI₃ (virus paragripal bovino de tipo 3) usando un procedimiento de ensayo complementario modificado para la titulación de vacunas contra virus paragripal 3 (MVSAM102.01). El ensayo de fuerza para el BRSV puede realizarse usando un procedimiento de ensayo complementario modificado para la titulación del virus sincitial respiratorio bovino en vacunas (MVSAM0129.01). Estos ensayos se modificaron sustituyendo los análisis de PCR cuantitativa en tiempo real de pocillos individuales por la observación visual del ECP. La titulación de la fracción de BHV se realizó usando un procedimiento de ensayo complementario modificado para la titulación del virus de la rinotraqueitis bovina infecciosa en vacunas (MVSAM0105.01). En este ensayo, puede usarse un formato de 96 pocillos en lugar del formato convencional de 6 pocillos para estandarizar los ensayos para análisis de vacunas multivalentes. Cabe destacar que, este protocolo incluye la sustitución de análisis cPCR de pocillos individuales por observación visual y el recuento de placas BHV para proporcionar un ensayo más preciso y contundente.

Amplificación de ácido nucleico

30 El ácido nucleico, usado como un molde para la amplificación, puede aislarse de virus o de células de acuerdo con metodologías convencionales (Sambrook y col., 1989). El ácido nucleico puede ser ADN genómico o ARN celular fraccionado o completo. Cuando se usa ARN, puede ser deseable convertir el ARN en ADN complementario. En una realización, el ARN es ARN celular completo, que se usa directamente como el molde para la amplificación.

35 Los pares de cebadores que se hibridan selectivamente con ácidos nucleicos correspondientes a polinucleótidos específicos de virus (o con regiones de flanqueo conservadas) se ponen en contacto con el ácido nucleico aislado en condiciones que permitan la hibridación selectiva. El término "cebador", como se define en el presente documento, significa que incluye cualquier ácido nucleico que sea capaz de iniciar (cebar) la síntesis de un ácido nucleico naciente en un proceso dependiente de molde. Típicamente, los cebadores son oligonucleótidos con una longitud de ocho o de diez a cuarenta, más o menos, pares de bases (pb), pero en determinadas realizaciones pueden emplearse secuencias más largas o más cortas. Pueden proporcionarse cebadores en forma mono o bicatenaria, aunque se prefiere la forma monocatenaria.

40 Una vez hibridado, el complejo ácido nucleico: cebador se pone en contacto con una o más enzimas que facilitan la síntesis de ácido nucleico dependiente de molde. Se realizan rondas de amplificación múltiples, también denominadas "ciclos", hasta que se produce una cantidad suficiente de producto de amplificación.

45 A continuación, se detecta el producto de amplificación. En determinadas solicitudes, la detección puede realizarse por medios visuales. Como alternativa, la detección puede implicar la identificación indirecta del producto mediante quimioluminiscencia, escintigrafía radioactiva de un radiomarcador o un marcador fluorescente incorporado o incluso mediante un sistema que utilice señales de impulso eléctrico o térmico.

Se dispone de diversos procesos dependientes de molde para amplificar las secuencias marcadoras presentes en una muestra molde determinada. Uno de los procedimientos de amplificación mejor conocido es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que se describe con detalle en las patentes de Estados Unidos n.º 4.683.195, n.º 4.683.202 y n.º 4.800.159).

50 En resumen, en la PCRTM, se preparan dos secuencias de cebadoresTM que son complementarias a regiones en cadenas complementarias opuestas de la secuencia marcadora. Se añade un exceso de desoxinucleósidos trifosfato a una mezcla de reacción junto con una ADN polimerasa, por ejemplo, *Taq* polimerasa. Si la secuencia marcadora está presente en una muestra, los cebadores se unirán al marcador y la polimerasa hará que los cebadores se extiendan a lo largo de la secuencia marcadora añadiendo nucleótidos. Aumentando y disminuyendo la temperatura de la mezcla de reacción, los cebadores extendidos se disociarán del marcador para formar productos de reacción, los cebadores en exceso se unirán al marcador y a los productos de reacción y el proceso se repite.

Para cuantificar la cantidad de ARNm amplificado puede realizarse un procedimiento de amplificación mediante PCR™ con transcriptasa inversa. Se conocen procedimientos de transcripción inversa de ARN en ADNc y se describen en Sambrook y col. (1989). Procedimientos alternativos para la transcripción inversa utilizan ADN polimerasas dependientes de ARN termoestables.

- 5 En la etapa de amplificación de la presente invención también pueden utilizarse procedimientos basados en ligamiento de dos (o más) oligonucleótidos en presencia de ácido nucleico que tiene la secuencia del "di-oligonucleótido" resultante, amplificando de este modo el di-oligonucleótido.

Después de cualquier amplificación, puede ser deseable separar el producto de amplificación del molde y del cebador en exceso con el fin de determinar si se ha producido la amplificación específica. En una realización, los productos de amplificación se separan por electroforesis en gel de agarosa, agarosa-acrilamida o poli(acrilamida) usando procedimientos convencionales (véase por ejemplo, Sambrook y col., (1989).

10 Como alternativa, pueden emplearse técnicas cromatográficas para efectuar la separación de los productos de amplificación y/o de los dúplex de productos de amplificación: sonda marcada hibridados. Hay muchos tipos de cromatografía que pueden usarse en relación con el análisis de los productos de amplificación de la presente invención, incluyendo, sin limitación, técnicas de adsorción, distribución, cromatografía de intercambio iónico, tamizado molecular, y muchas técnicas especializadas para su uso, incluyendo cromatografía en columna, papel, de capa fina y de gases.

Los productos de amplificación han de visualizarse para confirmar la aplicación de las secuencias marcadoras. Un procedimiento de visualización típico implica la tinción de un gel con bromuro de etidio y la visualización con luz UV. Como alternativa, si los productos de amplificación se marcan integralmente con nucleótidos radiomarcados o con nucleótidos fluorométricamente marcados, los productos de amplificación pueden exponerse después a una película de rayos x o visualizarse con los espectros de estimulación apropiados, después de la separación.

En determinadas realizaciones, la visualización puede realizarse indirectamente. Después de la separación de los productos de amplificación, una sonda de ácido nucleico, marcada, se pone en contacto con la secuencia marcadora amplificada. Preferentemente la sonda se conjuga con un cromatóforo pero puede radiomarcarse. En otra realización, la sonda se conjuga con un compañero de unión, tal como un anticuerpo o biotina, y el otro miembro del par de unión lleva un radical detectable.

En una realización, la detección es mediante análisis de hibridación Southern ("inmunotransferencia") con una sonda de detección oligonucleotídica marcada adecuadamente. Las técnicas implicadas en la transferencia de Southern son muy conocidas por los expertos en la materia y pueden encontrarse en muchos libros convencionales de protocolos moleculares. Véase Sambrook y col. (1989). En resumen, los productos de amplificación se separan por electroforesis en gel. Después, el gel se pone en contacto con una membrana, tal como nitrocelulosa, lo que permite la transferencia del ácido nucleico y la unión no covalente. Posteriormente, la membrana se incuba con una sonda conjugada con un cromóforo que puede hibridarse con un producto de amplificación diana. La detección es por exposición de la membrana a una película de rayos x o a dispositivos de detección emisores de iones.

Un ejemplo de lo anterior se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.279.721, que desvela un aparato y un procedimiento para la electroforesis y la transferencia automatizada de ácidos nucleicos. El aparato permite efectuar la electroforesis y la transferencia sin manipulación externa del gel y está perfectamente diseñado para realizar los procedimientos de acuerdo con la presente invención.

40 **Kits de amplificación de polinucleótidos**

En el presente documento se desvelan kits para amplificar ácidos nucleicos procedentes de virus, y en particular, ácidos nucleicos específicos para una o más de las cepas, tipos, o subtipos de BVDV particulares, incluyendo sin limitación, BVDV-1a, BVDV-1b y BVDV- 2. Dichos kits comprenden típicamente dos o más componentes necesarios para la amplificación de uno o más ácidos nucleicos víricos de una población de polinucleótidos. Por ejemplo, dentro de un kit, un envase puede contener un primer cebador, mientras que dentro del kit un segundo envase puede comprender un segundo cebador. Un tercer envase dentro del kit puede contener una o más sondas de hibridación y/o detección, y/o uno o más reactivos para marcar una o más de dichas sondas de detección. Además, los kits desvelados en el presente documento también pueden comprender instrucciones para su uso, por ejemplo, instrucciones para el uso de los cebadores en las reacciones de amplificación y/o detección como se describe en el presente documento, así como una o más moléculas fluorescentes, u otros reactivos según sea necesario, incluyendo, por ejemplo, pero sin limitación, enzimas tampón, polimerasas, ARNasas y similares.

Kits para la detección y cuantificación de nucleótidos específicos de virus

En el presente documento también se desvelan kits de diagnóstico representados. Dichos kits también pueden comprender uno o más medios de envase distintos dentro del kit para las sondas, cebadores, marcadores fluorescentes o tampones de reacción, polimerasas, etc. El kit puede comprender adicionalmente instrucciones para el uso de las composiciones contenidas dentro del kit en una o más metodologías basadas en la reacción en cadena de la polimerasa, incluyendo, sin limitación, PCR, cPCR, RT-PCR, RT-PCR/FRET y similares. También pueden

proporcionarse instrucciones para el uso de los reactivos incluidos en el kit para la detección de una o más cepas, tipos, o subtipos o un virus, tal como BVDV (incluyendo, sin limitación BVDV-1a, BVDV-1b y BVDV-2) o uno o más patógenos de virus de mamífero adicionales, tales como, sin limitación, BHV-1, PI₃, BRSV, y similares en una muestra que se sospecha que contiene dichos uno o más polinucleótidos específicos de virus. En determinadas realizaciones, los kits de ensayo de diagnóstico de la presente invención también pueden comprender preferentemente instrucciones para el uso de los artículos incluidos en dichos kits en un ensayo de PCR, cPCR, RT-PCR, RT-PCR/FRET como se describe en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, cPCR en tiempo real.

Opcionalmente, cualquiera de los kits anteriormente mencionados puede incluir uno o más agentes de control "positivo" o "negativos" (marcados o no marcados), para su uso en la preparación de una curva patrón para el ensayo de detección. Los componentes de los kits pueden envasarse en procedimientos convencionales, incluyendo, por ejemplo, en medios acuosos, o como componentes deshidratados, deshidratados por congelación o liofilizados. Los medios de envase de los kits generalmente incluyen al menos un vial, un tubo de ensayo, un matraz, un frasco, una jeringa u otro envase, en el que pueden colocarse los componentes del ensayo, y preferentemente, dispensarse adecuadamente en una o más alícuotas. Cuando se proporciona un componente adicional, el kit también contendrá generalmente un segundo, tercer u otro envase adicional, en el que pueda colocarse este componente. Los kits también pueden incluir otros reactivos de diagnóstico para su uso en la identificación, cuantificación, especiación o caracterización de los VVM contenidos dentro de una muestra, tal como una formación de vacuna polivalente. Los kits desvelados en el presente documento también incluirán típicamente un medio para contener la sonda(s), el cebador(es) y/o el reactivo(s) de ensayo en estrecho confinamiento para la venta comercial. Dichos envases pueden incluir, por ejemplo, uno o más envases de plástico para inyección o moldeados por soplado, en los que se guardan los recipientes con los reactivos deseados (por ejemplo, viales, tubos de ensayo, jeringas etc.).

Definiciones ejemplares

De acuerdo con la presente invención, los polinucleótidos, los segmentos de ácido nucleico, las secuencias de ácido nucleico y similares, incluyen, pero sin limitación, ADN (incluyendo, por ejemplo, sin limitación, ADN genómicos o extragenómicos), genes, ácidos péptidonucleicos (PNA), ARN (incluyendo, por ejemplo, pero sin limitación ARNr, ARNm y ARNt), nucleósidos y segmentos de ácido nucleico adecuados obtenidos de fuentes naturales, sintetizados químicamente, modificados, o fabricados o sintetizados de otra manera en su totalidad o en parte por el hombre.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos científicos y técnicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el normalmente entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque en el presente documento puede usarse cualquier procedimiento similar o equivalente a los descritos en la realización práctica o ensayo de la presente invención, en el presente documento se describen composiciones y procedimientos preferidos. Para los fines de la presente invención, a continuación se definen los siguientes términos:

Los términos "aproximadamente" y "alrededor de", como se usan en el presente documento, son intercambiables, y generalmente debe entenderse que se refieren a un intervalo de números alrededor de un número determinado, así como a todos los números en un intervalo de números indicado (por ejemplo, "de aproximadamente 5 a 10" significa "de aproximadamente 5 a aproximadamente 10" a menos que se indique otra cosa). Además, debe entenderse que todos los intervalos numéricos del presente documento incluyen cada número entero completo dentro del intervalo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "reactivos de la PCR" se refiere a los productos químicos, aparte de la secuencia de ácido nucleico diana, necesarios para realizar un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa. Estos compuestos químicos generalmente incluyen cinco categorías de componentes: (a) un tampón acuoso; (b) una sal de magnesio soluble en agua; (c) desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP); (d) pares de cebadores oligonucleotídicos directos e inversos; y (e) una ADN polimerasa termoestable (es decir, una ADN polimerasa que pueda tolerar temperaturas entre aproximadamente 80 y aproximadamente 100 °C durante al menos aproximadamente 10 min sin perder más de aproximadamente la mitad de su actividad enzimática. Los cuatro dNTP convencionales son timidina trifosfato (dTTP), desoxiadenosina trifosfato (dATP), desoxicitidina trifosfato (dCTP) y desoxiguanosina trifosfato (dGTP), aunque pueden complementarse o reemplazarse en la reacción de PCR por uno o más dNTP que contengan análogos de bases que formen pares de bases de tipo Watson y Crick de manera similar con una de las bases convencionales (por ejemplo, desoxiuridina trifosfato [dUTP] y similar).

El término "oligonucleótido" como se usa en el presente documento, incluye oligómeros lineales de uniones o monómeros naturales o modificados, incluyendo desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y similares que tienen la capacidad de unirse específicamente a un ácido nucleico diana mediante un patrón ordenado de interacciones monómero con monómero (por ejemplo, mediante emparejamiento de bases de Watson y Crick o similar). Típicamente los monómeros están unidos mediante enlaces fosfodiéster (o equivalentes) para formar oligonucleótidos que varían en cuanto al tamaño de algunas unidades monoméricas a varias decenas de unidades monoméricas. A lo largo de la divulgación, siempre que se represente un oligonucleótido con una secuencia de letras (por ejemplo, "TTACGCAG"), se entenderá que los nucleótidos se presentan en el orden 5' → 3', leyendo de izquierda a derecha. En dichas representaciones, se entiende que "A" significa adenosina (o en el caso de ADN,

desoxiadenosina), mientras que "C" "G" "T" y "U" representan citidina/desoxicitidina, guanosina/desoxiguanosina, desoxitimidina y uridina, respectivamente. Los análogos de enlaces fosfodiéster incluyen, sin limitación, fosforotioato, fosforanilidato, fosforamidato y similares.

5 Las expresiones "corresponde sustancialmente a", "sustancialmente homólogo" o "identidad sustancial" como se usan en el presente documento, indican una característica de un ácido nucleico o de una secuencia de aminoácidos, en la que una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos seleccionada tiene un porcentaje de identidad de secuencia de al menos aproximadamente 70 o aproximadamente 75, en comparación con una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos de referencia seleccionada. Más típicamente, la secuencia seleccionada y la secuencia de referencia tendrán un porcentaje de identidad de secuencia de al menos aproximadamente 76, 77, 78, 79, 80, 10 81,82, 83, 84 o incluso 85, y más preferentemente, un porcentaje de identidad de secuencia de al menos aproximadamente 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, o 95. Más preferentemente aún, las secuencias altamente homólogas a menudo comparten un porcentaje de identidad de secuencia mayor que al menos aproximadamente 96, 97, 98, o 99 entre la secuencia seleccionada y la secuencia de referencia con la cual se ha comparado.

15 El porcentaje de identidad de secuencia puede calcularse sobre toda la longitud de las secuencias a comparar, o puede calcularse por exclusión de pequeñas deleciones o adiciones que suman menos de aproximadamente 25 por ciento, más o menos, de la secuencia referencia seleccionada. La secuencia referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más larga, tal como una parte de un gen o una secuencia flanqueante, o una parte repetitiva de un cromosoma. Sin embargo, en el caso de homología de secuencia de dos o más secuencias de oligo- o polinucleotídicas, la secuencia de referencia comprenderá típicamente al menos aproximadamente 10-15 20 nucleótidos, más típicamente al menos aproximadamente de 16 a 25 nucleótidos, e incluso más típicamente al menos aproximadamente 26-35 nucleótidos, al menos aproximadamente 40 nucleótidos, al menos aproximadamente 45 nucleótidos, al menos aproximadamente 50 nucleótidos o al menos aproximadamente 60, 70, 80, 90 o incluso al menos aproximadamente 100 nucleótidos, más o menos.

25 Preferentemente, cuando se desean fragmentos altamente homólogos, el porcentaje de identidad entre las dos secuencias (a menudo denominadas secuencias "diana" y "sonda") será de al menos aproximadamente 80 % idéntico, preferentemente de al menos aproximadamente 85 % idéntico y más preferentemente de al menos aproximadamente 90 % idéntico, de al menos aproximadamente 92 % idéntico, de al menos aproximadamente 93 % idéntico, de al menos aproximadamente 94 % idéntico o incluso de al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 30 98 %, o 99 % o mayor. El porcentaje de homología o porcentaje de identidad entre 2 o más secuencias oligo- o polinucleotídicas puede determinarlo fácilmente un experto en la materia, usando uno o más de los algoritmos de comparación de secuencias convencionales, tales como, por ejemplo, el análisis del programa FASTA descrito por Pearson y Lipman (1988).

35 La expresión "de origen natural", como se usa en el presente documento, aplicada a un objeto, se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica o polinucleotídica que puede aislarse de una fuente en la naturaleza, y que el hombre no ha modificado intencionalmente, es una secuencia "de origen natural".

40 La expresión "sustancialmente complementaria", cuando se usa para definir cualquiera de las secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos, significa que una secuencia sujeto particular, por ejemplo, una secuencia oligonucleotídica, es sustancialmente complementaria a toda o a una parte de la secuencia seleccionada, y por tanto se unirá específicamente a una parte de un ARNm que codifica la secuencia seleccionada. Como tal, típicamente las secuencias serán muy complementarias a la secuencia "diana" de ARNm, y tendrá no más de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 emparejamientos de bases erróneas a lo largo de la parte complementaria de la secuencia.

45 Sustancialmente, las secuencias oligonucleotídicas complementarias tendrán un porcentaje de complementariedad (o "% de coincidencia exacta") mayor de aproximadamente 80 por ciento, mayor de aproximadamente 85 por ciento, mayor de aproximadamente 90 por ciento, o incluso mayor de aproximadamente 95 por ciento, con la secuencia de ácido nucleico diana correspondiente con la cual se une específicamente el oligonucleótido, y tendrá, más preferentemente, un porcentaje de complementariedad mayor de aproximadamente 96 %, o mayor, con la secuencia de ácido nucleico correspondiente con la cual se une específicamente el oligonucleótido.

50 En determinados aspectos, como se ha descrito anteriormente, será deseable tener incluso más secuencias oligonucleotídicas sustancialmente complementarias para su uso en la realización práctica de la invención, y en dichos casos, las secuencias oligonucleotídicas tendrán una complementariedad mayor de aproximadamente 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o incluso 100 % con toda, o con una parte de, la secuencia del ácido nucleico diana con la cual se unirá específicamente la sonda oligonucleotídica diseñada o el cebador oligonucleotídico diseñado.

55 El porcentaje de similitud o porcentaje de complementariedad de cualquiera de las secuencias desveladas puede determinarse, por ejemplo, comparando la información de secuencia usando el programa informático GAP, versión 6.0, disponible en la University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG). El programa GAP utiliza el procedimiento de alineamiento de Needleman y Wunsch. En resumen, el programa GAP define la similitud como el número de símbolos (es decir, nucleótidos o aminoácidos) alineados que son similares, dividido entre el número total de símbolos en la secuencia más corta de las dos secuencias. Los parámetros por defecto preferidos para el

programa GAP incluyen: (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un valor de 1 para identidades y un valor de 0 para no identidades) para nucleótidos, y la matriz de comparación ponderada de Gribkov y col., (2) una penalización de 3,0 por cada hueco y una penalización adicional de 0,10 por cada símbolo en cada hueco; y (3) ninguna penalización para huecos terminales.

5 En muchos casos, puede ser deseable que las secuencias coincidan exactamente, es decir, sean completamente complementarias a la secuencia con la que se une específicamente el oligonucleótido, y por lo tanto tienen cero emparejamientos erróneos a lo largo del tramo complementario. Como tales, las secuencias de cebador o sonda altamente complementarias, se unirán típicamente de un modo muy específico con la región de secuencia diana de la pluralidad de polinucleótidos y por lo tanto será muy eficaz para dirigir la amplificación de la secuencia diana mediante PCR, cPCR, RT-cPCR o RT-cPCR/FRET, etc.

10 "Mezcla de reacción de amplificación" se refiere a una solución acuosa que comprende uno o más reactivos diversos, necesarios para amplificar una o más secuencias de ácido nucleico diana seleccionadas. Dichas mezclas incluyen, sin limitación, una o más enzimas, uno o más tampones acuosos, una o más sales, uno o más ácidos nucleicos diana y una pluralidad de nucleósidos trifosfato convencionales. Dependiendo del contexto, la mezcla puede ser cualquier mezcla de reacción de amplificación completa o incompleta.

15 "Reacción de amplificación" se refiere a cualquier procedimiento *in vitro* para multiplicar una secuencia de ácido nucleico diana para producir una población de dichas secuencias. Los procedimientos de amplificación convencionales incluyen, pero sin limitación, sistemas de amplificación basados en PCR, ADN ligasa, Q β replicasa, transcripción de ARN y similares.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "reactivos de amplificación" se refiere a los diversos tampones, enzimas, cebadores, nucleósidos trifosfato (tanto convencionales como no convencionales) y sondas, usados para realizar la reacción de amplificación seleccionada.

Como se usa en el presente documento, "amplificar" o "amplificación" se refieren típicamente a un aumento exponencial en el ácido nucleico diana que va a usarse en el presente documento, para describir aumentos tanto lineales como exponenciales en los números de una secuencia de ácido nucleico diana seleccionada.

25 "Se une(n) sustancialmente" se refiere a la hibridación complementaria entre oligonucleótidos y abarca emparejamientos erróneos minoritarios que pueden incorporarse reduciendo la rigurosidad de los medios de hibridación para conseguir el cebado deseado de las polimerasas de la PCR.

30 Como se usa en el presente documento, "biotinilado(a)" se refiere a un radical de biotina unido covalentemente al extremo 5' de un oligonucleótido con el fin de reaccionar con estreptavidina en un ensayo de detección.

En el contexto de ácidos nucleicos, los términos "unión", "uniendo" y "unido(a)" se refieren a la hibridación de dos o más secuencias de ácido nucleico mediante emparejamiento de bases complementarias de Watson y Crick.

35 Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico" se refiere a un polímero de desoxirribonucleótido o ribonucleótido en cualquier forma mono o bicatenaria y, a menos que se limite de otra manera, abarcaría análogos conocidos de nucleótidos naturales que pueden funcionar de una manera similar a la de los nucleótidos de origen natural.

40 Una "nucleótido polimerasa" es una enzima que puede catalizar la síntesis de ADN o de ARN a partir de una población de precursores de nucleósido trifosfato. En las reacciones de amplificación de la presente invención las polimerasas son dependientes de molde y se extienden típicamente desde el extremo 3' del polímero que va a formarse. En realizaciones preferidas, la polimerasa que se emplea es una polimerasa termoestable.

45 Como se usa en el presente documento, "cebador" o "cebador(es) oligonucleotídico(s)" se refieren a un oligonucleótido, ya sea natural o sintético, que puede actuar como un punto de inicio de la síntesis de ADN en condiciones en las que se inicia la síntesis de un producto de extensión de cebador complementario a una cadena de ácido nucleico (es decir, en presencia de cuatro nucleótidos trifosfato diferentes y un agente para polimerización, tal como una ADN polimerasa o transcriptasa inversa) en un tampón apropiado y a una temperatura adecuada. En el contexto de la invención, un cebador es preferentemente un oligodesoxirribonucleótido, y es, preferentemente, monocatenario, para obtener una máxima eficacia en la amplificación. Como saben los expertos habituales en la materia, no es necesario que dichos cebadores reflejen la secuencia exacta del molde diana, pero no obstante, deben ser suficientemente complementarios con la secuencia para permitir la hibridación (es decir, la unión) con el molde, en condiciones de reacción adecuadas.

50 Como se usa en el presente documento, una "vacuna viva modificada" es una vacuna que comprende un virus que se ha alterado, típicamente mediante pases en células de cultivo tisular, para atenuar su capacidad de causar enfermedades, pero que conserva su capacidad para proteger contra enfermedades e infecciones cuando se administran posteriormente a un animal.

55

En el presente documento, el término "patógeno" se define como cualquier tipo de agente infeccioso, incluyendo, por ejemplo, virus, priones, protozoos, parásitos, así como microbios tales como bacterias, levaduras, mohos, hongos, y similares.

5 Como se usa en el presente documento, el término "individuo" (también indistintamente denominado "hospedador", "sujeto", "receptor", "paciente", etc.) se refiere a cualquier animal que puede recibir una o más de las composiciones farmacéuticas o formulaciones de vacuna desveladas en el presente documento. Preferentemente, el sujeto es un animal vertebrado, que lo que se pretende referirse a cualquier especie animal (y preferentemente una especie de mamífero). En determinadas realizaciones, el individuo es preferentemente cualquier hospedador mamífero, incluyendo, pero sin limitación, primates no humanos, bovinos, caninos, caprinos, cavinos, corvinos, epinos, equinos, felinos, hircinos, lapinos, leporinos, lupinos, ovinos, porcinos, racinos, vulpinos y similares, incluyendo ganado, especímenes zoológicos, exóticos, así como animales de compañía, mascotas y cualquier animal sometido a cuidado veterinario.

15 Como se usa en el presente documento, el término "vacuna" se refiere se refiere a una composición o a una formulación que contiene una composición inmunogénica como se desvela en el presente documento, en una forma que puede administrarse a un vertebrado, y preferentemente a un animal, tal como mamífero. Típicamente, las vacunas de la presente invención incluirán una o más de las composiciones inmunogénicas (incluyendo una o más partículas de virus vivos modificados o pluralidades de las mismas) desveladas en el presente documento, formuladas para la administración a un animal que lo necesite. Dichas composiciones pueden ser de cualquier formulación adecuada, incluyendo, sin limitación, las preparadas en un vehículo acuoso, así como aquellas que están congeladas, deshidratadas por congelación, liofilizadas o deshidratadas, que después se rehidratan o suspenden posteriormente en un vehículo convencional farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, solución salina estéril o una solución acuosa tamponada similar) antes de la administración. En dichas formas, las composiciones de vacuna como se desvela en el presente documento, puede fabricarse en alícuotas de dosis sencillas o múltiples convenientes, que pueden emplearse fácilmente en uno o más de los procedimientos o regímenes de vacunación desvelados en el presente documento para prevenir, controlar o, de otra manera, tratar una o más afecciones o uno o más síntomas de infección vírica y/o microbiana en un animal susceptible.

El término "por ejemplo", como se usa en el presente documento, se usa simplemente a modo de ejemplo, sin pretender ninguna limitación; como tal, no debe considerarse que solo se refiere a los elementos explícitamente enumerados en la memoria descriptiva.

30 Una "secuencia diana" o "secuencia nucleotídica diana", como se usa en el presente documento, incluye cualquier secuencia de nucleótidos con la cual se hibrida una de dichas secuencias de cebadores en condiciones que permitan que una enzima tenga actividad polimerasa para alargar la secuencia de cebador, y por lo tanto duplicar la cadena complementaria.

35 Una molécula de ácido nucleico (típicamente compuesta por ADN) puede replicarse en una célula hospedadora y/o puede unirse operativamente con otro segmento de ácido nucleico para llevar a cabo la replicación del segmento unido. Un plásmido, un cósmido, o un virus es un ejemplo de vector.

40 Un "cebador" o "secuencia de cebador" puede incluir cualquier secuencia o segmento de ácido nucleico que se hibrida selectivamente con una cadena de ácido nucleico molde complementaria ("secuencia diana") y funciona como un punto de inicio para la adición de nucleótidos para replicar (copiar) la cadena molde. Las secuencias de cebadores, como se desvela en el presente documento, pueden marcarse o contener otras modificaciones que permitan la delección y/o análisis de los productos de amplificación. Además de actuar como iniciadores para la duplicación mediada por la polimerasa de las secuencias de ADN diana, las secuencias de cebadores también pueden usarse para la transcripción inversa de los ARN molde en ADN correspondientes.

45 Como se usa en el presente documento, "par de transferencia de energía por resonancia fluorescente" o "par FRET" se refiere a un par de fluoróforos que comprende un fluoróforo donador y un fluoróforo aceptor, en el que el fluoróforo donador puede transferir energía por resonancia al fluoróforo aceptor. En pares de transferencia de energía por resonancia fluorescente preferidos, el espectro de absorción del fluoróforo donador no se solapa sustancialmente con el espectro de absorción del fluoróforo aceptor. Como se usa en el presente documento, "una sonda oligonucleotídica donadora" se refiere a un oligonucleótido que está marcado con un fluoróforo donador de un par FRET. Como se usa en el presente documento, "una sonda oligonucleotídica aceptora" se refiere a un oligonucleótido que está marcado con un fluoróforo aceptor de un par FRET. Como se usa en el presente documento, un "par oligonucleotídico FRET" comprenderá típicamente una sonda oligonucleotídica de "anclaje" o "donadora" y una sonda oligonucleotídica "aceptora" o "detectora", y dicho par forma una relación FRET cuando tanto la sonda oligonucleotídica donadora como la sonda oligonucleotídica aceptora se hibridan con sus secuencias de ácido nucleico diana complementarias. Los pares de fluoróforos aceptables para su uso como pares FRET son muy conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, fluoresceína/rodamina, ficoeritrina/Cy7, fluoresceína/Cy5, fluoresceína/Cy5.5, fluoresceína/LC Red 640 y fluoresceína/LC Red 705.

De acuerdo con la antigua convención de derecho de patentes, cuando en la presente solicitud, incluidas las reivindicaciones, se usan las palabras "un", "uno" y "una", estas palabras significan "uno(a) o más".

Ejemplo

El siguiente ejemplo se incluye para demostrar realizaciones ilustrativas de la invención. Los expertos habituales en la materia deben apreciar que las técnicas desveladas en el siguiente ejemplo representan técnicas que se ha descubierto que funcionan bien en la realización práctica de la presente invención, y por tanto puede considerarse que constituyen modos preferidos para esta realización práctica.

PROTOCOLO DE ENSAYO DE FUERZA PARA COMPONENTES DE VACUNAS MULTIFACTORIALES

El presente ejemplo demuestra el uso de un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo (cPCR) (en tiempo real) para determinar satisfactoriamente la fuerza de componentes víricos individuales de una vacuna multivalente de virus vivos modificados (VVM).

En el documento US 2013/0280294 los inventores comunicaron una vacuna de virus vivos modificados (VVM) de seis vías (es decir, hexavalente) eficaz contra el BRDC y la fiebre del transporte. El presente ejemplo describe ensayos útiles para la cuantificación de los componentes víricos individuales de dicha vacuna. Los inventores muestran que el ensayo es particularmente ventajoso sobre las metodologías existentes para la determinación de las fuerzas individuales de cepas genéticamente relacionadas en una vacuna multivalente (es decir, polivalente o multicomponente). Usando como patrón la vacuna hexavalente de VVM contra el BRDC, los inventores han demostrado que el ensayo es eficaz para diferenciar entre, y cuantificar, las fuerzas de componentes de vacuna individuales, incluso cuando la vacuna contiene tres subgenotipos de un solo tipo de virus. Dichos ensayos ofrecen procedimientos nuevos y más fiables para cuantificar de modo preciso la presencia de BVDV-1a, BVDV-1b y BVDV-2 en formulaciones de vacunas polivalentes.

Materiales y procedimientos**CULTIVO CELULAR**

Todos los cultivos se prepararon usando técnicas y suministros convencionales, como describe Freshney (1987). En todos los ensayos de cultivo se utilizó la línea celular de riñón de bovino TVL, que presenta una morfología de tipo epitelial típica en cultivo.

El cultivo de semilla maestro (SM) de BVDV-1b (denominado "**SM BVDV1b TVL 27/4/2007 DW3-095**") en la solicitud de patente provisional de Estados Unidos nº 61/427.361 relacionada con la del solicitante) se ha depositado en condiciones que aseguran que el acceso a los cultivos estará disponible durante la espera de esta solicitud de patente a una determinada por el comisionado de patentes y marcas registradas para tener derecho a ello según 37 C.F.R. § 1.14 y 35 U.S.C. § 122. El depósito está disponible como lo exigen las leyes de patentes extranjeras en países en los que se presentan homólogos de la solicitud en cuestión, o su progenie. Sin embargo debe entenderse que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia de la práctica de la invención objeto en derogación de los derechos de patente otorgados por la acción gubernamental. El depósito del cultivo en cuestión se conservará y pondrá a disposición del público de conformidad con las disposiciones del tratado de Budapest para el depósito de microorganismos, es decir, se conservarán con todo el cuidado necesario para mantenerlo viable y no contaminado durante un periodo de al menos cinco años después de la petición más reciente para el acabado de una muestra del depósito y, en cualquier caso, durante un periodo de al menos 30 (treinta) años después de la fecha de depósito o de la vigencia exigible de cualquier patente que pueda expedir la revelación del cultivo depositado. El depositante reconoce el deber de sustituir el depósito si el depositario no puede proporcionar una muestra cuando se solicite debido al estado del depósito. Todas las restricciones sobre la disponibilidad para el público del depósito del cultivo en cuestión se eliminarán irrevocablemente al conceder una patente que lo revele. Un depósito del virus **SM BVDV1b TVL 27/4/2007 DW3-095** se introdujo en la colección permanente del Depósito de Patentes del American Type Culture Laboratory, ubicado en 10801 University Blvd., Manassas, VA, 20110-2209, EE.UU., el 21 de diciembre de 2010 bajo los términos Del Tratado de Budapest, tras lo cual el depositario le asignó el número de registro ATCC PTA-11553.

ESPECIFICIDAD DE CONJUNTOS DE CEBADOR/SONDA

Se extrajo ARN de fluidos de virus de cada una de las siguientes semillas de virus aprobadas por el departamento de agricultura de los Estados Unidos (US- DA): BVDV-1a (cepa Singer), BVDV-1b (cepa TGAC), BVDV-2 (125), PI3 (Reisinger SF-4) y BRSV (N375) (no se realizó proceso de extracción en BHV-1 [cepa Cooper] dado que este es un virus de ADN). Las extracciones se realizaron usando RNAqueous®-4PCR (Ambion; Austin, TX, USA).

Cada una de las muestras de virus de ARN se usó como un molde (muestra) en reacciones RT-cPCR distintas para cada uno de los seis conjuntos de cebador/sonda usando química para RT-PCR de una etapa TaqMan®. El virus de ADN (BHV-1) también se usó como molde (muestra) en reacciones de cPCR distintas, con cada uno de los seis conjuntos de cebador/sonda descritos anteriormente. El análisis de los conjuntos de cebador/sonda de BRSV contra las seis fracciones víricas de la vacuna hexavalente indica que no hay reactividad cruzada para cada uno de los conjuntos de cebador/sonda con cualquiera de las otras fracciones víricas.

Ensayos de CPCR

Se realizaron ensayos de cPCR usando el sistema de PCR en tiempo real de Applied Biosystems 7500.

Cebadores oligonucleotídicos y sondas moleculares marcadas

5 Los siguientes pares de cebadores inversos y directos y sondas TaqMan® habituales, específicos de virus, se fabricaron en Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

(primer) BVDV-1b:

Cebador directo: 5'-CACCTATCAGGCTGTATTCATAGC-3' (SEQ ID NO: 1);
 Cebador inverso: 5'-TGCCACAGCACATCTTAACC-3' (SEQ ID NO: 2); y
 Sonda de detección de BVDV-1b: 5'-TCACCTGGACGACCC-3' (SEQ ID NO: 3).

10 **(segundo) BVDV-1b:**

Segundo cebador directo: 5'-GTCGTCCAGGTGAAAACGGT-3' (SEQ ID NO: 19);
 Segundo cebador inverso: 5'-GTCGTCCAGGTGAAAACGGT-3' (SEQ ID NO: 20); y
 Segunda Sonda de detección de BVDV-1b: 5'-GTCGTCCAGGTGAAAACGGT-3' (SEQ ID NO: 21).

Aunque el (primer) BVDV-1b proporcionó resultados aceptables, el (segundo) BVDV-1b mostró mejores resultados.

15 **BRSV:**

Cebador directo: 5'-GCAATGCTGCAGGACTAGGTATAAT-3' (SEQ ID NO: 4);
 Cebador inverso: 5'-ACACTGTAATTGATGACCCATTCT-3' (SEQ ID NO: 5); y
 Sonda de detección de BRSV: 5'-AAGACTTGTATGATGCTGCCAA-3' (SEQ ID NO: 6).

BVDV-1a:

20 Cebador directo: 5'-GGTCGCCCAGGTAAAAGCA-3' (SEQ ID NO: 7);
 Cebador inverso: 5'-GCCTCTGCAGCACCTATCA-3' (SEQ ID NO: 8); y
 Sonda de detección de BVDV-1a: 5'-AACCGACTGTTACGAATAC-3' (SEQ ID NO: 9).

BVDV-2:

25 Cebador directo: 5'-GCTAGCCATGCCCTTAGTAGGAC-3' (SEQ ID NO: 10);
 Cebador inverso: 5'-GACGAGTCCCCTGTACTIONAGG-3' (SEQ ID NO: 11); y
 Sonda de detección de BVDV-2: 5'-CAGTGAGTCCATTGGATGG-3' (SEQ ID NO: 12).

PI3:

30 Cebador directo: 5'-GGAGACCAAGACCAAGGAGATG-3' (SEQ ID NO: 13);
 Cebador inverso: 5'-CGTCTGCCATGCATAAGG-3' (SEQ ID NO: 14); y
 Sonda de detección de PI3: 5'-ACCTCGGTCATCCATAG-3' (SEQ ID NO: 15).

BHV-1:

Cebador directo: 5'-CCATGTTAGCGCTCTGGAACC-3' (SEQ ID NO: 16);
 Cebador inverso: 5'-CGTCTTTACGGTCGACGACTCC-3' (SEQ ID NO: 17); y
 Sonda de detección de BHV-1: 5'-ACGGACGTGCGCAA-3' (SEQ ID NO: 18).

35 **Ensayo de fuerza para vacunas monovalentes**

Los protocolos para cada uno de los siguientes ensayos utilizan la metodología del ciclo de umbral (C_T) comparativa de Applied Biosystems 7500 para determinar si un pocillo individual de una placa de titulación contiene una mayor cantidad de virus que el pocillo de referencia equivalente. La mayoría de las muestras de virus contienen algunas partículas de virus no viables que podrían detectarse mediante ensayo de PCR, por tanto proporcionando
 40 posiblemente resultados positivos falsos. Este tema se resuelve usando una placa de referencia sin células. La muestra se diluye en la placa de referencia exactamente igual como se hace en la placa de ensayo pero sin células para eliminar la posibilidad de que se produzca replicación de virus. La placa de referencia se usó para generar un valor de C_T inicial o de fondo para cada uno de los pocillos en cada ensayo. Si un pocillo de la placa de ensayo tiene un valor de C_T más elevado que el del pocillo de fondo correspondiente, se ha producido la replicación vírica y se
 45 considera que el pocillo es positivo. Si no se determina un valor C_T para un pocillo, o el valor de C_T es equivalente al valor de C_T de fondo, entonces se considera que el pocillo es negativo.

Ensayo de fuerza para vacunas multivalentes

5 Se preparó una serie piloto de la vacuna hexavalente IBR/BVDV-1a, -1b, -2/PI3/RSV hexavalente, de virus vivo modificado, como se describe en el presente documento. En resumen, los virus BHV-1 (cepa Cooper), BVDV-1a (cepa Singer), BVDV-1b (cepa TGAC), BVDV-2 (125), PI3 (Reisinger SF-4) y BRSV (N375) se propagaron en la línea celular de riñón bovino (BK) TVL (pase 20). Se recogieron fracciones individuales en el pase 10 y se mezclaron conjuntamente en el producto de seis vías. Puede realizarse un ensayo de fuerza para cada fracción de la vacuna de seis vías como se describe en el presente documento con la adición de antisueros neutralizantes apropiados. El valor de DICT50 (Dosis Infecciosa del 50% en cultivo de Tejidos) de cada fracción viral se determinó basándose en los resultados de ECP/AF/AFI y se compararon con los basados en RT-cPCR/cPCR.

10 **Ensayos de fuerza de BVDV-1A, BVDV-1B y BVDV-2**

Muestras de BVDV-1a, BVDV-1b y BVDV-2 monovalentes pueden titularse por separado de acuerdo con el procedimiento de ensayo complementario para la titulación del virus de la diarrea vírica bovina en vacunas (SAM 101). En resumen, el ensayo se realizó por duplicado utilizándose una de las placas para el cálculo del título basándose en el ECP y/o AF/AFI como se ha descrito. La otra placa se utilizó para determinar un título basándose en una RT-cPCR. Se incluyó una placa de referencia con déficit de células como se ha descrito anteriormente para cada uno de los virus.

Ensayo de fuerza de PI3

20 El ensayo de fuerza para PI3 se realizó por duplicado utilizándose una de las placas para el cálculo del título basándose en el efecto citopático, ECP. La otra placa se usó para determinar un título basándose en los valores de C_T comparativos de PI3 determinados por RT- cPCR. Se incluyó una placa de referencia con déficit de células como se ha descrito anteriormente.

Ensayo de fuerza de BRSV

25 El ensayo de fuerza para BRSV se realizó por duplicado utilizándose una de las placas para el cálculo del título basándose en el ECP como se ha descrito anteriormente, utilizándose la placa restante para determinar un título basándose en los valores de C_T comparativos de BRSV determinados por RT-cPCR. Como se ha indicado anteriormente, en el ensayo también se incluyó una placa de referencia con déficit de células.

Ensayo de fuerza de BHV

30 El ensayo de fuerza para BHV se realizó en un formato de 96 pocillos, sustituyendo el análisis de cPCR de los pocillos individuales por la observación visual y el recuento de las placas convencional. El ensayo se realizó por duplicado, utilizándose una de las placas para el cálculo del título basándose en la presencia o en la ausencia de ECP en un pocillo individual (dilución), al mismo tiempo que la placa restante se usó para calcular un título basándose en los valores de C_T comparativos de BHV determinados por cPCR. Se incluyó una placa de referencia con déficit de células como se ha descrito anteriormente.

Resultados de los ensayos

35 A continuación se proporcionan los resultados de los ensayos anteriores.

Tabla 1: se procesaron muestras de virus conocidos para cada uno de los seis virus investigados frente a un conjunto de sonda-cebador (1A sc) para RT-PCR de BVD 1a. El conjunto de sonda-cebador de BVD 1a no reaccionó en cruzado con ninguno de los otros virus investigados. (sd= sin dilución, sc= conjunto de sonda-cebador)

Pocillo	Nombre de la muestra	Diana	Indicador	Inactivador	C _T	Media C _T
A7	BHV sd y 1A sc	BVD 1a	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado
A8	1A sd y 1A sc	BVD 1a	FAM	NFQ-MGB	19,09957	19,09957
A9	PI3 sd y 1A sc	BVD 1a	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado
A10	1B sd y 1A sc	BVD 1a	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado
A11	BVD2 sd y 1A sc	BVD 1a	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado
A12	BRSV sd y 1A sc	BVD 1a	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado
D3	1A + CONTROL	BVD 1a	FAM	NFQ-MGB	20,24967	20,24967
D4	1A-CONTROL	BVD 1a	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado

Tabla 2: dilución log de BVD 1a (1A) con DICT₅₀ conocida con sus puntuaciones C_T correspondientes de la reacción con un conjunto de sonda-cebador para RT- PCR de BVD 1a y los valores de DICT₅₀ extrapolados para cada dilución. (sd= sin dilución, sc= conjunto de sonda-cebador)

Pocillo	Nombre de la muestra	Diana	Indicador	Inactivador	C _T	Media C _T	DICT ₅₀
A8	1A sd y 1A sc	BVD 1a	FAM	NFQ-MGB	19,09957	19,09957	7,79
E8	1A 10 ⁻¹	BVD 1a	FAM	NFQ-MGB	25,53863	25,53863	6,79
E9	1A 10 ⁻²	BVD 1a	FAM	NFQ-MGB	29,94803	29,94803	5,79
E10	1A 10 ⁻⁴	BVD 1a	FAM	NFQ-MGB	35,1481	35,1481	3,79
E11	1A 10 ⁻⁶	BVD 1a	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado	1,79
E12	1A 10 ⁻⁸	BVD 1a	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado	0,79

5

Tabla 3: se procesaron muestras de virus conocidos para cada uno de los seis virus investigados frente a un conjunto de sonda-cebador (sc) para RT-PCR de BRSV. El conjunto de sonda-cebador de BRSV no reaccionó en cruzado con ninguno de los otros virus investigados. (sd= sin dilución, sc= conjunto de sonda-cebador)

Pocillo	Nombre de la muestra	Diana	Indicador	Inactivador	C _T	Media C _T
C6	BHV sd y BRSV sc	BRSV	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado
C7	1A sd y BRSV sc	BRSV	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado
C8	PI3 sd y BRSV sc	BRSV	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado
C9	1B sd y BRSV sc	BRSV	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado
C10	BVD2 sd y BRSV sc	BRSV	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado
C11	BRSV sd y BRSV sc	BRSV	FAM	NFQ-MGB	19,72052	19,72052
C12	BRSV + CONTROL	BRSV	FAM	NFQ-MGB	21,971	21,971
DI	BRSV - CONTROL	BRSV	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado

10 **Tabla 4:** dilución log de BRSV con DICT₅₀ conocida con sus puntuaciones C_T correspondientes de la reacción con un conjunto de sonda-cebador para RT- PCR de BRSV y los valores DICT₅₀ extrapolados para cada dilución. (sd= sin dilución, sc= conjunto de sonda-cebador)

Pocillo	Nombre de la muestra	Diana	Indicador	Inactivador	C _T	Media C _T	DICT ₅₀
C11	BRSV sd y BRSV sc	BRSV	FAM	NFQ-MGB	19,72052	19,72052	5,79
H8	BRSV 10 ⁻¹	BRSV	FAM	NFQ-MGB	26,95523	26,95523	4,79
H9	BRSV 10 ⁻²	BRSV	FAM	NFQ-MGB	29,32718	29,32718	3,79
H10	BRSV 10 ⁻⁴	BRSV	FAM	NFQ-MGB	36,95991	36,95991	1,79
H11	BRSV 10 ⁻⁶	BRSV	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado	NA
H12	BRSV 10 ⁻⁸	BRSV	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado	NA

Tabla 5: se procesaron muestras de virus conocidos para cada uno de los seis virus investigados frente a un conjunto de sonda-cebador (1B sc) para RT-PCR de BVD 1b. El conjunto de sonda-cebador de BVD 1b no reaccionó en cruzado con ninguno de los otros virus investigados. (sd= sin dilución, sc= conjunto de sonda-cebador)

Pocillo	Nombre de la muestra	Diana	Indicador	Inactivador	C _T	Media C _T
H1	BHV + y 1B sc	BVD 1b	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado
H2	1A + y 1B sc	BVD 1b	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado
H3	PI3 + y 1B sc	BVD 1b	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado
H7	1B sd y 1B sc	BVD 1b	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	18,81768
H5	BVD2 + y 1B sc	BVD 1b	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado
H6	BRSV + y 1B sc	BVD 1b	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado
H4	1B + CONTROL	BVD 1b	FAM	NFQ-MGB	20,74105	20,74105
C12	1B - CONTROL	BVD 1b	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado

5 **Tabla 6:** dilución log de BVD 1b (1B) con DICT₅₀ conocida con sus puntuaciones C_T correspondientes de la reacción con un conjunto de sonda-cebador para RT-PCR de BVD 1b y los valores DICT₅₀ extrapolados para cada dilución. (sd= sin dilución, sc= conjunto de sonda-cebador)

Pocillo	Nombre de la muestra	Diana	Indicador	Inactivador	C _T	Media C _T	DICT ₅₀
H7	1B sd y 1B sc	BVD 1b	FAM	NFQ-MGB	18,81769	18,81769	7,79
H8	1B 10 ⁻¹	BVD 1b	FAM	NFQ-MGB	27,91738	27,91738	6,79
H9	1B 10 ⁻²	BVD 1b	FAM	NFQ-MGB	33,86901	33,86901	5,79
H10	1B 10 ⁻⁴	BVD 1b	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado	3,79
H11	1B 10 ⁻⁶	BVD 1b	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado	1,79
H12	1B 10 ⁻⁸	BVD 1b	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado	0,79

10 **Tabla 7:** se procesaron muestras de virus conocidos para cada uno de los seis virus investigados frente a un conjunto de cebador-sonda para RT-PCR de PI3. El conjunto de sonda-cebador de PI3 no reaccionó en cruzado con ninguno de los otros virus investigados. (sd= sin dilución, sc= conjunto de sonda-cebador)

Pocillo	Nombre de la muestra	Diana	Indicador	Inactivador	C _T	Media C _T
B1	BHV sd y PI3 sc	PI3	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado
B2	1A sd y PI3 sc	PI3	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado
B3	PI3 sd y PI3 sc	PI3	FAM	NFQ-MGB	11,23717	11,23717
B4	1B sd y PI3 sc	PI3	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado
B5	BVD2 sd y PI3 sc	PI3	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado
B6	BRSV sd y PI3 sc	PI3	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado
D5	PI3 + CONTROL	PI3	FAM	NFQ-MGB	19,16233	19,16233
D6	PI3 - CONTROL	PI3	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado

ES 2 613 537 T3

Tabla 8: dilución log de PI3 con DICT₅₀ conocida con sus puntuaciones C_T correspondientes de la reacción con un conjunto de sonda-cebador para RT-PCR de PI3 y los valores DICT₅₀ extrapolados para cada dilución. (sd= sin dilución, sc= conjunto de sonda-cebador)

Pocillo	Nombre de la muestra	Diana	Indicador	Inactivador	C _T	Media C _T	DICT ₅₀
B3	PI3 sd y PI3 sc	PI3	FAM	NFQ-MGB	11,23717	11,23717	9,44
F1	PI3 10 ⁻¹	PI3	FAM	NFQ-MGB	21,23889	21,23889	8,44
F2	PI3 10 ⁻²	PI3	FAM	NFQ-MGB	26,39993	26,39993	7,44
F3	PI3 10 ⁻⁴	PI3	FAM	NFQ-MGB	30,55147	30,55147	5,44
F4	PI3 10 ⁻⁵	PI3	FAM	NFQ-MGB	34,95575	34,95575	4,44
F5	PI3 10 ⁻⁷	PI3	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado	2,44
F6	PI3 10 ⁻⁸	PI3	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado	1,44
F7	PI3 10 ⁻¹⁰	PI3	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado	NA

5 **Tabla 9:** se procesaron muestras de virus conocidos para cada uno de los seis virus investigados frente a un conjunto de cebador-sonda para RT-PCR de BHV. El conjunto de sonda-cebador de BHV no reaccionó en cruzado con ninguno de los otros virus investigados. (sd= sin dilución, sc= conjunto de sonda-cebador)

Pocillo	Nombre de la muestra	Diana	Indicador	Inactivador	C _T	Media C _T
A1	BHV sd y BHV sc	BHV	FAM	NFQ-MGB	14,87263107	14,87263
A2	1A sd y BHV sc	BHV	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado
A3	PI3 sd y BHV sc	BHV	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado
A4	1B sd y BHV sc	BHV	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado
A5	BVD2 sd y BHV sc	BHV	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado
A6	BRSV sd y BHV sc	BHV	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado
D1	BHV + CONTROL	BHV	FAM	NFQ-MGB	11,92034817	11,92035
D2	BHV – CONTROL	BHV	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado

10 **Tabla 10:** dilución log de BHV con DICT₅₀ conocida con sus puntuaciones C_T correspondientes de la reacción con un conjunto de sonda-cebador para RT-PCR de BHV y los valores DICT₅₀ extrapolados para cada dilución. (sd= sin dilución, sc= conjunto de sonda-cebador)

Pocillo	Nombre de la muestra	Diana	Indicador	Inactivador	C _T	Media C _T	DICT ₅₀
A1	BHV sd y BHV sc	BHV	FAM	NFQ-MGB	14,87263107	14,87263	8,32
E1	BHV 10 ⁻¹	BHV	FAM	NFQ-MGB	2099085045	2099085	7,32
E2	BHV 10 ⁻²	BHV	FAM	NFQ-MGB	25,22445679	25,22446	6,32
E3	BHV 10 ⁻⁴	BHV	FAM	NFQ-MGB	29,45383453	29,45383	4,32
E4	BHV 10 ⁻⁵	BHV	FAM	NFQ-MGB	36,95075989	3695076	3,32
E5	BHV 10 ⁻⁷	BHV	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado	1,32
E6	BHV 10 ⁻⁸	BHV	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado	NA
E7	BHV 10 ⁻¹⁰	BHV	FAM	NFQ-MGB	Indeterminado	Indeterminado	NA

Referencias

Las siguientes referencias proporcionan ejemplos procedimentales u otros detalles complementarios a los expuestos en el presente documento:

- 5 Patente de Estados Unidos n.º 4.415.732 de Caruthers y col.
 Patente de Estados Unidos n.º 4.458.066 de Caruthers y col.
 Patente de Estados Unidos n.º 4.683.195 de Mullis y col.
 Patente de Estados Unidos n.º 4.683.202 de Mullis y col.
 Patente de Estados Unidos n.º 4.725.677 de Koster y col.
 Patente de Estados Unidos n.º 4.973.679 de Caruthers y col.
- 10 Patente de Estados Unidos n.º 4.980.460 de Molko y col.
 Patente de Estados Unidos n.º 5.614.388 de Picone y col.
 Agrawal y col., *Nucl. Acids Res.*, 18: 5419-5423, 1990.
 Baker, J.C., "The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection," *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.*, 11: 425-445, 1995.
- 15 Baker, J.C., Werdin, R.E., Ames, T.R., Markham, R.J., and Larson, V.L., "Study on the etiologic role of bovine respiratory syncytial virus in pneumonia of dairy calves," *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 189(1): 66-70, 1986.
 Barber, D.M., Nettleton, P.F., and Herring, J.A., "Disease in a dairy herd associated with the introduction and spread of bovine diarrhoea virus". *Vet. Rec.*, 117(18): 459-464, 1985.
 Beaucauge and Iyer, *Tetrahedron*, 48: 2223-2311, 1992.
- 20 Becher, P., Konig, M., Paton, D.J., and Thiel, H.J., "Further characterization of border disease virus isolates: evidence for the presence of more than three species within the genus pestivirus," *Virology*, 209(1): 200-206, 1995.
 Collett, M.S., R, Larson, S.K, Belzer, and E, Retzel, "Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: the genomic organization of a pestivirus," *Virology*, 165(1): 200-208, 1988.
- 25 Elbers, K., N, Tautz, P, Becher, D, Stoll, T, Rumenapf, and H.J, Thiel, "Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7," *J. Virol*, 70(6): 4131-4135, 1996.
 Fergen, B.J., "Estimating an Intervention Effect on Outcome Severity," USDA Center for Veterinary Biologics, Ames, IA, USA; Personal communication, 2004.
- 30 Finney, D.J., "Statistical method in biological assay," 3rd Ed., Charles Griffin and Company Ltd., London, 1978,
 Flores, E.F., Ridpath, J.F., Weiblen, R, y col., "Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhea virus type 2 (BVDB-2) isolates: evidence of subgenotype within BVDV-2," *Virus Res.*, 87: 51-60, 2002.
 Freshney, R.I., "Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique," Second Edition, Dept of Medical Oncology, University of Glasgow, Alan R. Liss, Inc., Publisher, New York, NY, USA, 1987.
- 35 Fulton, R.W., Hessmand, B, Johnson, B.J, y col, "Evaluation of diagnostic test used for detection of bovine viral diarrhea virus and prevalence of subtypes 1a, 1b and 2a in persistently infected cattle entering a feedlot," *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 228(4): 578-584, 2006.
 Gillespie, J.H., J.A, Baker, and K. McEntee, "A cytopathogenic strain of virus diarrhea virus," *Cornell Vet.*, 50: 73-79, 1960.
- 40 Hofmann, M.A., Brechtbuhl, K., and Stauber, N., "Rapid characterization of new pestivirus strains by direct sequencing of PCR-amplified cDNA from the 5' non-coding region," *Arch. Virol*, 139: 217-229, 1994, Holland y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7276-7280, 1991.
 Liess, B., H.R. Frey, H. Kittsteiner, F. Baumann, and W. Neumann, "Bovine mucosal disease, an immunobiological explainable late stage of BVD-MD virus infection with criteria of a 'slow virus infection,'" *Dtsch. Tieraerzti. Wschr.*, 81(2): 481-487, 1974.
- 45 Malmquist, W.A., "Bovine viral diarrhea mucosal disease: etiology, pathogenesis, and applied immunity," *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 152: 763-768, 1968.
 McNulty M.S., Allan G.M., "Application of immunofluorescence in veterinary viral diagnosis," In: *Recent advances in virus diagnosis*, McNulty MS, McFerran JB (Eds.), pp, 15-26, Martinus Nijhoff, The Hague, Netherlands, 1984,
 Olafson, P., A.D., MacCallum, and F.H. Fox, "An apparently new transmissible disease of cattle," *Cornell Vet.*, 36: 205-213, 1946.
- 50 Ozaki y col., *Nucl. Acids Res.*, 20:5205-5214, 1992.
 Paton, D.J., "Pestivirus diversity," *J. Comp. Pathol.*, 112(3): 215-236, 1995.
 Pellerin, C., J. van den Hurk, J. Lecomte, and P. Tussen, "Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities," *Virology*, 203(2): 260-268, 1994.
- 55 Ramsey, F.K., and W.H. Chivers, "Mucosal disease of cattle," *North Am. Vet.*, 34: 629-633, 1953.
 Ranheim, T. Mathis, P.K., Joelsson, D.B. y col., "Development and application of a quantitative RT-PCR potency assay for a pentavalent rotavirus vaccine (Rota Teq®)," *J. Virol. Meth.*, 131: 193-201, 2006.
 Ridpath, J.F., and Bolin, S.R., "Differentiation of types 1a, 1b, and 2 bovine virus diarrhea virus by PCR," *Molec. Cell. Probes*, 12: 101-106, 1998.
- 60 Ridpath, J.F., S.R, Bolin, and E.J, Dubovi, "Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes," *Virology*, 205(1): 66-74, 1994.
 Ridpath, J.F., Bolin, S.R., and Dubovi, E.J., "Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes," *Virology*, 205: 66-74, 1994.
 Ross, C.E., Dubovi, E.J., and Donis, R.O., "Herd problems of abortions and malformed calves attributed to bovine

viral diarrhea," J. Am. Vet. Med. Assoc., 188(6): 618-619, 1986.
 Sambrook y col., Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA, 1989.
 Sambrook and Russell, Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2001.
 5 Schalk, J.A.C., de Vries, C.G.J.C.A., and Jongen, P.M.J.M., "Potency estimation of measles, mumps and rubella trivalent vaccines with quantitative PCR infectivity assay," Biologicals, 33(2): 71-79, 2005.
 Schalk, J.A.C., Elzen, C.V.D., Ovelgonne, H. y col., "Estimation of the number of infectious measles viruses in live virus vaccines using quantitative real-time PCR," J. Virol. Meth., 117: 179-187, 2004.
 10 Schefers, J., Munoz-Zanzi, C., Collins, J.E., Goyal, S.M., and Ames, T.R., "Serological evaluation of precolostral serum samples to detect Bovine viral diarrhea virus infections in large commercial dairy herds," J. Vet. Diagn. Invest., 20: 625-628, 2008.
 Tanner, J.E., and A. P. Morgan, "Design and analysis of veterinary vaccine efficacy trials," Vet, Microbiol., 37(3-4): 221-230, 1993.
 15 Tautz, N., Elbers, K., Stoll, D., Meyers, G., and Thiel, H.J., "Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites," J. Virol., 71(7): 5415-5422, 1997,
 Thiel y col., "The pestiviruses," In Virology, Fields y col., (eds.) (Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, USA), pp, 1059-1073, 1996.
 Vilcek, S. Paton, D.J., Durkovic, B. y col, "Bovine viral diarrhea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups," Arch. Virol., 146: 99-115, 2001.
 20 Wang, F. Puddy, A.C., Mathis, B.C., y col., "Using QPCR to assign infectious potencies to adenovirus based vaccines and vectors for gene therapy: toward a universal method for the facile quantitation of virus and vector potency," Vaccine, 23: 4500-4508, 2005.
 Wiskerchen, M., and M.S, Collett, "Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhea virus is a proteinase involved in polyprotein processing," Virology, 184(1): 341-350, 1991.
 25 Wren, G., "New Thinking on BRSV: Research into BRSV and vaccines reveals new information about how the virus behaves and how it may interact with killed vaccines," Bovine Veterinarian, (February) pp, 16-19, 2001.
 Xu, J., E. Mendez, P. R. Caron, C. Lin, M.A. Murcko, M. S. Collett, and C. M. Rice, "Bovine viral diarrhea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication," J. Virol., 71(7): 5312-5322, 1997.
 30 Xue, W., D. Mattick, L. Smith, J. Umbaugh, and E. Trigo, "Vaccination with a modified-live bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 1a vaccine completely protected calves against challenge with BVDV type 1 b strains", Vaccine, 29(1): 70-76, Dec, 10, 2010, [epub ahead of print Oct, 27, 2010].

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> Eli Lilly and Company
 Weise, Dale W
 Harris, James R
 <120> COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS PARA IDENTIFICAR Y DIFERENCIAR COMPONENTES
 VÍRICOS DE VACUNAS MULTIVALENTES CONTRA LA FIEBRE DEL TRANSPORTE
 40 <130> X19558
 <150> 61/427404
 <151> 27-12-2010
 45 <160> 21
 <170> PatentIn versión 3.5
 50 <210> 1
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Construcción sintética - cebador
 <400> 1
 caccctatca ggctgtattc atagc 25
 60 <210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 613 537 T3

	<p><220> <223> Construcción sintética - cebador</p>	
5	<p><400> 2 tgcccacagc acatcttaac c</p>	21
10	<p><210> 3 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia Artificial</p>	
15	<p><220> <223> Construcción sintética - cebador</p> <p><400> 3 tcacctggac gaccc</p>	15
20	<p><210> 4 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial</p>	
25	<p><220> <223> Construcción sintética - cebador</p> <p><400> 4 gcaatgctgc aggactaggt ataataat</p>	25
30	<p><210> 5 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial</p>	
35	<p><220> <223> Construcción sintética - cebador</p> <p><400> 5 aactgtaat tgatgacccc attct</p>	25
40	<p><210> 6 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial</p>	
45	<p><220> <223> Construcción sintética - cebador</p> <p><400> 6 aagacttgta tgatgctgcc aa</p>	22
50	<p><210> 7 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia Artificial</p>	
55	<p><220> <223> Construcción sintética - cebador</p> <p><400> 7 ggtcgcccag gtaaaagca</p>	19
60	<p><210> 8 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial</p>	
65	<p><210> 8 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial</p>	

ES 2 613 537 T3

	<220>	
	<223> Construcción sintética - cebador	
5	<400> 8 gcctctgcag caccctatca	20
	<210> 9 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10		
	<220>	
	<223> Construcción sintética - cebador	
15	<400> 9 aaccgactgt tacgaatac	19
	<210> 10 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20		
	<220>	
	<223> Construcción sintética - cebador	
25	<400> 10 gctagccatg cccttagtag gac	23
	<210> 11 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30		
	<220>	
	<223> Construcción sintética - cebador	
35	<400> 11 gacgagtccc ctgtactcag g	21
	<210> 12 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
40		
	<220>	
	<223> Construcción sintética - cebador	
45	<400> 12 cagtgagtcc attggatgg	19
50	<210> 13	
	<211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
55		
	<220>	
	<223> Construcción sintética - cebador	
60	<400> 13 ggagaccaag accaaggaga tg	22
	<210> 14 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
65		

ES 2 613 537 T3

	<220>	
	<223> Construcción sintética - cebador	
5	<400> 14 cgtctgccca tgcataagg	19
	<210> 15 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10		
	<220>	
	<223> Construcción sintética - cebador	
15	<400> 15 acctcgtgca tccatag	17
	<210> 16 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20		
	<220>	
	<223> Construcción sintética - cebador	
25	<400> 16 ccatgttagc gctctggaac c	21
	<210> 17 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30		
	<220>	
	<223> Construcción sintética - cebador	
35	<400> 17 cgtctttacg gtcgacgact cc	22
	<210> 18 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
40		
	<220>	
	<223> Construcción sintética - cebador	
45		
	<400> 18 acggacgtgc gcgaa	15
50		
	<210> 19 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
55		
	<220>	
	<223> Construcción sintética - cebador	
60	<400> 19 gtcgtccagg tgaaaacggt	20
	<210> 20 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
65		

ES 2 613 537 T3

<220>
<223> Construcción sintética - cebador

5 <400> 20
gtcgtccagg tgaaaacggt 20

<210> 21
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Construcción sintética - cebador

15 <400> 21
gtcgtccagg tgaaaacggt 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para detectar la presencia de un virus BVDV1b (virus de la diarrea vírica bovina de tipo 1b) vivo, en el que el procedimiento comprende detectar un polinucleótido específico de BVDV1b en una población de polinucleótidos obtenida de una pluralidad de partículas de virus contenidas en una muestra mediante las siguientes etapas:
- (A) Diluir la muestra en (i) una placa de ensayo que contenga células bovinas cultivadas, en la que las partículas de virus puedan replicarse y (ii) una placa de referencia sin células;
- 10 (B) Realizar al menos una etapa de ciclado de una reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real en la placa de ensayo y en la placa de referencia, usando una composición que comprenda un primer cebador de amplificación oligonucleotídico específico de virus de menos de 50 nucleótidos de longitud que comprenda una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, un segundo cebador de amplificación oligonucleotídico específico de virus de menos de 50 nucleótidos de longitud que comprenda una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 y al menos una primera sonda de detección marcada, específica de virus, de menos de 50 nucleótidos de longitud que comprenda una secuencia de nucleótidos marcada de SEQ ID NO: 3,
- 15 en el que el primer cebador de amplificación y el segundo cebador de amplificación producen un producto de amplificación específico de virus,
- en el que el producto de amplificación así producido se pone en contacto con al menos la primera sonda de detección marcada, en condiciones eficaces para detectar específicamente el producto de hibridación resultante, y
- 20 en el que la detección del producto de hibridación resultante en la placa de ensayo, a un nivel más alto en comparación con el de la placa de referencia, indica la presencia del polinucleótido específico de BVDV1b de un virus BVDV1b vivo.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la población de polinucleótidos se obtiene de una pluralidad de partículas de virus vivos atenuados.
- 25 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la población de polinucleótidos se obtiene de una pluralidad de partículas de virus vivos atenuados contenida en una vacuna de mamífero.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la vacuna de mamífero es una vacuna contra el complejo de la enfermedad respiratoria bovina (BRDC) o fiebre del transporte.