

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 064**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.01.2012 PCT/US2012/020997**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.07.2012 WO12097105**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2012 E 12702092 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2663658**

54 Título: **Materiales y procedimiento para detectar citomegalovirus (CMV)**

30 Prioridad:

12.01.2011 US 201161432012 P

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

01.03.2018

73 Titular/es:

**ABBOTT MOLECULAR INC. (100.0%)
1300 East Touhy Avenue
Des Plaines, IL 60018, US**

72 Inventor/es:

**HO, SHIAOLAN Y. y
BARRY, CATHERINE P.**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 657 064 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

Materiales y procedimiento para detectar citomegalovirus (CMV)

5 CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente descripción se refiere a la detección de CMV en una muestra biológica, en particular, plasma y sangre entera, mediante un procedimiento basado en ácidos nucleicos, tal como la amplificación de ácidos nucleicos, en particular, la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR en tiempo real), y materiales, tales como cebadores, sondas y kits, para utilizar en tales procedimientos.

ANTECEDENTES

[0002] El CMV es un virus de tipo herpes ubicuo que tiene un genoma de ADN bicatenario lineal de aproximadamente 236.000 kpb (Gibson, "Structure and Formation of the Cytomegalovirus Virion" Human Cytomegalovirus, Curr Topics in Microbiol Immunol 325: 187-204, Shenk y Stinski, eds., Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2008)). El genoma de CMV está organizado como dos regiones de secuencias únicas, larga única (UL) y corta única (US) (Kotenko et al, PNAS USA. 97 (4): 1695-1700 (15 Febrero, 2000)). La región UL está flanqueada por un conjunto de repeticiones invertidas, repetición terminal larga (TRL) y repetición interna larga (IRL; repetición de TRL invertida), y la región US está flanqueada por otro conjunto de repeticiones invertidas, repetición interna cortos (IRS; repetición invertida de TRS) y TRS (repetición terminal corta) (Kotenko et al (2000), supra; véase, también, Dunn et al, PNAS 100 (24): 14223-14228 (25 Noviembre 2003)).

[0003] El CMV infecta el 40-80% de los seres humanos antes de la pubertad. El CMV se hace latente después de la infección primaria, que a menudo es asintomática. Incluso la infección recurrente es asintomática en la mayoría de los casos o sólo conduce a una enfermedad leve en un huésped inmunocompetente. Sin embargo, en recién nacidos infectados congénitamente y pacientes inmunocomprometidos, tales como receptores de aloinjertos (Meyers et al, J. Infect Dis 153: 478-488 (1986)) o pacientes con el síndrome de deficiencia autoinmune (SIDA) (Drew, J. Infect Dis. 158: 449-456 (1988); y Drew, Clin Infect Dis 14: 608-615 (1992)), el CMV puede causar enfermedades graves y a veces potencialmente mortales, incluyendo retinitis, trastornos gastrointestinales (véase, por ejemplo, lesión aguda de la mucosa gástrica (AGML) según ha descrito Matsui et al, Internal Medicine. 49: 1265-1267 (2010)), y la encefalitis (Drew (1992), supra). La mitad de los receptores de células madre alogénicas desarrollan infección por CMV en los primeros 100 días después del trasplante (de la Cruz-Vicente et al, Transplant Proc 42 (8): 3230-3231 (Octubre 2010)). La enfermedad de órgano final por CMV es una complicación grave, frecuente de trasplante de células madre alogénicas (de la Cruz-Vicente et al, Transplant Proc 42 (8): 3228-3229 (Octubre 2010)).

[0004] La administración temprana de fármacos antivirales (por ejemplo, ganciclovir y foscarnet) puede tener efectos beneficiosos significativos en el pronóstico de un paciente (Jahn et al., Intervirology 35: 60-72 (1993); Schmidt et al., N. Engl. J. Med. 324: 1005-1011 (1991)). Dado que está disponible una terapia antiviral clínicamente eficaz, un diagnóstico precoz y sensible es significativamente importante.

[0005] Se han utilizado varios procedimientos para ensayar el CMV. Los anticuerpos anti-CMV, en particular los anticuerpos IgM, se pueden utilizar como un marcador para la infección por CMV. Sin embargo, la detección de anticuerpos anti-CMV tiene un valor limitado en la discriminación de la infección latente y activa. Naumnik et al. (Transplant Proc 39 (9): 2748-2750 (Noviembre 2007)) han descrito que la detección de anticuerpos CMV-IgM mediante diversos inmunoensayos no es lo suficientemente sensible para el diagnóstico y no puede ser utilizado para el control durante el periodo activo en los receptores de trasplante renal.

[0006] Los procedimientos de detección viral más empleados actualmente no permiten sin ambigüedades la predicción de si una infección determinada se convertirá en sintomática. Los procedimientos serológicos son indirectos y, a menudo carecen de sensibilidad. Aunque el cultivo viral es un parámetro de diagnóstico más directo para la viremia de CMV, tal como el cultivo viral de células de la sangre, el procedimiento es técnicamente difícil y no permite un diagnóstico rápido. Además, el cultivo viral no se corresponde necesariamente con la enfermedad por CMV. El aislamiento de virus a partir de leucocitos periféricos puede no predecir los síntomas clínicos en algunos pacientes inmunodeprimidos (Delgado et al, J. Clin Microbiol 30: 1876-1878 (1992)). Del mismo modo, la eliminación urinaria o faríngea del virus se produce con frecuencia sin síntomas clínicos ni afectación de órganos. La amplificación del ADN de CMV en leucocitos periféricos usando PCR puede detectar ocasionalmente ADN de CMV, tal como genomas virales latentes, en leucocitos periféricos sin enfermedades relacionadas con el CMV (Jahn et al (1993), supra; Zipeto et al, J. Clin Microbiol. 30: 527-530 (1992); y Delgado et al (1992), supra). El ensayo de antigenemia se ha utilizado con frecuencia para el diagnóstico precoz de la infección por CMV sintomática aguda.

[0007] El ensayo de antigenemia implica la detección de la proteína estructural pp65 usando anticuerpos específicos (Storch et al., J. Clin. Microbiol., 32: 997-1003 (1994); Gerna et al., J. Infect. Dis. 164: 488-498 (1991) y Gerna et al., J. Clin. Microbiol., 30: 1232-1237 (1992)). Sin embargo, el número de células positivas para pp65 puede ser muy bajo en la fase inicial de la infección, y la estabilidad de la proteína pp65 parece ser limitada (Chou et al., Curr. Opin. Infect. Dis. 5: 427-432 (1991)) Además, el ensayo de antigenemia requiere un procesamiento de muestras inmediato

y sufre una falta de estandarización en el procesamiento de muestras entre laboratorios, un reflejo inexacto de la carga viral en el compartimiento de sangre, resultados negativos ocasionales en presencia de enfermedad por CMV, un procedimiento laborioso y lento, incapacidad para ser automatizado, una falta de viabilidad durante periodos de neutropenia, y una falta de objetividad de cuantificación (Choi et al. (2009), supra; Gimeno et al., J. Clin. Microbiol. 46 (1): 3311 - 3318 (octubre de 2008; epub 8.27.08)).

[0008] Puesto que la replicación viral requiere la transcripción, se ha investigado la presencia de ARNm de CMV como un marcador de la infección activa por CMV (Bitsch et al, J. Infect Dis 167: 740-743 (1993)). Se ha utilizado la amplificación del ARN (Bitsch et al (1993), supra; Meyer et al, Mol Cell Probes 8: 261-271 (1994); y Gerna et al (1992), supra.). Sillekens et al. (Patente de Estados Unidos No. 6.306.602 B1, EP 0 729 518 B1, EP 0 973 948 B1, CA 2 172 142, y CA 2 281 793) describe que la detección de un determinado ARNm tardío, a saber, la secuencia génica que codifica la proteína de tegumento de matriz pp67 (UL65), que se expresa durante la fase tardía de la infección por CMV, está relacionada con la aparición de los síntomas clínicos de la enfermedad por CMV. El análisis de transcritos tempranos inmediatas 1 (IE1) y temprana inmediata 2 (IE2) (Loh et al, Acta Virol 53 (4): 261-269 (2009)) y transcritos de gen R (kit CMV R-gene™ (Argene, Inc., Shirley, NY); Marque-Juillet et al, Pathol Biol (Paris) 58 (2): 162-165 (Abril 2010; epub 10.24.09)) también se ha descrito. El kit CMV HHV6,7,8 R-gene™ Argene, Inc. (Shirley, NY), según se informa permite la detección de transcritos de ppUL83 para CMV, junto con transcritos U57 para HHV-6, transcritos U42 para HHV-7, y transcritos ORF26 de HHV-8 (véase, también, Raggam et al, Med Microbiol Immunol (4) 199: 311-316 (Noviembre 2010; epub 06/18/10). Un procedimiento de PCR-ELISA que utiliza cebadores para la glicoproteína H (GH5) ha sido descrita por Allen et al, J. Clin Microbiol 33 (3): 725-728 (Marzo 1995)).

[0009] Aunque la PCR en tiempo real se considera ampliamente como una técnica eficiente y altamente sensible para la evaluación de la cinética del ADN del CMV (Hong et al., Clin. Chem. 50: 846-856 (2004); Kearns et al., J. Clin. Microbiol., 39: 2364-2365 (2001); Piiparinen et al., J. Clin. Virol., 30: 258-266 (2004); y van Doornum et al., J. Clin. Microbiol. 41: 576-580. (2003)), la sensibilidad y fiabilidad de la detección de ADN de CMV depende en gran medida de la secuencia diana y la selección del cebador, ya que existe una variación de secuencia entre las cepas de CMV en todo el genoma (véase, por ejemplo, Caliendo et al., J. Clin. Microbiol. 38: 2122-2157 (2000) y Gault et al., J. Clin. Microbiol., 39: 772-775 (2001)). Chou (J. Clin. Microbiol. 30 (9): 2307-2310 (Septiembre 1992)) comparó la secuencia de exón 4 de la región temprana inmediata de seis cepas clínicas de CMV con dos cepas de laboratorio y encontraron una variación inter-cepa del 8,1% a nivel de péptido y el 18% de variación inter-cepa a nivel de nucleótidos en 407 codones en el exón 4. La variación se produjo según se informa esporádicamente en todo el exón sin agrupamiento aparente de cepa. Chou et al. también informaron que algunos de los cebadores oligonucleotídicos publicados propuestos para la amplificación de las secuencias del exón 4 en la detección diagnóstica de CMV mediante PCR mostraron desajustes de secuencia con las cepas examinadas. Dichos desajustes según se informa redujeron la sensibilidad de amplificación en hasta 100 veces.

[0010] Se han utilizado numerosas dianas génicas de CMV para la amplificación y cuantificación por PCR. Los ejemplos incluyen la región HindIII X (Wolff et al., J. Molec. Diag. 11(2): 87-92 (2009)), UL 117 (Wolff et al. (2009), supra), UL123 (Wolff et al. (2009, supra); Ducroux et al., J. Clin. Microbiol. 46(6): 2078-2080 (2008); y Gimeno et al., J. Clin. Micro. 46(10): 3311-3318 (2008)), UL125 (Boeckh et al., J. Clin Micro. 42(3): 1142-1148 (2004)), UL126 (Boeckh et al. (2004), supra), UL54 (Wolff et al. (2009), supra; Fukushima et al., J. Virol. Meth. 151: 55-60 (2008); Sanghavi et al., J. Clin. Virol. 42: 335-342 (2008); y Hantz et al., Antiviral Res. 81: 64-67 (2009)), UL55 (Wolff et al. (2009), supra; Fukushima et al. (2008), supra; Bourne et al., Virol. 382: 28-36 (2008); y Pang et al., J. Clin. Micro. 46(12): 4004-4010 (2008)), UL55/UL123 (Boeckh et al. (2004), supra; y Limaye et al., JAMA 300(4): 413-422 (2008)), UL73 (Bourne et al. (2008), supra), UL74 (Bourne et al. (2008), supra), UL75 (Fukushima et al. (2008), supra), UL83 (Wolff et al. (2009), supra; Ducroux et al. (2008), supra; y Fukushima et al. (2008), supra), y US 17 (Sanghavi et al. (2008), supra).

[0011] Habbal et al. (J. Med Microbiol 58: 878-883 (2009)) describen la sensibilidad comparativa de cebadores publicados para un ensayo de PCR en tiempo real de una sola ronda de CMV. Se encontró que tres conjuntos de cebadores situados en la región del gen de glicoproteína B (UL55) eran los más sensibles en el análisis de la cepa de CMV AD169; sin embargo, dos de los tres conjuntos de cebadores mostraron un considerable número de desajustes con aislados clínicos en una búsqueda BLAST. Otros dos pares de cebadores del gen de la fosfoproteína de matriz inferior (UL83) y el gen de la ADN polimerasa (UL54) mostraron sensibilidad razonable y ningún desajuste con aislados clínicos. Una prueba adicional indicó que el grupo de cebadores de UL55, que no mostró un considerable número de desajustes con aislados clínicos mediante la búsqueda BLAST, y el grupo de cebadores de UL54 eran los más sensibles. Además, la sensibilidad analítica de la PCR se correlacionó inversamente con el tamaño del producto de PCR. Habbal et al. sugieren un par de cebadores para el gen de UL55 como candidato para una PCR estandarizada para CMV.

[0012] Mendez et al. (J. Clin Microbiol 36 (2): 526-530 (febrero de 1998)) evaluaron cebadores de PCR para el diagnóstico precoz de la infección por CMV después del trasplante de hígado. Se ensayaron leucocitos de sangre periférica (PBL) y suero. Los pares de cebadores dirigidos a la región del fragmento HindIII-X de CMV detectaron según se informa ADN diana con una sensibilidad del 94%, en comparación con 87% de sensibilidad con los pares de cebadores dirigidos a un fragmento D de *EcoRI*, una sensibilidad del 32% con pares de cebadores dirigidos al

gen de antígeno temprano inmediato 1 (IEA1), y una sensibilidad del 20% con pares de cebadores dirigidos al gen principal temprano inmediato (MIE). La sensibilidad de los cebadores para la amplificación del ADN de CMV asociado con infección sintomática varió según los informes del 100% (*HindIII*-X) al 20% (MIE); la especificidad según los informes estaba inversamente relacionada con la sensibilidad (45% para *HindIII*-X y 91% para MIE). El ADN de CMV de PBL era según los informes una diana más sensible para *HindIII*-X y conjuntos de cebadores de *EcoRI*-D. En general, se encontraron que los cebadores dirigidos a la región de fragmento *HindIII*-X eran óptimos para la detección temprana de ADN de CMV en PBL y sueros de receptores de trasplante de hígado sintomáticos.

[0013] Boeckh et al. (J. Clin Microbiol 42 (3): 1142-1148 (marzo de 2004)) compararon el ensayo de PCR de plasma usando tres conjuntos de cebadores diferentes (UL125 solo, UL126 solo, y UL55/UL123-exón 4) con ensayo de antigenemia de pp65 y cultivo de sangre. Boeckh et al. informaron que el PCR de plasma detectaba CMV con más frecuencia en muestras de sangre que el ensayo de antigenemia o cultivos de sangre. El ensayo de PCR que emplea los cebadores UL55/UL123-exón 4 se comportó según los informes mejor que el ensayo de PCR que empleaba cebadores para UL125 o UL126 con respecto a la sensibilidad, especificidad y valor predictivo en comparación con el ensayo de antigenemia.

[0014] Gimeno et al. (J. Clin. Microbiol. 46 (10): 3311-3318 (octubre de 2008; epub 8.27.08) comparó un ensayo de PCR en tiempo real automatizado (kit de PCR para citomegalovirus, Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL) con el ensayo de antigenemia en la vigilancia de la infección activa por CMV en 42 receptores del trasplante de células madre hematopoyéticas alogénicas. Gimeno et al. encontraron que el ensayo de PCR en tiempo real permitió un diagnóstico más temprano de CMV a partir de la sangre. El análisis de la cinética de los niveles de ADNemia en una mediana de siete días postratamiento permitió la predicción de la respuesta al tratamiento de CMV. El ensayo de PCR resultó según los informes positivo antes del inicio de los síntomas y durante el período de la enfermedad para dos pacientes que desarrollaron colitis por CMV.

[0015] También se ha evaluado el uso de tres conjuntos diferentes de cebadores (IE, LA, y gB) en el ensayo de PCR de aislados virales y el uso de cebadores gB en el ensayo de PCR de la orina y de manchas de sangre seca (DBS) en Guthrie Cards (Distéfano et al, BMC Pediatr. 4: 11 (junio de 2004)). Los cebadores dirigidos a la región del fragmento de gB eran según los informes la mejor opción para la detección por PCR de ADN de CMV en los aislados positivos.

[0016] La prueba AMPLICOR CMV PCR (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ) emplea cebadores que se dirigen a una región del gen de la polimerasa (UL54). La prueba es según los informes específico y sensible y tiene un límite de detección adecuado para detectar CMV en el líquido cefalorraquídeo (CSF) del 95% de los pacientes con la enfermedad neurológica de CMV (Weinberg et al, J. Clin Microbiol 36 (11): 3382 -3384 (Noviembre 1998)).

[0017] La región del gen de la polimerasa se ha sugerido que es una mejor opción que la región principal temprana inmediata (MIE) para la selección de cebadores (Wirgart et al, J. Clin Microbiol 36 (12): 3662-3669 (Diciembre 1998); ver, también, Thorne et al, Diagn Mol Pathol 16 (2): 73-80 (junio de 2007)). Sin embargo, Leruez-Ville et al. (J. Clin Microbiol 46 (4): 1571-1572 (abril de 2008)) han informado que la PCR en tiempo real empleando cebadores dirigidos a una secuencia estrictamente conservada en el exón 4 de MIE era mucho más sensible que el ensayo de antigenemia de pp65, y se comparó favorablemente con la PCR en tiempo real del gen R de CMV (Argene, Francia), excepto a niveles de carga de ADN cerca de los valores del umbral de las dos técnicas.

[0018] La PCR RealArt CMV LightCycler PCR de Qiagen (Qiagen, Germantown, MD), que emplea cebadores que se dirigen a la región MIE de CMV se comparó con la PCR de reactivo específico de analito UL54 de CMV de Roche (Roche Molecular Systems, Inc., Indianapolis, IN), que emplea cebadores que se dirigen a UL54, y la prueba de ADN de CMV del sistema de captura híbrido Digene (versión 2.0; Digene Corp., Gaithersburg, MD), que es un ensayo de captura de anticuerpos de hibridación en solución para la detección quimioluminiscente y cuantificación de ADN de CMV en leucocitos, por Hanson et al. (J. Clin Microbiol 45 (6): 1972-1973 (junio de 2007)) usando patrones de virus enteros y las muestras de plasma de los receptores de trasplante de células madre alogénicas. Las pruebas de Qiagen y Roche eran según los informes más sensible que la prueba Digene, detectaron ADN de CMV más temprano después del trasplante, y siguieron siendo positivos más tiempo una vez se inició el tratamiento antiviral.

[0019] Koidl et al. (J. Virol. Procedimientos 154 (1-2): 210-212 (Dic 2008); epub 01/10/08) evaluaron un ensayo de ADN de CMV en sangre entera conservada con EDTA y plasma conservado con EDTA utilizando dos procedimientos comercialmente disponibles de detección, es decir, el kit CMV HHV6,7,8 R-gene™ de Argene, Inc. (Shirley, NY) y el kit artus CMV LC PCR (Qiagen, Hamburg, Alemania). Se encontró que sangre entera conservada con EDTA era superior a plasma conservado con EDTA cuando se utilizó el el kit CMV HHV6,7,8 R-gene™.

[0020] Según lo informado por Habbal et al. ((2009), supra), varios estudios de evaluación han demostrado diferencias significativas en la sensibilidad de varios PCR internos (también denominados de preparación casera) y comerciales (véase, por ejemplo, Allen et al. (1995), supra; Distéfano et al. (2004), supra, Weinberg y otros (1998), supra y Wirgart (1998), supra). Además, los cebadores usados con mayor frecuencia no han podido detectar CMV en algunos aislados (véase, por ejemplo, Allen et al., (1995), supra, Distéfano et al. (2004), supra, y Wirgart et al.,

(1998), supra.) Habbal et al. concluye que tales observaciones implican que la región diana más apropiada para la amplificación aún no se ha definido, y que la estandarización todavía es necesaria para resultados de PCR fiables y comparables. Además, como destacan Gimeno et al. ((2008), supra) y apoyado argumentalmente por Koidl et al. ((2008), supra), el rendimiento analítico también se ve afectado por los procedimientos de detección y extracción. En este sentido, Xue et al. (Clin Chem. Lab Med. 47 (2): 177-181 (2009)) concluyó que la PCR debe usarse en combinación con la prueba de antigenemia para controlar la infección por CMV y predecir su resultado, al menos en el contexto del trasplante renal. Gimeno et al. ((2008), supra), por otro lado, opinan que la PCR en tiempo real presenta varias ventajas sobre el ensayo de antigenemia para controlar la infección activa por CMV en pacientes de trasplante de células madre alogénicas. Dichas ventajas incluyen un diagnóstico precoz de la infección activa por CMV, un marcador más fiable de la eliminación exitosa de CMV de la sangre y la posible predicción de la respuesta al tratamiento del CMV mediante análisis de la cinética de la ADNemia de CMV en el momento del inicio de la terapia preventiva o poco después.

[0021] El documento titulado "Collaborative Study to Evacuate the Proposed 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification (NAT)-Based Assays", por J. Fryer et al. (18.10.2010) describe un ensayo para detectar CMV que comprende la amplificación de UL34 y UL80.5.

[0022] En vista de lo anterior, sigue existiendo una necesidad de cebadores y sondas de oligonucleótidos para la amplificación y detección subsiguiente de CMV que sean específicos, sensibles, y tengan un límite de detección adecuado para detectar CMV en cualquier muestra de fluido biológico, en particular sangre o plasma. Deseablemente, los cebadores y sondas permiten la detección de la mayoría de cepas de CMV, e incluso de manera más deseable, todas las cepas de CMV. La presente descripción pretende proporcionar más cebadores y sondas de oligonucleótidos que, cuando se usan en combinación en un ensayo de PCR de CMV, proporcionan un ensayo muy robusto que no sólo es específico y sensible, sino altamente reproducible. Este y otros objetivos y ventajas, así como características inventivas, resultarán evidentes a partir de la descripción detallada proporcionada en este documento.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA

[0023] Se proporciona un procedimiento de amplificación de secuencias de ácido nucleico de citomegalovirus (CMV) en una muestra. El procedimiento comprende (a) formar una mezcla que comprende la muestra, los reactivos de amplificación de ácidos nucleicos, un par de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34, y un par de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5, y (b) someter la mezcla a condiciones que promueven la amplificación de la secuencia de ácido nucleico UL34 y la secuencia de ácido nucleico UL80.5. Los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 pueden amplificar una secuencia de ácido nucleico en la región desde aproximadamente el nucleótido 29 a aproximadamente el nucleótido 79 de la secuencia del dominio de codificación (CDS) de UL34. Uno de los pares de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 puede hibridar específicamente con la CDS de UL34 en la región desde aproximadamente el nucleótido 2 a aproximadamente el nucleótido 29, y el otro del par de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 puede hibridar específicamente con la CDS de UL34 en la región desde aproximadamente el nucleótido 78 a aproximadamente el nucleótido 106. Los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 puede comprender, o consistir esencialmente en, (i) 5' TGA ACT TCA TCA TCA CCA CCC GAG ACT 3' [SEQ ID NO: 49] como cebador directo, y (ii) 5' CCT TGT ACG CTT TGG AAA TCG AGC CTG 3' [SEQ ID NO: 50] como cebador inverso. Los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 pueden amplificar una secuencia de ácido nucleico en la región de aproximadamente 2025 a aproximadamente 2080 de la CDS de UL80.5. Uno de los pares de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 puede hibridar específicamente con la CDS de UL80.5 en la región de aproximadamente 2005 a aproximadamente 2025, y el otro par de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 puede hibridar específicamente con la CDS de UL80.5 en la región desde aproximadamente el nucleótido 2078 hasta aproximadamente el nucleótido 2105. Los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 puede comprender, o consistir esencialmente en, (i) 5' CGG CTA GTG TCG TGT TAG C 3' [SEC ID NO: 16] como cebador directo, y (ii) 5' CAC AAA AAT CCG CCG ATT CAG ATC 3' [SEQ ID NO: 47] como cebador inverso. La mezcla de (a) puede comprender además un ácido nucleico de control interno (IC) y un par de cebadores para amplificar el ácido nucleico de IC, en cuyo caso las condiciones en (b) también promueven la amplificación del ácido nucleico de IC. El procedimiento puede comprender, además, simultánea o posteriormente, detectar la presencia, cantidad o concentración de CMV en la muestra; cuando se detecta simultáneamente la mezcla en (a) puede comprender además una sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 y una sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5. La sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 puede hibridar específicamente con la CDS de UL34 en la región desde aproximadamente el nucleótido 29 a aproximadamente el nucleótido 79, tal como en la región desde aproximadamente el nucleótido 33 a aproximadamente el nucleótido 59. La secuencia de nucleótidos de la sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 puede comprender, o consistir esencialmente en, 5' CG ACG ATT CAG TCC TGC GAG CC 3' [SEQ ID NO: 51]. La sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 puede hibridar específicamente con la CDS de UL80.5 en la región de aproximadamente 2025 a aproximadamente 2080, tal como en la región desde aproximadamente el

nucleótido 2040 hasta aproximadamente el nucleótido 2062. La secuencia de nucleótidos de la sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 puede comprender, o consistir esencialmente en, 5' AAGCCGCCGAGCTTCCCAG 3' [SEQ ID NO: 52]. Preferiblemente, la sonda está marcada con FAM y se inactiva por BHQ-1. El procedimiento puede comprender, además, simultánea o posteriormente, detectar la presencia, cantidad o concentración de IC en la muestra.

[0024] También se proporciona un conjunto de cebadores. El conjunto de cebadores comprende un par de cebadores directo e inverso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 de CMV y un par de cebadores directo e inverso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 de CMV. El par de cebadores directo e inverso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 de CMV puede amplificar una secuencia de ácido nucleico en la región desde aproximadamente el nucleótido 29 a aproximadamente el nucleótido 79 de la CDS de UL34, y el par de cebadores directo e inverso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 de CMV puede amplificar una secuencia de ácido nucleico en la región de aproximadamente 2025 a aproximadamente 2080 de la CDS de UL80.5. Uno de los pares de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 puede hibridar específicamente con la CDS de UL34 en la región desde aproximadamente el nucleótido 2 a aproximadamente el nucleótido 29, y el otro par de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 puede hibridar específicamente con la CDS de UL34 en la región desde aproximadamente el nucleótido 78 a aproximadamente el nucleótido 106. Uno de los pares de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 puede hibridar específicamente con la CDS de UL80.5 en la región de aproximadamente 2005 a aproximadamente 2025, y el otro par de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 puede hibridar específicamente con la CDS de UL80.5 en la región desde aproximadamente el nucleótido 2078 hasta aproximadamente el nucleótido 2105. Los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 puede comprender, o consistir esencialmente en, (i) 5' TGA ACT TCA TCA TCA CCA CCC GAG ACT 3' [SEQ ID NO: 49] como cebador directo, y (ii) 5' CCT TGT ACG CTT TGG AAA TCG AGC CTG 3' [SEQ ID NO: 50] como cebador inverso, y los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 pueden comprender, o consistir esencialmente en, (i') 5' CGG CTA GTG TCG TGT TAG C 3' [SEQ ID NO: 16] como cebador directo, y (ii') 5' CAC AAA AAT CCG CCG ATT CAG ATC 3' [SEQ ID NO: 47] como cebador inverso.

[0025] También se proporciona un conjunto de sondas. El conjunto de sondas comprende una sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 de CMV y una sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 de CMV. La sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 puede hibridar específicamente con la CDS de UL34 en la región desde aproximadamente el nucleótido 29 a aproximadamente el nucleótido 79, tal como de aproximadamente el nucleótido 33 a aproximadamente el nucleótido 59, y la sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 puede hibridar específicamente con la CDS de UL80.5 en la región de aproximadamente 2025 y aproximadamente 2080, tal como desde aproximadamente el nucleótido 2040 hasta aproximadamente el nucleótido 2062. La secuencia de nucleótidos de la sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 puede comprender, o consistir esencialmente en, 5' CG ACG ATT CAG TCC TGC GAG CC 3' [SEQ ID NO: 51], y la secuencia de nucleótidos de la sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 puede comprender, o consistir esencialmente en, 5' AAGCCGCCGAGCTTCCCAG 3' [SEQ ID NO: 52]. Preferiblemente, la sonda está marcada con FAM y se inactiva con BHQ-1.

[0026] Aún además se proporciona un kit para la amplificación de secuencias de ácido nucleico de CMV en una muestra. El kit comprende (i) un conjunto de cebadores que comprenden un par de cebadores directo e inverso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 de CMV y un par de cebadores directo e inverso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 de CMV y (ii) instrucciones para utilizar el conjunto de cebadores en la amplificación de secuencias de ácido nucleico de CMV y/o uno o más reactivos para utilizar los conjuntos de cebadores en la amplificación de secuencias de ácido nucleico de CMV. El par de cebadores directo e inverso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 de CMV puede amplificar una secuencia de ácido nucleico en la región desde aproximadamente el nucleótido 29 a aproximadamente el nucleótido 79 de la CDS de UL34, y el par de cebadores directo e inverso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 de CMV puede amplificar una secuencia de ácido nucleico en la región de aproximadamente 2025 a aproximadamente 2080 de la CDS de UL80.5. Uno de los pares de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 puede hibridar específicamente con la CDS de UL34 en la región desde aproximadamente el nucleótido 2 a aproximadamente el nucleótido 29, y el otro par de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 puede hibridar específicamente con la CDS de UL34 en la región desde aproximadamente el nucleótido 78 a aproximadamente el nucleótido 106. Uno de los pares de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 puede hibridar específicamente con la CDS de UL80.5 en la región de aproximadamente 2025 a aproximadamente 2025, y el otro par de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 puede hibridar específicamente con la CDS de UL80.5 en la región desde aproximadamente el nucleótido 2078 hasta aproximadamente el nucleótido 2105. Los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 puede comprender, o consistir esencialmente en, (i) 5' TGA ACT TCA TCA TCA CCA CCC GAG ACT 3' [SEQ ID NO: 49] como cebador directo, y (ii) 5' CCT TGT ACG CTT TGG AAA TCG AGC CTG 3' [SEQ ID NO: 50] como cebador inverso, y los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 pueden comprender, o consistir esencialmente en, (i') 5' CGG CTA GTG

TCG TGT TAG C 3' [SEQ ID NO: 16] como cebador directo, y (ii') 5' CAC AAA AAT CCG CCG ATT CAG ATC 3' [SEQ ID NO: 47] como cebador inverso. El kit puede comprender además (i) una sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 de CMV y una sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 de CMV y (II) instrucciones para utilizar las sondas en la detección de amplificación de secuencias de ácido nucleico de CMV y/o uno o más reactivos para utilizar las sondas en la detección de la amplificación de secuencias de ácido nucleico de CMV. La sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 puede hibridar específicamente con la CDS de UL34 en la región desde aproximadamente el nucleótido 29 a aproximadamente el nucleótido 79, y la sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 puede hibridar específicamente con la CDS de UL80.5 en la región de aproximadamente 2025 y aproximadamente 2080. La sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 pueden hibridarse específicamente con la CDS de UL34 en la región desde aproximadamente el nucleótido 33 a aproximadamente el nucleótido 59, y la sonda para detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 puede hibridar específicamente con la CDS de UL80.5 en la región desde aproximadamente el nucleótido 2040 hasta aproximadamente el nucleótido 2062. La secuencia de nucleótidos de la sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 puede comprender, o consistir esencialmente en 5' CG ACG ATT CAG TCC TGC GAG CC 3' [SEQ ID NO: 51], y la secuencia de nucleótidos de la sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 puede comprender, o consistir esencialmente en 5'AAGCCGCCGAGCTTCCCAG 3' [SEQ ID NO: 52]. La sonda se marca preferiblemente con FAM y se inactiva con BHQ-1.

[0027] Basándose en la descripción que está contenida en el presente documento, la presente invención proporciona un procedimiento de amplificación de secuencias de ácido nucleico UL34 y UL80.5 de citomegalovirus (CMV) en una muestra, cuyo procedimiento comprende:

(a) formar una mezcla que comprende la muestra, reactivos de amplificación de ácidos nucleicos, un par de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34, y un par de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5; y

(b) someter la mezcla a condiciones que promueven la amplificación de la secuencia de ácido nucleico UL34 y la secuencia de ácido nucleico UL80.5,

con lo cual las secuencias de ácido nucleico UL34 y UL80.5 de CMV en una muestra se amplifican, en el que:

(i) los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 comprenden:

5' TGA ACT TCA TCA TCA CCA CCC GAG ACT 3' [SEQ ID NO: 49] como cebador directo y
5' CCT TGT ACG CTT TGG AAA TCG AGC CTG 3' [SEC ID NO: 50] como cebador inverso; o

(ii) los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 consisten en:

5' TGA ACT TCA TCA TCA CCA CCC GAG ACT 3' [SEQ ID NO: 49] como cebador directo y
5' CCT TGT ACG CTT TGG AAA TCG AGC CTG 3' [SEQ ID NO: 50] como cebador inverso, y en el que:

(i) los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 comprenden:

5' CGG CTA GTG TCG TGT TAG C 3' [SEC ID NO: 16] como cebador directo y
5' CAC AAA AAT CCG CCG ATT CAG ATC 3' [SEQ ID NO: 47] como cebador inverso; o

(ii) los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 consisten en:

5' CGG CTA GTG TCG TGT TAG C 3' [SEC ID NO: 16] como cebador directo y
5' CAC AAA AAT CCG CCG ATT CAG ATC 3' [SEQ ID NO: 47] como cebador inverso.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un conjunto de cebadores que comprenden un par de cebadores directo e inverso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 de CMV y un par de cebadores directo e inverso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 de CMV, en el que:

(i) los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 comprenden:

5' TGA ACT TCA TCA TCA CCA CCC GAG ACT 3' [SEQ ID NO: 49] como cebador directo y
5' CCT TGT ACG CTT TGG AAA TCG AGC CTG 3' [SEQ ID NO: 50] como cebador inverso,

y los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 comprenden:

5' CGG CTA GTG TCG TGT TAG C 3' [SEC ID NO: 16] como cebador directo y

5' CAC AAA AAT CCG CCG ATT CAG ATC 3' [SEQ ID NO: 47] como cebador inverso; o

(ii) los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 consisten en:

5' TGA ACT TCA TCA TCA CCA CCC GAG ACT 3' [SEQ ID NO: 49] como cebador directo y
5' CCT TGT ACG CTT TGG AAA TCG AGC CTG 3' [SEQ ID NO: 50] como cebador inverso,

y los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 consisten en:

5' CGG CTA GTG TCG TGT TAG C 3' [SEC ID NO: 16] como cebador directo y

5' CAC AAA AAT CCG CCG ATT CAG ATC 3' [SEQ ID NO: 47] como cebador inverso.

[0028] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un conjunto de sondas que comprende una sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 de CMV y una sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 de CMV, en el que la sonda está marcada opcionalmente con FAM y se inactiva con BHQ-1, en el que:

(i) la secuencia de nucleótidos de la sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 comprende:

5' CG ACG ATT CAG TCC TGC CC GAG 3' [SEC ID NO: 51]

y la secuencia de nucleótidos de la sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 comprende:

5'AAGCCGCCGAGCTTCCCAG 3' [SEQ ID NO: 52]; o

(ii) la secuencia de nucleótidos de la sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 consiste en:

5' CG ACG ATT CAG TCC TGC GAG CC 3' [SEQ ID NO: 51]

5 y la secuencia de nucleótidos de la sonda para detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 consiste en:

5'AAGCCGCCGAGCTTCCCAG 3' [SEQ ID NO: 52].

10 **[0029]** En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un kit para la amplificación de secuencias de ácido nucleico de CMV en una muestra, en el que el kit comprende (i) un conjunto de cebadores que comprende un par de cebadores directo e inverso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 de CMV y un par de cebadores directo e inverso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 de CMV y (ii) instrucciones para utilizar el conjunto de cebadores en la amplificación de secuencias de ácido nucleico de CMV y/o uno o más reactivos para utilizar los conjuntos de cebadores en la amplificación de secuencias de ácido nucleico de CMV, en el que:

(i) los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 comprenden:

5' TGA ACT TCA TCA TCA CCA CCC GAG ACT 3' [SEQ ID NO: 49] como cebador directo y

5' CCT TGT ACG CTT TGG AAA TCG AGC CTG 3' [SEQ ID NO: 50] como cebador inverso,

y los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 comprenden:

20 5' CGG CTA GTG TCG TGT TAG C 3' [SEQ ID NO: 16] como cebador directo y

5' CAC AAA AAT CCG CCG ATT CAG ATC 3' [SEQ ID NO: 47] como cebador inverso; o

(ii) los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 consisten en:

5' TGA ACT TCA TCA TCA CCA CCC GAG ACT 3' [SEQ ID NO: 49] como cebador directo y

5' CCT TGT ACG CTT TGG AAA TCG AGC CTG 3' [SEQ ID NO: 50] como cebador inverso,

25 y los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 consisten en:

5' CGG CTA GTG TCG TGT TAG C 3' [SEQ ID NO: 16] como cebador directo y

5' CAC AAA AAT CCG CCG ATT CAG ATC 3' [SEQ ID NO: 47] como cebador inverso.

30 **[0030]** La presente invención y realizaciones de la misma se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

35 **[0031]** Las figuras 1a-1e son una alineación de secuencias disponibles públicamente para UL34 de CMV. Las secuencias fueron alineadas para maximizar la homología de secuencia e identificar regiones libres de mutaciones para el diseño de cebadores y sondas. CMV Merlin está disponible en GenBank como No. de Acceso AY446894.2 [SEQ ID NO: 61], CMV AD169 está disponible en GenBank como No. de Acceso XI 7403,1 [SEQ ID NO: 62], CMV Towne 25 está disponible de GenBank como No. de acceso AY315197.2 [SEQ ID NO: 63], CMV Toledo está disponible en GenBank como No. de acceso AC146905.1 [SEQ ID NO: 64], CMV FIX está disponible en GenBank como No. de acceso AC146907.1 [SEQ ID NO: 65], CMV PH está disponible en GenBank como No. de acceso AC146904.1 [SEQ ID NO: 66], CMV TB40/E está disponible en GenBank como No. de Acceso EF999921.1 [SEQ ID NO: 67], y CMV TR está disponible en GenBank como No. de acceso AC146906.1 [SEQ ID NO: 68].

45 **[0032]** Las figuras 2a-2e es una alineación de secuencias disponibles públicamente para UL80.5 de CMV. Las secuencias fueron alineadas para maximizar la homología de secuencia e identificar regiones libres de mutaciones para el diseño de cebadores y sondas. CMV Merlin está disponible en GenBank como No. de Acceso AY446894.2 [SEQ ID NO: 69], CMV AD169 está disponible en GenBank como No. de acceso X17403.1 [SEQ ID NO: 70], CMV Towne está disponible de GenBank como No. de acceso AY315197.2 [SEQ ID NO: 71], CMV Toledo está disponible en GenBank como No. de acceso AC146905.1 [SEQ ID NO: 72], CMV FIX está disponible en GenBank como No. de acceso AC146907.1 [SEQ ID NO: 73], CMV PH está disponible en GenBank como No. de acceso AC146904.1 [SEQ ID NO: 74], CMV TB40/E está disponible en GenBank como No. de Acceso EF999921.1 [SEQ ID NO: 75], y CMV TR está disponible en GenBank como No. de acceso AC146906.1 [SEQ ID NO: 76].

DESCRIPCIÓN DETALLADA

55 **[0033]** La presente descripción se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de dianas en CMV para la amplificación y cuantificación. Las dianas están en genes que son esenciales para la replicación y/o supervivencia viral, son suficientemente únicas para CMV en comparación con otros virus de herpes, son dianas de fármacos no conocidos o potencialmente futuras, y están muy conservadas. Las dianas son UL34, que es esencial para la replicación del CMV (véase, por ejemplo, Dunn et al. (2003), supra), y UL80.5, que es esencial para el ensamblaje de la cápside (véase, por ejemplo, Gibson (2008), supra) .

Definiciones

65 **[0034]** Los términos siguientes son pertinentes a la presente descripción:
"Aproximadamente" se refiere a aproximadamente una variación de +/- 10% del valor indicado. Debe entenderse

que tal variación se incluye siempre en cualquier valor dado proporcionado en el presente documento, se haga referencia o no específicamente al mismo.

[0035] "Antigenemia" y "antigenemia de pp65" se usan indistintamente en este documento para referirse a la detección de pp65 de CMV en leucocitos.

[0036] "Infección por CMV" se utiliza en el presente documento para referirse a aislamiento del virus CMV o la detección de componentes de CMV, tales como proteínas o ácidos nucleicos, en un fluido corporal o muestra de tejido. La fuente de la muestra puede ser cualquier muestra adecuada, incluyendo, pero no limitado a, sangre entera, plasma, suero, leucocitos de sangre periférica, líquido cefalorraquídeo y orina. Una "infección primaria por CMV" se utiliza en el presente documento para referirse a aislamiento del virus CMV o la detección de componentes de CMV o anticuerpos anti-CMV (a condición de que la transferencia pasiva de anticuerpos a través de productos de la sangre y similares pueden ser excluidos) en un paciente que era previamente seronegativo para CMV. Una "infección recurrente por CMV" se utiliza en el presente documento para referirse a aislamiento del virus CMV o la detección de componentes de CMV en un paciente que fue previamente infectado con CMV, pero no tenía virus detectable durante un período especificado de tiempo, tal como al menos cuatro semanas, durante la vigilancia activa. Una infección recurrente por CMV puede ser el resultado de la reactivación de virus latente, es decir, endógeno, o reinfección (es decir, con virus exógeno). "Reinfección" se utiliza en el presente documento para referirse a la detección de una cepa de CMV en un paciente que es distinta de la cepa de CMV que causó la infección primaria en el paciente. "Reactivación" se utiliza en el presente documento para referirse a la detección de una cepa de CMV en un paciente que es indistinguible de la cepa de CMV que causó la infección primaria en el paciente. Humar et al. (Amer J. Transplant 6: 262-274 (2006)) han propuesto que la "infección activa por CMV" se defina para los ensayos de agentes inmunosupresores como infección replicativa diagnosticada mediante el cultivo del virus in vitro, la búsqueda de evidencia de infección viral mediante inclusiones intracitoplasmáticas o inclusiones intranucleares o mediante tinción basada en anticuerpos de secciones histopatológicas o búsqueda de evidencia de replicación usando ensayos basados en ácido nucleico o estudios de antigenemia. Del mismo modo, Kotton et al. (Transplantation 89 (7): 779-795 (15 de abril de 2010)) han definido "infección por CMV", como evidencia de replicación del CMV independientemente de los síntomas (en consonancia con las recomendaciones de la Sociedad Americana de Trasplantes para su uso en ensayos clínicos (Humar et al. (2006), supra). Humar et al. ((2006), supra) han propuesto además que "la enfermedad por CMV" se defina para los ensayos de agentes inmunosupresores como evidencia de la infección por CMV con síntomas atribuibles, en la que la enfermedad por CMV se puede subclasificar en el síndrome viral de CMV o enfermedad invasiva de tejidos. Del mismo modo, Kotton et al. ((2010), supra) han definido "enfermedad de CMV" como evidencia de la infección por CMV con síntomas atribuibles, en el que la enfermedad de CMV puede subclasificarse en síndrome viral de CMV, cuando la fiebre, malestar, leucopenia y trombocitopenia están presentes, o enfermedad invasiva del tejido (en consonancia con las recomendaciones de la Sociedad Americana de Trasplantes para su uso en ensayos clínicos (Humar et al. (2006), supra)).

[0037] "Control" se refiere a una composición conocida por no contener un analito ("control negativo"), tal como ácido nucleico de CMV, o por contener un analito ("control positivo"). Un control positivo puede comprender una concentración conocida de un analito, tal como ácido nucleico de CMV. "Control", "control positivo", y "calibrador" se pueden usar indistintamente en el presente documento para referirse a una composición que comprende una concentración conocida de un analito. Un "control positivo" se puede utilizar para establecer las características de rendimiento del ensayo y es un indicador útil de la integridad de los reactivos (por ejemplo, analitos). Un "control interno", como se usa en el presente documento, es un ácido nucleico no de CMV añadido a la mezcla de reacción. La amplificación del control interno es un indicador útil de la integridad de la amplificación.

[0038] "ADNemia" se utiliza en el presente documento para referirse a la detección de ADN en muestras de plasma, sangre entera, y leucocitos de sangre periférica aislados o en muestras de capa leucocítica.

[0039] "FCN" es un número de ciclos cuantitativos asociados con la posición del pico de la curva *maxRatio* (Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL).

[0040] "Marcador" y "marcador detectable" significa un resto unido a una sonda para hacer que la hibridación entre la sonda y el analito, por ejemplo, ácido nucleico de CMV, en particular el ácido nucleico de CMV amplificado, detectable, y la sonda así marcada se refiere como "marcado de manera detectable". Un marcador puede producir una señal que es detectable por medios visuales o instrumentales. A este respecto, el resto, en sí, puede no ser detectable pero puede llegar a ser detectable tras la reacción con todavía otro resto. El uso del término "marcado de manera detectable" pretende abarcar dicho marcaje.

[0041] "*maxRatio*" o "MR" se utiliza en el presente documento para referirse al procedimiento *maxRatio* de (Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL) análisis de formas de curvas independiente de una curva de PCR en tiempo real. La curva de proporción *maxRatio* se genera mediante la toma de proporciones sucesivas de la señal generada a partir de la curva de PCR. Cuando la curva de amplificación en tiempo real está en su fase exponencial, se produce un gran cambio en la curva de proporciones creando un pico. La ubicación del pico en los ciclos es el número de ciclos FCN. MR es una medida de la eficacia de la reacción relativa asociada con la altura del pico de la curva de

proporción. La anchura del pico de la curva proporción en una mitad del valor de MR es una medida de la normalidad o anormalidad de reacción.

[0042] "Amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos" o "NASBA" es la amplificación, es decir, la generación de múltiples copias de una secuencia de ácido nucleico específica, tal como una secuencia de ADN o ARN específica, que está presente en una muestra en un bajo número de copias. Las técnicas de amplificación incluyen la reacción en cadena de polimerasa (PCR), PCR en tiempo real, amplificación mediada por transcripción (TMA), reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), y similares. La PCR en tiempo real se prefiere en el contexto de la presente descripción. Ciertas técnicas de amplificación pueden requerir la modificación de cebadores.

[0043] "Terapia preventiva" se utiliza en el presente documento para referirse a la iniciación de la terapia antiviral cuando el control de laboratorio en un período regular detecta la replicación viral asintomática temprana (es decir, una vez que la replicación viral llega a un cierto umbral de ensayo) con el fin de prevenir la progresión a la enfermedad clínica. Véase, por ejemplo, Kotton et al. (2010), supra, para una discusión adicional.

[0044] "Profilaxis" se utiliza en el presente documento para referirse a la administración de medicación antiviral a un paciente, que no ha sido identificado como "en riesgo" para la infección por CMV o que ha sido identificado como "en riesgo" para la infección por CMV. La administración de la medicación antiviral por lo general comienza en el período post-trasplante inmediato o muy temprano y continúa durante un período finito de tiempo, a menudo en el intervalo de 3-6 meses. Ejemplos de medicamentos antivirales incluyen aciclovir, valaciclovir, ganciclovir intravenoso, ganciclovir oral, y valganciclovir. Véase, por ejemplo, Kotton et al. (2010), supra, para una discusión adicional.

[0045] "Híbrida o hibridan específicamente", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la capacidad de un ácido nucleico determinado, tal como un cebador o sonda, para unirse específicamente a otro ácido nucleico, por ejemplo, un ácido nucleico de CMV.

[0046] La terminología usada en este documento es para el propósito de describir solamente realizaciones particulares y no se pretende de otro modo que sean limitantes.

Procedimientos para amplificar y detectar el CMV

[0047] Se proporciona un procedimiento de amplificación de secuencias de ácido nucleico de citomegalovirus (CMV) en una muestra. El procedimiento comprende (a) formar una mezcla que comprende la muestra, los reactivos de amplificación de ácidos nucleicos, un par de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34, y un par de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5, y (b) someter la mezcla a condiciones que promueven la amplificación de la secuencia de ácido nucleico UL34 y la secuencia de ácido nucleico UL80.5.

[0048] Los reactivos de amplificación de ácidos nucleicos incluyen una enzima que tiene actividad de polimerasa (por ejemplo, AmpliTaq Gold®, uno o más cofactores de enzimas (por ejemplo, MgCl₂), y desoxinucleótido trifosfatos (dNTP; por ejemplo, dATP, dGTP, dCTP y dTTP). Las concentraciones preferidas de los reactivos de amplificación de ácidos nucleicos se ejemplifican en el presente documento.

[0049] Las condiciones que promueven la amplificación son las que promueven la hibridación de cebadores y la extensión de secuencias de ácidos nucleicos. La hibridación es dependiente de varios parámetros, tales como la temperatura, fuerza iónica, longitud de las secuencias que se amplifican, la complementariedad y el contenido en G:C de las secuencias que se amplifican. Por ejemplo, la reducción de la temperatura promueve la hibridación de secuencias de ácido nucleico complementarias. Un alto contenido en G:C y una longitud más larga estabilizan la formación de dobles cadenas. Generalmente, los cebadores y sondas de aproximadamente 30 pb o menos y que tiene un alto contenido en G:C funcionan bien. Las condiciones de amplificación, cebadores y sondas preferidas se ejemplifican en el presente documento.

[0050] La etapa (b) se puede repetir cualquier número adecuado de veces mediante el ciclado térmico de la mezcla de reacción entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 veces, tal como entre aproximadamente 20 y aproximadamente 75 veces, tal como entre aproximadamente 25 y aproximadamente 50 veces.

[0051] Los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 amplifican una secuencia de ácido nucleico en la región desde aproximadamente el nucleótido 29 a aproximadamente el nucleótido 79 de la secuencia del dominio de codificación de UL34 (CDS; todas las referencias a las posiciones de nucleótidos hacen referencia a la cepa Merlin de CMV (Nº de Acceso GenBank AY446894.2)). Uno de los pares de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 hibrida específicamente con la CDS de UL34 en la región desde aproximadamente el nucleótido 2 a aproximadamente el nucleótido 29, y el otro del par de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 hibrida específicamente con la CDS de UL34 en la región desde aproximadamente el nucleótido 78 hasta aproximadamente el nucleótido 106. Los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 puede comprender, o consistir esencialmente en, y

preferiblemente comprender o consistir esencialmente en, (i) 5' ACT TGA TCA TCA TCA CCA CCC GAG ACT 3' [SEQ ID NO: 49] como cebador directo, y (ii) 5' CCT TGT ACG CTT TGG AAA TCG AGC CTG 3' [SEQ ID NO: 50] como cebador inverso.

5 **[0052]** Los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 amplifican una secuencia de ácido nucleico en la región de aproximadamente 2025 a aproximadamente 2080 de la CDS de UL80.5. Uno de los pares de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 hibrida específicamente con la CDS de UL80.5 en la región de aproximadamente 2005 a aproximadamente 2025, y el otro par de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 hibrida específicamente con la CDS de UL80.5 en la
10 región desde aproximadamente el nucleótido 2078 hasta aproximadamente el nucleótido 2105. Los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 puede comprender, o consistir esencialmente en, y preferiblemente comprender o consistir esencialmente en, (i) 5' CGG CTA GTG TCG TGT TAG C 3' [SEQ ID NO: 16] como cebador directo, y (ii) 5' CAC AAA AAT CCG CCG ATT CAG ATC 3' [SEQ ID NO: 47] como cebador inverso.

15 **[0053]** La mezcla de (a) puede comprender, y preferiblemente comprende, un ácido nucleico de control interno (IC) y un par de cebadores para amplificar el ácido nucleico de IC. Cuando la mezcla de (a) comprende un ácido nucleico de IC, las condiciones en (b) también promueven la amplificación del ácido nucleico de IC.

[0054] El procedimiento puede comprender, además, y preferiblemente comprende, detectar simultánea o posteriormente la presencia, cantidad o concentración de CMV en la muestra. La detección de CMV en la muestra permite la cuantificación de la carga viral de CMV, y similares. Cuando se utiliza la PCR estándar, la detección después de la amplificación es completa, tal como después de usar un cebador marcado durante la amplificación, mediante el uso de un cebador marcado como sonda marcada después de la amplificación, o mediante el uso de una sonda marcada, que difiere en la secuencia de los cebadores, después de la amplificación para la hibridación con la secuencia diana amplificada; los productos de amplificación hibridados con sondas marcadas se pueden separar a continuación y detectarse mediante otros medios, tales como mediante el uso de micropartículas y sondas marcadas. Cuando se usa PCR en tiempo real, la mezcla de (a) comprende además reactivos de detección de ácidos nucleicos, tales como un colorante fluorescente no específico que se intercala con cualquier ADN de doble cadena, por ejemplo, o una sonda de ADN específica de la secuencia marcada, lo cual permite la detección sólo después de que la sonda se hibride con su diana de ADN complementario, lo que permite la amplificación y detección simultáneas. Preferiblemente, se utilizan sondas de ADN específicas de secuencia marcadas, en particular dada la amplificación simultánea de dos secuencias de ácido nucleico diferentes de acuerdo con la presente descripción. Cuando una sonda de detección está presente en la mezcla de (a) durante la amplificación, la sonda de detección debe ser estable en las condiciones que promueven la amplificación, no debería interferir con la amplificación, debe unirse a su secuencia diana bajo condiciones de amplificación, y emitir una señal sólo tras la unión a su secuencia diana. Ejemplos de sondas que son particularmente adecuadas en este sentido incluyen sondas de baliza molecular, sondas TAQMAN® y sondas lineales, tales como las descritas por Abravaya et al. (publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos. No. 2005/0227257). Las sondas descritas en este documento pueden formar la región del bucle, solas o en combinación adicional con parte de la región del tallo, de una baliza molecular. Las sondas descritas en la presente documento también se pueden utilizar como sondas lineales con un fluoróforo (por ejemplo, FAM) en un extremo y un desactivador de alta eficiencia, tales como el desactivador Black Hole (BHQ®; Biosearch Technologies, Inc., Novato, CA), en el otro extremo.

[0055] En vista de lo anterior, la mezcla de (a) puede comprender además, y preferiblemente comprende, una sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 y una sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5. La sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 hibrida específicamente con la CDS de UL34 en la región desde aproximadamente el nucleótido 29 a aproximadamente el nucleótido 79, tal como en la región desde aproximadamente el nucleótido 33 a aproximadamente el nucleótido 59. La secuencia de nucleótidos de la sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 puede comprender, o consistir esencialmente en, y preferiblemente comprende o consiste esencialmente en, 5' CG ACG ATT CAG TCC TGC GAG CC 3' [SEQ ID NO: 51]. La sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 hibrida específicamente con la CDS de UL80.5 en la región de aproximadamente 2025 a aproximadamente 2080, tal como en la región desde aproximadamente el nucleótido 2040 hasta aproximadamente el nucleótido 2062. La secuencia de nucleótidos de la sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico de U134 puede comprender, o consistir esencialmente en, y preferiblemente comprende o consiste esencialmente en, 5' AAGCCGCCGACGCTTCCCAG 3' [SEQ ID NO: 52]. Un marcador preferido para una sonda es FAM, y un desactivador preferido para una sonda es BHQ-1.

60 **[0056]** El procedimiento puede comprender, y preferiblemente comprende además detectar la presencia, cantidad o concentración de un IC en la muestra. La amplificación y detección del IC demuestra que el proceso ha procedido correctamente para cada muestra.

[0057] Se puede utilizar cualquier muestra biológica adecuada. Preferiblemente, la muestra biológica es líquida. Los ejemplos preferidos de muestras biológicas líquidas incluyen, pero no se limitan a, sangre entera y plasma. Preferiblemente, se conserva el plasma o sangre entera, tal como mediante la adición de un agente

quelante, por ejemplo, ácido etilendiaminetetraacético (EDTA) o una sal del mismo, tal como una sal de sodio o una sal de sodio y calcio. Una proteinasa, tal como proteinasa K, se añade preferiblemente a la muestra para digerir las proteínas no deseadas.

5 **[0058]** La muestra se puede preparar para el ensayo usando cualquier procedimiento adecuado tal como se conoce en la técnica. Deseablemente, el procedimiento extrae y concentra ácidos nucleicos. El procedimiento también deseablemente hace que la secuencia diana sea accesible para la amplificación, y elimina inhibidores potenciales de la amplificación del extracto.

10 **[0059]** Se puede preferir el uso de un sistema de preparación de muestras automatizado, tal como un sistema de preparación de muestra automatizado diseñado para utilizar procesos de micropartículas magnéticas para la purificación de ácidos nucleicos. Un ejemplo de un sistema de preparación de muestras automatizado es *m2000sp*, que está disponible de Abbott Laboratories, Abbott Park, IL. Alternativamente, las muestras de plasma se pueden preparar usando el sistema de preparación de muestras automatizado *m24sp* (Abbott) o se pueden preparar manualmente. La preparación de muestras automatizada se prefiere sobre la preparación manual debido a que es más consistente.

20 **[0060]** Los reactivos del mSample Preparation System_{DNA} (4 x 24 preps; Abbott) lisan los viriones, capturan los ácidos nucleicos y lavan las partículas para eliminar componentes de la muestra no unidos. La proteinasa K está incluida en la etapa de lisis para muestras de plasma para digerir proteínas asociadas con las muestras. Los ácidos nucleicos unidos se eluyen y se transfieren a una placa de 96 pocillos de profundidad. Los ácidos nucleicos están entonces listos para la amplificación. Una secuencia de ADN no relacionada, que sirve como control interno (IC) para demostrar que el proceso ha procedido correctamente para cada muestra, se introduce en el procedimiento de preparación de muestras y se procesa junto con los calibradores, controles y muestras.

25 **[0061]** La amplificación/detección puede llevarse a cabo como se conoce en la técnica, tal como mediante el uso del instrumento *m2000rt* (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL). El ADN diana se amplifica por la ADN polimerasa en presencia de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP) y magnesio. El reactivo de amplificación contiene conjuntos específicos de cebadores de amplificación para CMV y, preferiblemente, un IC. Durante la amplificación con PCR, se utiliza alta temperatura para separar las hebras de ADN de doble cadena. Cuando la reacción se enfría hasta una temperatura a la que se puede producir la hibridación de ADN, los cebadores de oligonucleótidos de ADN de cadena sencilla específicos de analito se unen al ADN analito. Los cebadores se extienden mediante la ADN polimerasa, produciendo una copia exacta de un tramo diana corto del ADN analito. La ADN polimerasa es una enzima termofílica que ha sido modificada en su sitio activo por una molécula que la hace inactiva. Cuando la enzima se calienta antes del inicio de la PCR, la molécula inhibidora se escinde de la enzima, permitiendo de ese modo que recupere su actividad. De esta manera, la enzima sólo se activa a temperaturas a las que se producen interacciones específicas de ADN-ADN. Esto reduce considerablemente los artefactos no específicos de la PCR, tales como dímeros de cebadores. Durante cada ronda de ciclo térmico, los productos de amplificación se disocian en cadenas sencillas a alta temperatura, lo que permite la hibridación y extensión del cebador a medida que baja la temperatura. La amplificación exponencial de la diana se logra a través de ciclos repetidos entre altas y bajas temperaturas. La amplificación de las dianas de CMV y, si está presente, el IC tiene lugar simultáneamente en la misma reacción.

45 **[0062]** Dos secuencias cortas dentro de los genes UL34 y UL80.5 del genoma de CMV son reconocidas de acuerdo con la presente descripción. Las regiones son específicas para CMV y están altamente conservadas entre diferentes cepas de CMV. La redundancia en amplificación de la diana se diseña para producir una amplificación robusta, precisa y sensible de ADN de CMV.

50 **[0063]** Se puede utilizar cualquier secuencia adecuada como IC. Una secuencia diana de IC preferida se deriva del gen de la hidroxipiruvato reductasa de *Cucurbita pepo* (calabaza). El IC puede estar en forma de un plásmido de ADN linealizado, preferiblemente en una solución tampón con ADN portador. Opcionalmente, se incluye un conservante, tal como azida de sodio y/o ProClin® 950.

55 **[0064]** Los oligonucleótidos de ADN lineal de cadena sencilla, que se marcan de forma detectable, se utilizan como sondas. Las sondas se pueden marcar de forma detectable de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. En este sentido, se puede utilizar cualquier marcador adecuado. Por ejemplo, un resto fluorescente puede estar unido covalentemente a un extremo de la sonda y un resto inactivador puede estar unido covalentemente al otro extremo. Durante cada ronda de amplificación por PCR, las sondas marcadas de forma detectable se hibridan al ADN diana amplificado, si está presente. En ausencia de secuencias diana, las sondas adoptan una conformación que lleva el inactivador lo suficientemente cerca del fluoróforo excitado para absorber su energía antes de que pueda ser emitida por fluorescencia. Cuando la sonda se une a su secuencia complementaria en la diana, el fluoróforo y el inactivador se mantienen separados, lo que permite la emisión y detección fluorescente. Preferiblemente, las sondas específicas de CMV y las sondas específicas de IC están marcadas de manera diferente para que el ADN de CMV y el ADN de IC puedan distinguirse. Dado que la fluorescencia se produce durante cada ciclo, la reacción de PCR se puede leer en tiempo real. El ciclo de amplificación en el que se

detecta la señal fluorescente es inversamente proporcional al logaritmo de la concentración de ADN de CMV presente en la muestra original.

Cebadores y sondas

5

[0065] Se proporciona también un conjunto de cebadores, que comprende un par de cebadores directo e inverso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 de CMV y un par de cebadores directo e inverso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 de CMV. El par de cebadores directo e inverso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 de CMV amplifican una secuencia de ácido nucleico en la región desde aproximadamente el nucleótido 29 a aproximadamente el nucleótido 79 de la CDS de UL34. El par de cebadores directo e inverso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 de CMV amplifica una secuencia de ácido nucleico en la región de aproximadamente 2025 a aproximadamente 2080 de la CDS de UL80.5. Un par de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 hibrida específicamente con la CDS de UL34 en la región desde aproximadamente el nucleótido 2 a aproximadamente el nucleótido 29, y el otro par de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 hibrida específicamente con la CDS de UL34 en la región desde aproximadamente el nucleótido 78 a aproximadamente el nucleótido 106. Un par de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 hibrida específicamente con la CDS de UL80.5 en la región de aproximadamente 2005 a aproximadamente 2025, y el otro par de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 hibrida específicamente con la CDS de UL80.5 en la región desde aproximadamente el nucleótido 2078 hasta aproximadamente el nucleótido 2105. Los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico de U34 puede comprender, o consistir esencialmente en, y preferiblemente comprenden o consisten esencialmente en, (i) 5' TGA ACT TCA TCA TCA CCA CCC GAG ACT 3' [SEQ ID NO: 49] como cebador directo, y (ii) CCT 5' TGT ACG CT T TGG AAA TCG AGC CTG 3' [SEQ ID NO: 50] como cebador inverso. Los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 pueden comprender, o consistir esencialmente en, y preferiblemente comprenden o consisten esencialmente en, (i') 5' CGG CTA GTG TCG TGT TAG C 3' [SEQ ID NO: 16] como cebador directo, y (ii') 5' CAC AAA AAT CCG CCG ATT CAG ATC 3' [SEQ ID NO: 47] como cebador inverso.

[0066] Se proporciona también un conjunto de sondas que comprende una sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 de CMV y una sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 de CMV. La sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 hibrida específicamente con la CDS de UL34 en la región desde aproximadamente el nucleótido 29 a aproximadamente el nucleótido 79, y la sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 hibrida específicamente con la CDS de UL80.5 en la región de aproximadamente 2025 y aproximadamente 2080. La sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 hibrida específicamente con la CDS de UL34 en la región desde aproximadamente el nucleótido 33 a aproximadamente el nucleótido 59, y la sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 hibrida específicamente con la CDS de UL80.5 en la región desde aproximadamente el nucleótido 2040 hasta aproximadamente el nucleótido 2062. La secuencia de nucleótidos de la sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 puede comprender, o consistir esencialmente en, y preferiblemente comprende o consiste esencialmente en 5' CG ACG ATT CAG TCC TGC GAG CC 3' [SEQ ID NO: 51]. La secuencia de nucleótidos de la sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 puede comprender, o consistir esencialmente en, y preferiblemente comprende o consiste esencialmente en 5' AAGCCGCCGAGCTTCCCAG 3' [SEQ ID NO: 52]. Tales sondas no sólo permiten la detección de la presencia de CMV en una muestra, sino que también permiten la determinación de la cantidad o concentración de CMV (es decir, la cuantificación) en una muestra.

[0067] Los cebadores y sondas se pueden preparar mediante técnicas convencionales, tales como la síntesis en fase sólida utilizando un equipo disponible comercialmente (véase, por ejemplo, Applied Biosystems, Inc. (Foster City, CA), DuPont (Wilmington, DE), y Milligen (Bedford, MA)). Aunque los cebadores y sondas se han descrito en el presente documento en el contexto de su uso en procedimientos de amplificación basados en ácidos nucleicos, tales como PCR, en particular PCR en tiempo real, tales cebadores y sondas pueden ser útiles como sondas en otros procedimientos basados en ácidos nucleicos, tales como técnicas de hibridación (por ejemplo, técnicas de hibridación basadas en membranas (transferencias Southern y transferencias Northern), técnicas de hibridación de ácidos nucleicos modificados (véase, por ejemplo, Pandian et al., Patente de Estados Unidos No. 5,627,030), y técnicas del tipo de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)), que se utilizan para detectar secuencias de polinucleótidos idénticas, similares y complementarias.

[0068] Las sondas, que son oligonucleótidos de ADN lineal de cadena sencilla, se marcan de forma detectable de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Se puede utilizar cualquier marcador adecuado. Por ejemplo, un resto fluorescente puede estar unido covalentemente a un extremo de la sonda y un resto inactivador puede estar unido covalentemente al otro extremo. Los ejemplos de fluoróforos adecuados incluyen, pero no se limitan a, FAM, fluoresceína y sus derivados, cumarina y derivados del mismo, Lucifer amarillo, TEXAS RED®, tetrametilrodamina, tetracloro-6-carboxifluoresceína, 5-carboxirodamina, y colorantes de cianina (por ejemplo, Cy5) y sus derivados. FAM es un marcador preferente. Ejemplos de inactivadores incluyen DABCYL, DABSYL, DABMI, tetrametilrodamina, TAMRA, y colorantes BHQ®. Como se ha indicado anteriormente en "*Procedimientos de amplificación y detección*

65

de CMV", durante cada ronda de amplificación por PCR en tiempo real, las sondas marcadas de forma detectable se hibridan al ADN diana amplificado, si está presente. En ausencia de una secuencia diana, cada una de las sondas adopta una conformación que lleva el inactivador lo suficientemente cerca del fluoróforo excitado para absorber su energía antes de que pueda ser emitida por fluorescencia. En presencia de una secuencia diana, cada sonda se une a su secuencia complementaria en la diana y el fluoróforo y el inactivador se mantienen separados, lo que permite la emisión y detección fluorescente. Preferiblemente, las sondas específicas de CMV y las sondas específicas de IC están marcadas de manera diferente para que el ADN de CMV y el ADN de IC pueden distinguirse. A este respecto, la sonda o sondas específicas de CMV están preferiblemente marcadas con FAM y se inactivan con BHQ-1.

10 Kits

[0069] Se proporciona un kit para la amplificación de secuencias de ácido nucleico de CMV en una muestra. El kit comprende (i) un conjunto de cebadores que comprenden un par de cebadores directo e inverso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 de CMV y un par de cebadores directo e inverso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 de CMV y (ii) instrucciones para utilizar el conjunto de cebadores en la amplificación de secuencias de ácido nucleico de CMV y/o uno o más reactivos para utilizar el conjunto de cebadores en la amplificación de secuencias de ácido nucleico de CMV. El par de cebadores directo e inverso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 de CMV amplifican una secuencia de ácido nucleico en la región desde aproximadamente el nucleótido 29 a aproximadamente el nucleótido 79 de la CDS de UL34, y el par de cebadores directo e inverso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 de CMV amplifican una secuencia de ácido nucleico en la región de aproximadamente 2025 a aproximadamente 2080 de la CDS de UL80.5. Uno de los pares de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 hibrida específicamente con la CDS de UL34 en la región desde aproximadamente el nucleótido 2 a aproximadamente el nucleótido 29, y el otro par de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 hibrida específicamente con la CDS de UL34 en la región desde aproximadamente el nucleótido 78 a aproximadamente el nucleótido 106. Uno de los pares de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 hibrida específicamente con la CDS de UL80.5 en la región de aproximadamente 2005 a aproximadamente 2025, y el otro par de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 hibrida específicamente con la CDS de UL80.5 en la región desde aproximadamente el nucleótido 2078 hasta aproximadamente el nucleótido 2105. Los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 puede comprender, o consistir esencialmente en, y preferiblemente comprenden o consisten esencialmente en, (i) 5' TGA ACT TCA TCA TCA CCA CCC GAG ACT 3' [SEQ ID NO: 49] como cebador directo, y (ii) CCT 5' TGT ACG CT T TGG AAA TCG AGC CTG 3' [SEQ ID NO: 50] como cebador inverso. Los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 pueden comprender, o consistir esencialmente en, y preferiblemente comprenden o consisten esencialmente en, (i') 5' CGG CTA GTG TCG TGT TAG C 3' [SEQ ID NO: 16] como cebador directo, y (ii') 5' CAC AAA AAT CCG CCG ATT CAG ATC 3' [SEQ ID NO: 47] como cebador inverso.

[0070] El kit puede comprender además, y preferiblemente comprende, (i) una sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 de CMV y una sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 de CMV y (ii) instrucciones para utilizar las sondas en la detección de la amplificación de secuencias de ácido nucleico de CMV y/o uno o más reactivos para utilizar las sondas en la detección de la amplificación de secuencias de ácido nucleico de CMV. La sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 hibrida específicamente con la CDS de UL34 en la región desde aproximadamente el nucleótido 29 a aproximadamente el nucleótido 79, tal como de aproximadamente el nucleótido 33 a aproximadamente el nucleótido 59. La sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 hibrida específicamente con la CDS de UL80.5 en la región entre aproximadamente 2025 y aproximadamente 2080, tal como desde aproximadamente el nucleótido 2040 hasta aproximadamente el nucleótido 2062. La secuencia de nucleótidos de la sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 puede comprender, o consistir esencialmente en, y preferiblemente comprende o consiste esencialmente en 5' CG ACG ATT CAG TCC TGC GAG CC 3' [SEQ ID NO: 51]. La secuencia de nucleótidos de la sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 puede comprender, o consistir esencialmente en, y preferiblemente comprende o consiste esencialmente en, 5'AAGCCGCCGAGCTTCCCAG 3' [SEQ ID NO: 52]. Un marcador preferido para una sonda es FAM. En este sentido, el marcador FAM se utiliza preferiblemente en combinación con el inactivador BHQ-1.

[0071] El kit puede comprender además dNTP. Preferiblemente, los dNTP se suministran en una solución tamponada con un colorante de referencia.

[0072] Los cebadores, sondas y dNTP se pueden empaquetar en varias configuraciones. Preferiblemente, los cebadores, sondas y dNTP están en un solo recipiente. El recipiente, preferiblemente, también contiene un conservante, tal como azida de sodio y/o ProClin® 950.

[0073] El kit puede comprender además una ADN polimerasa. Se puede utilizar cualquier ADN polimerasa adecuada. Un ejemplo de una ADN polimerasa preferida es AmpliTaq Gold® (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA). La ADN polimerasa se puede suministrar en una solución tamponada, que opcionalmente contiene, y preferiblemente contiene, estabilizantes.

[0074] El kit puede comprender además un reactivo de activación, tal como cloruro de magnesio, en una solución tamponada. La solución tamponada incluye preferiblemente un conservante, tal como azida de sodio y/o ProClin® 950.

[0075] El kit puede comprender además opcionalmente un IC. El IC es una secuencia de ADN no relacionada que demuestra que el proceso ha procedido correctamente para cada muestra. Cualquier secuencia adecuada se puede utilizar como IC. Una secuencia diana de IC preferida se deriva del gen de hidroxipiruvato reductasa de *Cucurbita pepo* (calabaza). El IC puede estar en forma de un plásmido de ADN linealizado, preferiblemente en una solución tampón con ADN portador. Opcionalmente, se incluye un conservante, tal como azida de sodio y/o ProClin® 950. Las sondas específicas de CMV y las sondas específicas de IC están marcadas de manera diferente para que el ADN de CMV y el ADN de IC puedan distinguirse. Un marcador preferido para la sonda específica de IC es NED. Preferiblemente, el marcador NED se utiliza en combinación con el inactivador BHQ-2.

[0076] Un control negativo también puede incluirse en el kit. Un control negativo puede contener ADN portador en una solución tamponada. Opcionalmente, se incluye un conservante, tal como azida de sodio y/o ProClin® 950.

[0077] Un control positivo también puede incluirse en el kit. Un control positivo puede contener CMV inactivado en el plasma humano, que es no reactivo mediante ensayos con licencia de la FDA para anticuerpos contra VHC, VIH-1, VIH-2 y HBsAg. Opcionalmente, se incluye un conservante, tal como azida de sodio y/o ProClin® 950.

[0078] Un calibrador también puede incluirse en el kit. El calibrador puede contener ADN plásmido de CMV linealizado no infeccioso en una solución tampón con ADN portador. Opcionalmente, se incluye un conservante, tal como azida de sodio y/o ProClin® 950.

Aplicaciones

[0079] Los materiales y el procedimiento descritos en este documento se pueden utilizar para cuantificar la carga viral en la sangre entera (o plasma). Dicha cuantificación permite la detección temprana de la infección activa por CMV activa, un estrecho seguimiento de la respuesta de un paciente al tratamiento anti-viral, la predicción del riesgo de recaída virémica, la aparición de cepas resistentes, y el desarrollo final de la enfermedad por CMV (Emery et al, Lancet 355: 2032-2036 (2000); y Razonable et al, J. Clin Microbiol 40: 746-752 (2002)). La evaluación de la carga viral cuantitativa mensual, como mínimo, se recomienda en los ensayos clínicos que evalúan nuevos regímenes inmunosupresores en pacientes con trasplante, con una evaluación continuada durante al menos un año después del trasplante, y pruebas más allá de si depende de si se emplea o no un régimen de profilaxis y la naturaleza del régimen (Humar et al. (2006), supra). El donante y el receptor deben ser examinados mediante serología para CMV antes del trasplante.

[0080] La evaluación cuantitativa de la carga viral se puede utilizar de forma segura para guiar una terapia preventiva (Gema et al., Bone Marrow Transplant. 41: 873-879 (2008); Alice et al., J. Virol. Methods 148(1-2): 9-16 (March 2008; epub 11.28.07); Harrington et al., Bone Marrow Transplant. 39: 237-238 (2007); Lilleri et al., J. Med. Virol. 73: 412-418 (2004); Lilleri et al., Blood 110: 2757-2760 (2007); Ruell et al., Bone Marrow Transplant. 40: 55-61 (2007); and Verkruyse et al., Bone Marrow Transplant. 37: 51-56 (2006)). Se ha observado que dos pruebas de PCR positivas consecutivas sobre sangre entera son una estrategia clínicamente segura para desencadenar el inicio de la terapia preventiva (Einsele et al., Blood 86: 2815-2820 (1995); and Lengerke et al., Bone Marrow Transplant. 38: 53-60 (2006)) but may lead to over-treatment (Gimeno et al. (2008), supra).

[0081] En la actualidad, las directrices de consenso internacional sobre el tratamiento de CMV en el trasplante de órganos sólidos incluyen los siguientes para el diagnóstico:

- realizar una serología al donante y el receptor previa al trasplante; si el receptor es negativo, repetición de la prueba en el momento del trasplante; si la serología previa al trasplante es equivocada en el receptor, asumir que es negativo; si la serología previa al trasplante es equivocada en el donante, asumir que es positivo;
- antigenemia y pruebas de ácido nucleico cuantitativa (QNAT), es decir, pruebas de carga viral, son opciones aceptables para el diagnóstico, decisiones sobre la terapia preventiva, y seguimiento de la respuesta a la terapia;
- el plasma o sangre entera es una muestra aceptable para QNAT con una apreciación de las diferencias en los valores de carga viral y la cinética viral en los dos compartimentos; el tipo de muestra no debe ser cambiado en el seguimiento de los pacientes; y
- un corte universal para iniciar el tratamiento no se ha establecido todavía; los laboratorios individuales deben establecer sus propios puntos de corte y auditar los resultados clínicos para verificar el corte utilizado. (Kotton et al. (2010), supra).

[0082] En la actualidad, las directrices de consenso internacional sobre el tratamiento de CMV en el trasplante de órganos sólidos incluyen los siguientes para la terapia preventiva:

- elegir un valor de umbral apropiado para el ensayo específico que está siendo utilizado;
- para terapia preventiva óptima, los trasplantes de riñón, páncreas, hígado y corazón debe seguirse por PCR de CMV o antigenemia cada semana durante tres meses después del trasplante;

- una vez se alcanza el umbral positivo para el ensayo específico que está siendo utilizado, la terapia con dosis de tratamiento (no profiláctico) de valganciclovir o ganciclovir intravenoso debe iniciarse y continuar hasta que se obtienen una o dos pruebas negativas; las pruebas durante el tratamiento se realizan a menudo una o dos veces por semana; y

- 5 - reiniciar el seguimiento posterior o la profilaxis antiviral secundaria después del final del tratamiento debe ser una decisión institucional (Kotton et al. (2010), supra).

[0083] En la actualidad, las directrices de consenso internacional sobre el tratamiento de CMV en el trasplante de órganos sólidos incluyen los siguientes para el tratamiento de CMV:

- 10 - seguimiento semanal en laboratorio de CMV con un QNAT o ensayo basado en antigenemia durante la fase de tratamiento para controlar la respuesta y el posible desarrollo de resistencia;
 - dos muestras negativas consecutivas, preferentemente muestreadas con una semana de diferencia, garantizan la eliminación del virus;
 15 - el seguimiento periódico de la carga viral también se debe realizar durante la profilaxis secundaria; el intervalo de tiempo correcto para el seguimiento no se conoce, pero debe hacerse un seguimiento más frecuente en aquellos con alto riesgo de avance de la enfermedad; y
 - los límites inferiores de detección de ensayos QNAT son variables; por lo tanto, "no detectable" es un término específico de ensayo; cuando se utilizan ensayos de carga viral extremadamente sensibles, que pueden detectar el virus latente, no se sabe si se requiere tratamiento para la carga viral "no detectable"
 20 (Kotton et al. (2010), supra).

[0084] En la actualidad, las directrices de consenso internacional sobre el tratamiento de CMV en el trasplante de órganos sólidos incluyen los siguientes para la resistencia sospechosa a los medicamentos de CMV:

- 25 - resistencia sospechosa a los medicamentos si el tratamiento con ganciclovir acumulativo es mayor que seis semanas y aumenta la carga viral o la enfermedad progresa, después de dos semanas a dosis completa (Kotton et al. (2010), supra).

[0085] En la actualidad, las directrices de consenso internacional sobre el tratamiento de CMV en el trasplante de órganos sólidos incluyen los siguientes para los pacientes pediátricos

- 30 - donantes, que tienen menos de 18 meses de edad, debe ser considerados como seropositivos de CMV si la prueba serológica de CMV es positiva;
 - receptores, que tienen menos de 18 meses de edad, deben ser considerados como seronegativos de CMV; y
 - el cultivo con orina con CMV de QNAT se debe obtener de receptores seropositivos de menos de 18 meses de edad; un resultado positivo confirmaría la exposición previa a CMV; cultivo negativo de orina con CMV puede resultar de la excreción intermitente del virus (Kotton et al. (2010), supra).
 35

[0086] En la actualidad, no existen guías de consenso sobre el tratamiento de CMV en el trasplante de médula ósea. En consecuencia, los diferentes centros de trasplante tienen sus propias directrices institucionales.

- 40 **[0087]** Un problema omnipresente en la evaluación de la carga viral cuantitativa es la que muestra clínica (plasma, sangre entera, o leucocitos) sea óptima. Los datos recientes sugieren que el plasma y la sangre entera son igualmente adecuados para el control de la infección activa por CMV en receptores de trasplante de células madre alogénicas (Gimeno et al. (2008), supra)). En este sentido, se han sugerido 1.000-10.000 copias/ml de sangre entera como umbral para ADNemia (Gema (2008), supra; Harrington et al, Bone Marrow Transplant 39: 237-238 (2007); Lilleri et al. (2007), supra; Ruell et al (2007), supra; y Verkruyse et al, Bone Marrow Transplant 37: 51-56 (2006)); también se han sugerido 550 copias/ml de sangre entera como umbral para ADNemia (Gimeno et al. (2008), supra). Se han sugerido de doscientas a 10.000 copias/ml de plasma como umbral para ADNemia, al menos con respecto a los receptores de trasplante de células madre alogénicas (Kalpoe et al, J. Clin Microbiol. 42: 1498-1504 (2004); Limaye et al., J. Infect Dis 183: 377-382 (2001); Mori et al, Bone Marrow Transplant 29: 777-782 (2002); y Tanaka et al, Bone Marrow Transplant 30: 315-319 (2002)). Sin embargo, ninguno de los niveles de umbral sugeridos ha sido clínicamente validado (Gimeno et al. (2008), supra). Gimeno et al. sugieren que un aumento del nivel de ADNemia de $2,42 \log_{10}$ (266 copias/ml) entre dos muestras de PCR positivas consecutivas representado en una mediana de una semana de diferencia es el valor óptimo para discriminar entre pacientes que requieren terapia preventiva y los que no (Gimeno et al. (2008), supra). Mullier et al. (Acta Clin Belg 64 (6): 477-482 (Nov-Dic 2009)) han sugerido un umbral clínico de CMV con PCR en tiempo real de 1500 copias/ml para la reactivación en receptores de trasplante. Choi et al. (J. Korean Med Sci 24 (4): 571-578 (Agosto de 2009; epub 07/29/10)) han sugerido umbrales clínicos de CMV con PCR en tiempo real para la iniciación de la terapia preventiva de 2×10^4 copias/ml para los receptores de trasplantes de células madre hematopoyéticas con un alto riesgo de infección por CMV y 3×10^4 copias/ml para los receptores de trasplantes de células madre hematopoyéticas con un bajo riesgo de infección por CMV.
 55
 60

[0088] Independientemente de cuando se establecen las directrices de consenso, los materiales y el procedimiento de la presente descripción permiten un nivel de detección de aproximadamente 10 copias de CMV/ml de plasma y un nivel de detección de aproximadamente 30 copias de CMV/ml de sangre entera. Además, los posibles reactivos cruzados (por ejemplo, VHS-1, VHS-2, EBV, HHV-6A, HHV-6B, HHV-7, virus del herpes asociado al sarcoma de

- 65

Kaposi (KSHV)/HHV-8, virus Vaccinia, virus de Varicela Zoster (VZV), poliovirus humano BK, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium smegmatis*, VIH-1, VIH-2, HTLV-1, HPV-16, HPV-18, VHB y VHC) a 1×10^5 cp/ml de control de negativo de CMV dan resultados negativos.

EJEMPLOS

[0089] Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente divulgación. Los ejemplos no pretenden limitar el alcance de la invención reivindicada, que se define por las reivindicaciones.

Ejemplo 1

[0090] Este ejemplo describe los criterios que se emplearon en el diseño y evaluación de las secuencias de cebadores y sondas de CMV.

[0091] Las secuencias de CMV disponibles públicamente fueron alineadas para maximizar la homología de secuencia. Las alineaciones (véase la figura 1 (UL34) y la figura 2 (UL80.5)) se utilizaron para identificar las regiones potenciales de cebadores y sondas que evitaron sitios de mutación.

[0092] Los siguientes criterios se aplicaron en la selección de las regiones de cebadores y sondas:

- no más de un sitio de mutación dentro de una secuencia de cebador o sonda,
- si está presente una mutación, no debe estar en o cerca del extremo 3' del cebador o sonda,
- un probable bajo autocebado o ausencia del mismo,
- baja probabilidad de estructura de horquilla (para los cebadores),
- sin hibridación cebador/cebador o cebador/sonda,
- Tf relativa > 65°C en MgCl₂ 6 mM,
- Tf de la sonda debe ser aproximadamente 5°C más alta que la Tf del cebador, si es posible,
- deben evitarse fuerte regiones ricas en G + C, palíndromos, y tramos de más de cuatro nucleótidos idénticos en una fila debe evitarse y
- debe evitarse una "G" en el extremo 5' de una sonda.

Ejemplo 2

[0093] Este ejemplo describe el diseño y evaluación de cebadores y sondas para la amplificación de UL34.

[0094] Los cebadores y sondas evaluados para la amplificación de UL34 se identifican en la Tabla I.

Tabla I

Cebadores y sondas de UL34 de CMV		
Cebadores directos		
Localización	Secuencia	SEQ ID NO:
UL-34 2-28	5' TGA ACT TCA TCA TCA CCA CCC GAG ACT 3'	49
UL34 5-31	5' ACT TCA TCA TCA CCA CCC GAG ACT TCT 3'	56
UL34 5-28	5' ACT TCA TCA TCA CCA CCC GAG ACT 3'	1
Cebadores inversos		
UL34 78-103	5' TGT ACG CTT TGG AAA TCG AGC CTG CC 3'	57
UL34 75-101	5' CCT TGT ACG CTT TGG AAA TCG AGC CTG 3'	50
UL34 78-101	5' TGT ACG CTT TGG AAA TCG AGC CTG 3'	2
Sondas:		
UL34 40-65	5' ATT CAG TCC TGC GAG CCG CCG AGA T 3'	3
UL34 36-57	5' CG ACG ATT CAG TCC TGC GAG CC 3'	51
UL34 38-62	5' ACG ATT CAG TCC TGC GAG CCG CCG A 3'	58

[0095] Se evaluaron diferentes combinaciones de cebadores y sonda (cepa Merlin de CMV GenBank N° de acceso AY446894.2) en diferentes concentraciones de magnesio y diferentes temperaturas de hibridación. A continuación, se evaluaron las combinaciones seleccionadas de cebadores y sondas para la amplificación óptima de CMV de bajo nivel en muestras de sangre entera. Las dianas de CMV se enriquecieron en eluatos (es decir, el material recuperado de la preparación de muestras para la purificación de ácido nucleico) de diluyente negativo (solución tamponada con Tris con bajos niveles de ADN portador) o sangre entera humana, que contiene altos niveles de ADN genómico. Se generaron gráficas de amplificación para comparaciones de cabeza a cabeza de cuatro conjuntos potenciales de cebadores/sondas para la detección de UL34. Los resultados de las pruebas mostraron que los siguientes conjuntos de cebador/sonda actuaron de forma equivalente y bien:

cebador directo (FP): 5' TGA ACT TCA TCA TCA CCA CCC GAG ACT 3' [SEQ ID NO: 49],

cebador inverso (RP): 5' TGT ACG CTT TGG AAA TCG AGC CTG CC 3' [SEQ ID NO: 57], y

sonda: 5' FAM - ATT CAG TCC TGC GAG CCG CCG AGA T - BHQ-1 dT 3' [secuencia de nucleótidos es la SEQ ID

ES 2 657 064 T3

NO: 3]; y

cebador directo (FP): 5' TGA ACT TCA TCA TCA CCA CCC GAG ACT 3' [SEQ ID NO: 49],

cebador inverso (RP): 5' CCT TGT ACG CTT TGG AAA TCG AGC CTG 3' [SEC ID NO: 50], y

sonda: 5' FAM - ATT CAG TCC TGC GAG CCG CCG AGA T - BHQ-1 dT 3' [secuencia de nucleótidos es la SEQ ID NO: 3].

[0096] Hubo poca o ninguna diferencia en la cantidad de diana amplificada en ambas muestras ND y WB con estos conjuntos de cebadores/sondas. Los siguientes conjuntos de cebadores/sondas no funcionaron:

cebador directo (FP): 5' ACT TCA TCA TCA CCA CCC GAG ACT TCT 3' [SEQ ID NO: 56],

cebador inverso (RP): 5' TGT ACG CTT TGG AAA TCG AGC CTG CC 3' [SEQ ID NO: 57], y

sonda: 5' FAM - ATT CAG TCC TGC GAG CCG CCG AGA T - BHQ-1 dT 3' [secuencia de nucleótidos es SEQ ID NO: 3]; y

cebador directo (FP): 5' ACT TCA TCA TCA CCA CCC GAG ACT TCT 3' [SEQ ID NO: 56],

cebador inverso (RP): 5' CCT TGT ACG CTT TGG AAA TCG AGC CTG 3' [SEC ID NO: 50], y

sonda: 5' FAM - ATT CAG TCC TGC GAG CCG CCG AGA T - BHQ-1 dT 3' [secuencia de nucleótidos es SEQ ID NO: 3].

[0097] La amplificación de CMV en sangre entera con estos conjuntos de cebadores/sondas no fue tan eficaz y, por lo tanto, no tan robusta como muestras similares en diluyente negativo.

[0098] En base a dichas evaluaciones, se seleccionaron las siguientes secuencias de cebadores y secuencias de sondas para la amplificación de UL34:

Cebador directo (FP): 5' ACT TCA TCA TCA CCA CCC GAG ACT 3' [SEQ ID NO: 1],

cebador inverso (RP): 5' TGT ACG CTT TGG AAA TCG AGC CTG 3' [SEQ ID NO: 2], y

sonda: 5' QUASAR™ - ATT CAG TCC TGC GAG CCG CCG AGA T - BHQ-2™ dT 3' [secuencia de nucleótidos es SEQ ID NO: 3].

Ejemplo 3

[0099] Este ejemplo describe el diseño y evaluación de cebadores y sondas para la amplificación de UL80.5

[0100] Los cebadores y sondas evaluados para la amplificación de UL80.5 se identifican en la Tabla II.

Tabla II

Cebadores y sondas de UL80.5 de CMV		
Cebadores directos:		
Localización	Secuencia	SEQ ID NO:
UL80 1006-1025 directo	5' ATG TCG CAC CCT CTG AGT GC 3'	4
UL80 1012-1031 directo	5' CAC CCT CTG AGT GCT GCG GT 3'	5
UL80 1038-1056 directo	5' CGC TAC GGC TCC TCC AGG T 3'	6
UL80 1056-1075 directo	5' TGC TAC CGT GGC AGG TGC GT 3'	7
UL80 1154-1171 directo	5' CCA GTC GCT CGG CAG CGC 3'	8
UL80 1204-1223 directo	5' CCT TCT GCT TCG CCA GCA CC 3'	9
UL80 1226-1247 directo	5' TGC CTT TGC CGT CTT ATC CCG C 3'	10
UL80 1229-1247 directo	5' CTT TGC CGT CTT ATC CCG C 3'	11
UL80 1376-1395 directo	5' CCG TGC CGC CGC CAC CAT CA 3'	12
UL80 1379-1395 directo	5' TGC CGC CGC CAC CAT CA 3'	13
UL80 1642-1660 directo	5' AGC GAC GGT GGA AGT GGC G 3'	14
UL80 1666-1690 directo	5' GCG GGT TCC AAT CAG CAG CAG CAA C 3'	15
UL80 2006-2024 directo	5' CGG CTA GTG TCG TGT TAG C 3'	16
UL80 2043-2061 directo	5' CGC CGC AGC TTC CCA GAG C 3'	17
Sondas:		
Localización	Secuencia	SEQ ID NO:
UL80 1037-1058 directo	5' CCG CTA CGG CTC CTC CAG GTG C 3'	18
UL80 1037-1058 inverso	5' GCA CCT GGA GGA GCC GTA GCG G 3'	19
UL80 1059-1079 directo	5' TAC CGT GGC AGG TGC GCC GTC 3'	20
UL80 1056-1077 inverso	5' CGA CGC ACC TGC CAC GGT AGC A 3'	21
UL80 1101-1126 directo	5' GCC TCA CGA CGG AGT TTA TTT ACC CA 3'	22
UL80 1203-1223 inverso	5' GGT GCT GGC GAA GCA GAA GGA 3	23
UL80 1263-1286 directo	5' CGT CGT GGG TTA CGA CCA GTT GGC 3'	24
UL80 1263-1285 inverso	5' GCC AAC TGG TCG TAA CCC ACG AC 3'	25
UL80 1399-1418 directo	5' GCC TAT TAC CGT CGG CGC GA 3'	26

ES 2 657 064 T3

UL80 1399-1418 inverso	5' TCG CGC CGA CGG TAA TAG GC 3'	27
UL80 1666-1690 directo	5' GCG GGT TCC AAT CAG CAG CAG CAA C 3'	28
UL80 1666-1690 inverso	5' GTT GCT GCT GCT GAT TGG AAC CCG C 3'	29
UL80 1698-1722 directo	5' CGA TGA ACT GCG GGA TGC CAT TCA C 3'	30
UL80 1698-1722 inverso	5' GTG AAT GGC ATC CCG CAG TTC ATC G 3'	31
UL80 2043-2061 directo	5' CGC CGC AGC TTC CCA GAG C 3'	32
UL80 2042-2060 inverso	5' GGC TCT GGG AAG CTG CGG C 3'	33
UL80 2080-2103 inverso	5' CAC AAA AAT CCG CCG ATT CAG ATC 3'	34
UL80 2039-2058 inverso	5' CTG GGA AGC TGC GGC GGC TT 3'	59
UL80 2041-2060 inverso	5' CTC TGG GAA GCT GCG GCG GC 3'	60
Cebadores inversos:		
Localización	Secuencia	SEQ ID NO:
UL80 1060-1078 inverso	5' CGG CGA CGC ACC TGC CAC G 3'	35
UL801068-1086 inverso	5' CAC AGC CGG CGA CGC ACC T 3'	36
UL80 1101-1124 inverso	5' GGT AAA TAA ACT CCG TCG TGA GGC 3'	37
UL80 1137-1157 inverso	5' CTG GCC CCA AGT AGC GAG AAA 3'	38
UL80 1154-1172 inverso	5' GGC GCT GCC GAG CGA CTG G 3'	39
UL80 1229-1247 inverso	5' GCG GGA TAA GAC GGC AAA G 3'	40
UL80 1291-1310 inverso	5' ACG TAG TCC GCA AAG TGA CG 3'	41
UL80 1421-1440 inverso	5' TTC ATC CAT ACC GCC CGG AG 3'	42
UL80 1700-1719 inverso	5' AAT GGC ATC CCG CAG TTC AT 3'	43
UL80 1750-1774 inverso	5' CCG AAA GTA ACG TAG AAC TCT GCC G 3'	44
UL80 1760-1781 inverso	5' AGA GCC GCC GAA AGT AAC GTA G 3'	45
UL80 2066-2090 inverso	5' CGA TTC AGA TCT ACC ATG TCT TTG G 3'	46
UL80 2080-2103 inverso	5' A CAC AA AAT CCG CCG ATT CAG ATC 3'	47
UL80 2106-2123 inverso	5' TCG AGC AGC TTG TTA GCA	48

[0101] El análisis físico de los cebadores y sondas de la Tabla II se muestra en la Tabla III.

Tabla III

5

Cebadores y sondas de UL 80.5 de CMV						
Cebadores directos:						
Localización	SEQ ID NO:	Longitud (nt)	% GC	°C	Autocebado (kcal/mol)	Horquilla (kcal/mol)
UL80 1006-1025 directo	4	20	60	68,3	-6,44	-2,75
UL80 1012-1031 directo	5	20	65	70,1	-4,41	-0,09
UL80 1038-1056 directo	6	19	68,4	69,4	-4,67	-1,45
UL80 1056-1075 directo	7	20	65	72,4	-5,09	-2,1
UL80 1154-1171 directo	8	19	78,9	73,4	-9,89	-3,87
UL80 1204-1223 directo	9	20	65	69,3	-6,69	-2,67
UL80 1226-1247 directo	10	22	59,1	70,7	-3,61	-0,88
UL80 1229-1247 directo	11	19	57,9	65	-3,61	0,3
UL80 1376-1395 directo	12	20	75	75,2	-3,61	-0,64
UL80 1379-1395 directo	13	17	70,6	71,7	-3,61	-0,64
UL80 1642-1660 directo	14	19	68,4	70,8	-3,61	-1,31
UL80 1666-1690 directo	15	25	60	72,9	-3,61	-2,32
UL80 2006-2024 directo	16	20	60	66,2	-8,77	-3,38
UL80 2043-2061 directo	17	19	73,7	71,5	-6,34	-1,33

ES 2 657 064 T3

Sondas:						
Localización	SEQ ID NO:	Longitud (nt)	% GC	°C	Autocebado (kcal/mol)	Horquilla (kcal/mol)
UL80 1037-1058 directo	18	22	72,7	73,3	-6,68	-2,55
UL80 1037-1058 inverso	19	22	72,7	73,3	-6,68	-3,62
UL80 1059-1079 directo	20	22	68,2	73,8	-5,09	-2,1
UL80 1056-1077 inverso	21	22	68,2	73,8	-5,09	-1,77
UL80 1101-1126 directo	22	26	50	69,5	-3,61	-1,05
UL80 1203-1223 inverso	23	21	61,9	70,5	-6,68	-2,98
UL80 1263-1286 directo	24	24	62,5	71,7	-7,87	-5,17
UL80 1263-1285 inverso	25	24	62,5	71,7	-7,87	-5,03
UL80 1399-1418 directo	26	20	65	70,1	-10,36	-1,35
UL80 1399-1418 inverso	27	20	65	70,1	-10,36	-1,82
UL80 1666-1690 directo	28	25	60	72,9	-3,61	-2,32
UL80 1666-1690 inverso	29	25	60	72,9	-3,61	-2,48
UL80 1698-1722 directo	30	25	56	70,7	-5,47	-2,96
UL80 1698-1722 inverso	31	25	56	70,7	-5,47	-2,94
UL80 2043-2061 directo	32	19	73,7	71,5	-6,34	-1,33
UL80 2042-2060 inverso	33	19	73,7	71,5	-6,34	-1,19
UL80 2080-2103 inverso	34	24	45,8	66,3	-4,99	-1,06
Cebadores inversos:						
Localización	SEQ ID NO:	Longitud (nt)	% GC	°C	Autocebado (kcal/mol)	Horquilla (kcal/mol)
UL80 1060-1078 inverso	35	17	76,5	70,1	-6,75	-1,96
UL801068-1086 inverso	36	19	73,7	73,2	-16,03	-2,02
UL80 1101-1124 inverso	37	24	50	66,7	-3,61	-1,4
UL80 1137-1157 inverso	38	21	57,1	68,1	-9,28	-1,03
UL80 1154-1172 inverso	39	19	78,9	73,4	-9,89	-5,02
UL80 1229-1247 inverso	40	19	57,9	65	-3,61	-0,71
UL80 1291-1310 inverso	41	20	55	66,4	-6,3	-1,23
UL80 1421-1440 inverso	42	20	60	67,7	-9,75	-1,85
UL80 1700-1719 inverso	43	20	50	67	-3,61	-1,68
UL80 1750-1774 inverso	44	25	52	68	-6,3	-0,53
UL80 1760-1781 inverso	45	22	54,5	67,8	-6,3	-0,5
UL80 2066-	46	25	44	64,9	-7,82	-2,17

ES 2 657 064 T3

2090 inverso						
UL80 2080-2103 inverso	47	24	45,8	66,3	-4,99	-1,06
UL80 2106-2123 inverso	48	18	50	63,8	-9,89	-2,08
Promedio		21,27	62,36	69,99	-6,32	-1,96
S.D.		2,51	9,28	2,90	2,63	1,25

[0102] Las combinaciones de cebador directo, cebador inverso y sonda que se evaluaron para la amplificación de UL80.5 se muestran en la Tabla IV.

5

Tabla IV

Combinaciones de cebadores y sonda de UL80.5				
Combinación	Cebador directo	Sona (R = inversa; f = directa)	Cebador inverso	Amplificación (nt)
1	UL80 1006-1025	UL80 1037- 1058 R	UL80 1060-1078	73
2	UL80 1006-1025	UL80 1037-1058 F	UL80 1068-1086	81
3	UL80 1006-1025	UL80 1037-1058 R	UL80 1068-1086	81
4	UL80 1006-1025	UL80 1037 -1058 F	UL80 1101-1124	119
5	UL80 1006-1025	UL80 1037-1058 R	UL80 1101-1124	119
6	UL80 1006-1025	UL80 1059-1079 F	UL80 1101-1124	119
7	UL80 1006-1025	UL80 1056-1077 R	UL80 1101-1124	119
8	UL80 1012-1031	UL80 1037-1058 F	UL80 1060-1078	67
9	UL80 1012-1031	UL80 1037-1058 R	UL80 1060-1078	67
10	UL80 1012-1031	UL80 1037-1058 F	UL80 1068-1086	75
11	UL80 1012-1031	UL80 1037-1058 R	UL80 1068-1086	75
12	UL80 1012-1031	UL80 1037-1058 F	UL80 1101-1124	113
13	UL80 1012- 1031	UL80 1037-1058 R	UL80 1101-1124	113
14	UL80 1012-1031	UL80 1059-1079 F	UL80 1101-1124	113
15	UL80 1012-1031	UL80 1056-1077 R	UL80 1 101-1124	113
16	UL80 1038-1056	UL80 1101-1126 F	UL80 1137-1157	120
17	UL80 1056-1075	UL80 1101-1126 F	UL80 1137-1157	102
18	UL80 1056-1075	UL80 1101-1126 F	UL80 1154-1172	117
19	UL80 1154-1171	UL80 1203-1223 R	UL80 1229-1247	94
20	UL80 1204-1223	UL80 1263-1285 R	UL80 1291-1310	107
21	UL80 1226-1247	UL80 1263-1286 F	UL80 1291-1310	85
22	UL80 1226-1247	UL80 1263-1285 R	UL80 1291-1310	85
23	UL80 1229-1247	UL80 1263-1286 F	UL80 1291-1310	82
24	UL80 1229-1247	UL80 1263- 1285 R	UL80 1291-1310	82
25	UL80 1376-1395	UL80 1399-1418 F	UL80 1421-1440	65
26	UL80 1376-1395	UL80 1399-1418 R	UL80 1421-1440	65
27	UL80 1379-1395	UL80 1399 -1,418 F	UL80 1421-1440	62
28	UL80 1379-1395	UL80 1399-1418 R	UL80 1421-1440	62
29	UL80 1642-1660	UL80 1666-1690 F	UL80 1700-1719	78
30	UL80 1642-1660	UL80 1666-1690 R	UL80 1700-1719	78
31	UL80 1666-1690	UL80 1698-1722 F	UL80 1750-1774	109
32	UL80 1666-1690	UL80 1698-1722 R	UL80 1750-1774	109
33	UL80 1666-1690	UL80 169 8-1722 F	UL80 1760-1781	116
34	UL80 1666-1690	UL80 1698-1722 R	UL80 1760-1781	116
35	UL80 2006-2024	UL80 2043-2061 F	UL80 2066-2090	85
36	UL80 2006-2024	UL80 2042-2060 R	UL80 2066-2090	85
37	UL80 2006-2024	UL80 2043-2061 F	UL80 2080-2103	98
38	UL80 2006-2024	UL80 2042-2060 R	UL80 2080-2103	98
39	UL80 2006-2024	UL80 2080-2103 R	UL80 2106-2123	118
40	UL80 2043-2061	UL80 2080-2103 R	UL80 2106-2123	81

[0103] Se evaluaron las distintas combinaciones de cebadores y sonda para UL80.5 por cuadruplicado a diferentes concentraciones de magnesio y diferentes temperaturas de hibridación. Cada reacción contenía 0,5 µM de cebador directo de CMV, 0,5 µM de cebador inverso de CMV, 0,2 µM de sonda de CMV, 0,5 µM de cebador directo de control interno (IC), 0,5 µM de cebador inverso de IC, 0,2 µM de sonda de IC para PCR, 0,012 µM de ROX (un colorante de referencia pasivo con fluorescencia constante que proporciona una línea base estable para la normalización de la muestra; Life Technologies Corp., Carlsbad, CA), 1 unidad de 10x Taq Gold Buffer, 0,6 mM de

10

dNTP, 7,5 unidades/reacción AmpliTaq Gold, 84 copias/reacción CTNG IC 2G28Y (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), 5 µg de ADN genómico y 1,5 x 10³ copias/diana de CMV de reacció. El volumen de reacción final se llevó a 60 µl usando agua para biología molecular. Las concentraciones de magnesio incluían 4 mM, 6 mM, 8 mM, 10 mM, 12 mM y 14 mM. Las temperaturas de hibridación incluyeron 62°C y 58°C. El colorante fluorescente Cy5 se utilizó para detectar la amplificación de la región diana, mientras que el colorante fluorescente NED (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA) se utilizó para detectar la amplificación del IC. Se empleó el análisis *maxRatio* (MR) (Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL), y se determinaron la MR promedio y el número de ciclos cuantitativos (FCN).

Ejemplo 4

[0104] Este ejemplo describe la evaluación de los cebadores y sondas de UL34 en combinación con cebadores y sondas de UL80.5 y la optimización de las condiciones de amplificación para la detección de bajos niveles de CMV en muestras de plasma y sangre entera

[0105] Se seleccionó la combinación 38 de cebadores y la sonda de UL80.5 para su evaluación con los cebadores y la sonda de UL34 en el análisis de plasma enriquecido en CMV y muestras de sangre entera, por triplicado. Se prepararon 3X de mezcla madre de reactivos que contiene 500 nM de cebador directo de UL34 de CMV, 500 nM de cebador inverso de UL34 de CMV, 200 nM de sonda FAMTM de UL34 de CMV (FAMTM, Applied Biosystems, Foster, CA), 500 nM de cebador directo de UL80 de CMV, 500 nM de cebador inverso de UL80 de CMV, 200 nM de sonda Cy5 de UL80 de CMV, 500 nM de cebador directo de IC, 500 nM de cebador inverso de IC, 200 nM de sonda de IC CT/NG (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), 12 nM de ROX, 1 unidad de 10x Taq Gold Buffer, 600 µM de dNTP, 6 mM de MgCl₂, y 7,5 unidades/µl de AmpliTaq Gold. La mezcla madre reactiva se preparó como 3X y se llevó a un volumen final de 4,1 ml utilizando agua para biología molecular. Se utilizaron veinte microlitros de la mezcla madre de reactivos 3X por reacción en un volumen total de 60 µl. Las muestras se evaluaron utilizando el sistema de detección por amplificación Abbott m2000rt (Abbott Molecular, Inc.) con condiciones de ciclado de un ciclo a 95°C durante 9,5 minutos y 45 ciclos a 92°C durante 10 segundos, 62°C durante 30 segundos y 65°C durante un minuto.

[0106] Las condiciones de ciclación se optimizaron para abordar el hecho de que el CMV es rico en GC (~ 57%). Se determinó que la combinación de un ciclo a 95°C durante 9,5 minutos, cinco ciclos a 92°C durante cinco segundos, 96°C durante 10 segundos, 66°C durante cinco segundos, 62°C durante 30 segundos, y 65°C durante segundos y 42 ciclos a 85°C durante 5 segundos, 92°C durante 10 segundos, 66°C durante 5 segundos, 62°C durante 30 segundos y 65°C durante 60 segundos era óptima.

[0107] Las condiciones también se optimizaron para erradicar amplificaciones no específicas que pueden dar lugar a resultados falsos positivos. Las pruebas se llevaron a cabo utilizando agua como diana. Los cebadores y las sondas se prepararon en la mezcla madre de reacción para PCR. Los resultados se muestran en la Tabla V.

Tabla V

Resultados a partir de experimentos que analizan la detección por amplificación no específica de CMV (FAM)		
Prueba	Seq Id Nos. analizadas (FP-sonda-RP)	Resultado
1	[UL34] 1-51-50/[UL80] 16-60-47	1/184 reactivo
	[UL34] 1-51-50/[UL80] 16-59-47	2/184 reactivo
2	[UL34] 1-51-50/[UL80] 16-60-48	1/184 reactivo
3	[UL34] 49-51-50	0/280 reactivo
4	[UL34] 49-51-50/[UL80] 16-60-47	27/184 reactivo
	[UL34] 49: 51-50/[UL80] 16-60-48	25/184 reactivo
	[UL34] 49-51-50/[UL80] 16-59-48	17/184 reactivo
5	[UL34] 1-51-50/[UL80] 16-60-47	3/24 reactivo
	[UL34] 49-51-2/[UL80] 16-60-47	6/24 reactivo
6	[UL34] 1-51-57/[UL80] 16-60-47	4/24 reactivo
	[UL34] 49-51-2/[UL80] 16-60-47	1/24 reactivo
	[UL34] 49-51-50/[UL80] 16-60-47	0/24 reactivo

	[UL80] 16-60-47	13/208 reactivo
	[UL34] 49-51-50	0/96 reactivo
7	[UL80] 16-33-47	0/32 reactivo
	[UL80] 16-52-47	0/32 reactivo
	[UL80] 16-59-47	0/32 reactivo
	[UL80] 16-33-48	1/32 reactivo
	[UL80] 16-52-48	0/32 reactivo
	[UL80] 16-59-48	0/32 reactivo
8	[UL34] 49-51-57/[UL80] 16-52-47	0/96 reactivo
	[UL34] 49-51-50/[UL80] 16-52-47	0/96 reactivo
9	[UL34] 49-51-50/[UL80] 16-52-47/[IC] 53-55-54	1/768 reactiva

[0108] Las condiciones también se optimizaron para las muestras de sangre entera. La detección de niveles muy bajos de CMV es difícil en sangre entera debido a la presencia de grandes cantidades de ADN genómico humano y la competencia de la unión no específica de los cebadores y la sonda. Se hicieron las siguientes modificaciones en los cebadores y la sonda de UL34 con el fin de optimizar las condiciones para las muestras de sangre entera (las adiciones se muestran en negrita, las delecciones se muestran mediante tachado):

cebadador directo (FP): 5' **TGA** ACT TCA TCA TCA CCA CCC GAG ACT 3' [SEQ ID NO: 49],
 cebador inverso (RP): 5' **CCT** TGT ACG CTT TGG AAA TCG AGC CTG 3' [SEQ ID NO: 50], y
 sonda: 5' Quasar - **CG ACG** ATT CAG TCC TGC GAG CC - BHQ2 dT 3' [secuencia de nucleótidos es SEQ ID NO: 51].

[0109] Con respecto al cebador directo, es interesante observar que la adición de TCT al extremo 3', en lugar de la adición de TGA al extremo 5', disminuyó el rendimiento. Con respecto al cebador inverso, la adición de CC al extremo 3' fue comparable a la adición de CCT al extremo 5'. Con respecto a la sonda, la adición de CGACG al extremo 5' y la eliminación de GCCGAGAT del extremo 3' de la sonda mejoraron el rendimiento. El siguiente cambio se hizo a la sonda UL80.5 en combinación no. 38 con el fin de optimizar las condiciones para muestras de sangre entera:

sonda directa: 5' GGC TCT GGG AAG CTG CGG C 3' [SEQ ID NO: 33] se reemplazó con sonda inversa: 5'AAGCCGCCGACGCTTCCCAG 3' [SEQ ID NO: 52].

[0110] El cebador directo, el cebador inverso y la sonda seleccionados para la amplificación del IC (gen de hidroxipiruvato reductasa de *Cucurbita pepo*) son los siguientes:

cebadador directo (FP): 5' CLL CAC LLL CLC LLG CAG 3'
 en el que L = 5-propinil dU [SEQ ID NO: 53],
 cebador inverso (RP): 5' ACA AAT TTG GAA GCC ATG CAT CA 3' [SEQ ID NO: 54], y
 sonda: 5' NED - AA GCT GAC GAG TTC ATG AGG GCA GG - BHQ2-dT 3' [secuencia de nucleótidos es SEQ ID NO: 55].

[0111] Se seleccionaron las siguientes concentraciones de cebador y sonda para la PCR (Tabla VI):

Tabla VI

FP de UL34	0,5 µM
RP de UL34	0,5 µM
sonda de UL34	100 nM
FP de UL80.5	0,5 µM
RP de UL80.5	0,5 µM
sonda de UL80.5	150 nM
FP de IC	0,5 µM
RP de IC	0,5 µM
sonda de IC	150 nM
dNTP	0,8 mM
ROX	120 nM
MgCl ₂	6 mM
Ampli Taq Gold	11,25 unidades/reacción

El análisis del nivel de detección (LOD) del ensayo de muestras de plasma enriquecidas con CMV indicó que el 100% de las muestras que contenían 14 copias/ml (o 1,13 log de copias/ml; 95% de intervalo de confianza de 11-19 copias/ml o 1,04-1,29 log de copias/ml) o más de CMV inactivado se detectaron con un 95% de probabilidad. El

análisis de LOD del ensayo de muestras de sangre entera enriquecidas con CMV indicó que el 100% de las muestras que contenían 27 copias/ml (intervalo de confianza del 95% de 24-31 copias/ml) o más de CMV inactivado se detectaron con un 95% de probabilidad. La diferencia en el LOD de ensayo entre las muestras de plasma y las muestras de sangre entera reflejan la diferencia en el volumen de entrada de muestra para la preparación de la muestra. El límite de detección se define como la concentración de ADN del CMV detectada con una probabilidad del 95% o superior. Cuando el rendimiento del ensayo se estandariza según el 1er. Estándar internacional de la OMS para el citomegalovirus humano, los valores en IU/ml son:

5		
10	plasma	21,08 UI/ml (IC del 95% 17,01 a 30,10 UI/ml) y
	sangre entera	41,99 UI/ml (IC del 95% 37,61 a 48,72 UI/ml).

Ejemplo 5

[0112] Este ejemplo demuestra que el ensayo detecta cantidades esperadas de ADN de CMV.

[0113] El Zeptomatrix OptiQuant_{CMV} Panel (Zeptomatrix Corp., Buffalo, NY) es un panel de concentraciones variables de viriones de CMV intactos para la extracción y el ensayo de ADN. El panel se utiliza rutinariamente en la técnica para evaluar el rendimiento de un ensayo de CMV determinado. Se detectó la cantidad esperada de ADN del panel purificado a partir de viriones completos usando el ensayo de CMV de tiempo real Abbott (n = 6 réplicas para cada nivel de panel). Los niveles objetivo de CMV de los miembros del panel nominales son 2,7, 3,7, 4,7 y 5,7 log de copias/ml para los miembros del panel 5E2, 5E3, 5E4 y 5E5 de CMV_{tc}, respectivamente. Los resultados de las pruebas (promedio de log copias/ml para 6 réplicas) con el ensayo de CMV de tiempo real Abbott utilizando los cebadores y las sondas descritas en el ejemplo anterior fueron 2,48, 3,37, 4,35 y 5,42 log de copias/ml para los miembros del panel 5E2, 5E3, 5E4 y 5E5 de CMV_{tc}, respectivamente.

[0114] Este ejemplo demuestra que el ensayo no genera resultados falsos positivos para CMV en presencia de posibles reactivos cruzados, y que no había interferencia en el rendimiento del ensayo en presencia de los posibles reactivos cruzados para muestras positivas en CMV.

[0115] Los reactivos cruzados potenciales (por ejemplo, virus del Herpes simplex (VHS)-1 (ácido nucleico purificado), VHS-2 (ácido nucleico purificado), virus Epstein-Barr (EBV, ácido nucleico purificado), virus del herpes humano (VHHV)-6A (ácido nucleico purificado), VHH-6B (ácido nucleico purificado), VHH-7 (ácido nucleico purificado), virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV)/VHH-8 (ácido nucleico purificado), virus Vaccinia (VACV, ácido nucleico purificado), virus Varicella Zoster (VZV, ácido nucleico purificado), poliomavirus humano BK (ácido nucleico purificado), *Chlamydia trachomatis* (ácido nucleico purificado), *Neisseria gonorrhoeae* (ácido nucleico purificado), *Candida albicans* (ácido nucleico purificado), *Staphylococcus aureus* (ácido nucleico purificado), *Staphylococcus epidermidis* (ácido nucleico purificado), *Mycobacterium gordonae* (ácido nucleico purificado), *Mycobacterium smegmatis* (ácido nucleico purificado), virus de inmunodeficiencia humana (VIH)-1 (ácido nucleico purificado), VIH-2 (lisado viral), HTLV-1 (lisados virales), virus del papiloma humano (HPV)-16 (ácido nucleico purificado), HPV-18 (ácido nucleico purificado), virus de la hepatitis B (VHB, ácido nucleico purificado) y virus de la hepatitis C (VHC, ácido nucleico purificado)) en muestras de plasma de CMV se analizaron en cuanto a la reactividad cruzada. Se añadió ácido nucleico purificado o lisado vírico de cada virus o microorganismo al control negativo de CMV y muestras de plasma o sangre entera que contenían aproximadamente 3.120 UI/ml de ADN de CMV. Todos los posibles reactivos cruzados se probaron a una concentración objetivo de 1×10^5 cp/ml. No se observó interferencia en el rendimiento del ensayo en presencia de los reactivos cruzados potenciales para todas las muestras positivas y negativas probadas.

Ejemplo 7

[0116] Este ejemplo describe una comparación del ensayo con la prueba de Artus para CMV en el análisis de muestras clínicas para la correlación clínica.

[0117] Se probaron muestras clínicas de sangre entera (n = 114) del Hospital de St. Louis (París, Francia) y se produjeron resultados positivos. Los resultados se compararon con los valores determinados por el laboratorio del hospital mediante la prueba de Artus CMV, mostrando que el 86% de las muestras clínicas estaban dentro de 0,5 log de los valores registrados de los dos ensayos, con una diferencia promedio entre ensayos cerca de 0 (diferencia promedio de ensayo - Artus = -0,08). El hospital de St. Louis también proporcionó muestras clínicas emparejadas en el plasma que no se probaron previamente. La comparación de las pruebas de CMV de muestras clínicas de sangre entera con su muestra equivalente de plasma (tal como se describe en el presente documento) mostró el 82% de muestras clínicas dentro de 0,5 log de los valores descritos de ambos tipos de muestras, con una diferencia promedio entre los tipos de muestras cerca de 0 (diferencia promedio ensayo de plasma - ensayo de sangre entera = -0,11).

Ejemplo 8

[0118] Este ejemplo describe la linealidad del ensayo.

5 [0119] Utilizando los componentes del ensayo descritos en la Tabla VI, se determinó que la linealidad estaba un intervalo de 31,20 UI/ml a 156 millones de UI/ml para muestras de plasma enriquecidas con ADN de CMV, y de 62,40 UI/ml a 156 millones de UI/ml para las muestras de sangre entera enriquecidas con el ADN de CMV.

Ejemplo 9

10 [0120] Este ejemplo describe la precisión del ensayo.

15 [0121] Los paneles de precisión se produjeron con el plásmido CMV (altos niveles objetivo a más de 1,56 millones de UI/ml) o virus de CMV inactivado (niveles objetivo de medio a bajo de 1,56 millones de UI/ml o inferior) enriquecidos en plasma humano agrupado y también en sangre entera humana. La prueba se realizó con tres lotes de reactivos de amplificación en tres grupos de instrumentos para cada conjunto de paneles. El ensayo fue diseñado para lograr una desviación estándar entre ensayos (SD) de menos de o igual a 0,500 log UI/ml para muestras de plasma que contienen de 780 a 15,6 millones de UI/ml de ADN de CMV y para muestras de sangre entera que contienen de 1560 a 15,6 millones UI/ml de ADN de CMV.

20 Tabla VII: Precisión para muestras de plasma

Miembro del panel	n	Conc. promedio (UI/ml)	Conc. promedio (log UI/ml)	SD de componente dentro de una prueba (log UI/ml)	SD de componente entre pruebas (log UI/ml)	SD ^a entre ensayos (log UI/ml)
1	40 ^b	<u>19</u>	<u>1,23</u>	<u>0,232</u>	0,055	<u>0,239</u>
2	53 ^c	<u>32</u>	<u>1,41</u>	<u>0,269</u>	<u>0,173</u>	<u>0,320</u>
3	60	<u>103</u>	<u>1,99</u>	<u>0,134</u>	<u>0,020</u>	<u>0,136</u>
4	60	<u>848</u>	<u>2,92</u>	0,058	<u>0,067</u>	<u>0,088</u>
5	60	<u>6.835</u>	<u>3,83</u>	<u>0,053</u>	<u>0,035</u>	0,063
6	60	<u>69.405</u>	<u>4,83</u>	0,046	<u>0,042</u>	<u>0,062</u>
7	60	<u>1.173.359</u>	<u>6,07</u>	<u>0,036</u>	<u>0,017</u>	<u>0,039</u>
8	60	<u>12.075.054</u>	<u>7,08</u>	0,050	<u>0,028</u>	<u>0,057</u>
9	59 ^d	<u>59.407.767</u>	<u>7,77</u>	0,036	<u>0,026</u>	<u>0,044</u>
10	59 ^d	<u>187.017.056</u>	<u>8,26</u>	<u>0,042</u>	<u>0,020</u>	<u>0,047</u>

^a SD entre ensayos contiene los componentes dentro de una prueba y entre pruebas.

^b ADN de CMV no se detectó en 20 réplicas.

^c ADN de CMV no se detectó en 6 réplicas. Se determinó que una réplica del miembro del panel 2 era un valor atípico y fue, por lo tanto, eliminado del análisis de datos.

^d Una réplica no generó resultado debido al error del instrumento.

Tabla VII: Precisión para muestras de sangre entera

Miembro del panel	n	Conc. promedio (UI/ml)	Conc. promedio (log UI/ml)	SD de componente dentro de una prueba (log UI/ml)	SD de componente entre pruebas (log UI/ml)	SD ^a entre ensayos (log UI/ml)
1	54 ^b	<u>55</u>	<u>1,68</u>	0,235	0,045	0,239
2	59 ^c	<u>99</u>	<u>1,93</u>	<u>0,233</u>	<u>0,082</u>	0,247
3	60	<u>185</u>	<u>2,24</u>	<u>0,153</u>	0,000	<u>0,153</u>
4	60	<u>1.492</u>	<u>3,17</u>	<u>0,063</u>	<u>0,012</u>	<u>0,064</u>
5	60	<u>13.305</u>	<u>4,12</u>	0,036	0,000	0,036
6	60	<u>129.498</u>	<u>5,11</u>	0,050	0,000	0,050
7	60	<u>1.298.102</u>	<u>6,11</u>	<u>0,030</u>	<u>0,012</u>	0,032
8	60	<u>13.305.411</u>	<u>7,12</u>	0,074	<u>0,027</u>	0,079
9	60	<u>65.277.486</u>	<u>7,81</u>	<u>0,060</u>	0,000	<u>0,060</u>
10	60	<u>201.514.426</u>	<u>8,30</u>	<u>0,031</u>	<u>0,019</u>	<u>0,036</u>

^a SD entre ensayos contiene los componentes dentro de una prueba y entre pruebas.

^b ADN de CMV no se detectó en 6 réplicas.

^c ADN de CMV no se detectó en 1 réplica.

25 Los resultados presentados anteriormente son representativos de la precisión observada utilizando el conjunto de cebadores y sonda de CMV para detectar el ARN de CM purificado de las muestras de plasma y sangre entera,

respectivamente.

5 **[0122]** Todas las patentes, publicaciones de solicitud de patentes, artículos de revistas, libros de texto, y otras publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de experiencia de los expertos en la materia a la que pertenece la invención.

10 **[0123]** Las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, las referencias a "el procedimiento" incluyen uno o más procedimientos y/o etapas del tipo que se describen en el presente documento y/o que serán evidentes para los expertos en la materia tras la lectura de la memoria.

15 **[0124]** Los términos y expresiones que se han empleado se utilizan como términos de descripción y no de limitación. En este sentido, cuando ciertos términos se definen bajo "Definiciones" y se definen, describen o discuten de otro modo en otra parte de la "Descripción detallada", todas estas definiciones, descripciones y discusiones pretenden atribuirse a tales términos. Tampoco hay ninguna intención en el uso de tales términos y expresiones de excluir ningún equivalente de las características mostradas y descritas o partes de las mismas. Además, aunque los subtítulos, por ejemplo, "Definiciones", se utilizan en la "Descripción detallada", dicho uso es únicamente para facilitar la referencia y no se pretende limitar ninguna divulgación realizada en una sección a solamente esa sección; más bien, cualquier divulgación realizada bajo un subtítulo pretende constituir una divulgación cada uno y todos los otros subtítulos.

20 **[0125]** Se reconoce que son posibles diversas modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada.

LISTADO DE SECUENCIAS

25

[0126]

<110> ABBOT LABORATORIES

30 <120> MATERIALES Y PROCEDIMIENTO PARA DETECTAR CITOMEGALOVIRUS (CMV)

<130> 10837W001

35 <150> US 61/432,012

<151> 2011-01-12

<160> 76

40 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> ADN

45 <213> Citomegalovirus humano

<400> 1

acttcatcat caccacccga gact 24

<210> 2

50 <211> 24

<212> ADN

<213> Citomegalovirus humano

<400> 2

55 tgtacgcttt ggaaatcgag cctg 24

<210> 3

<211> 25

<212> ADN

60 <213> Citomegalovirus humano

<400> 3

attcagtcct gcgagccgcc gagat 25

65 <210> 4

<211> 20

<212> ADN

	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 4	
5	atgtcgcacc ctctgagtgc	20
	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 5	
	caccctctga gtgctgcggt	20
	<210> 6	
15	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 6	
20	cgctacggct cctccaggt	19
	<210> 7	
	<211> 20	
	<212> ADN	
25	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 7	
	tgctaccgtg gcaggtgcgt	20
30	<210> 8	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Citomegalovirus humano	
35	<400> 8	
	ccagtcgctc ggcagcgc	18
	<210> 9	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 9	
45	ccttctgctt cgccagcacc	20
	<210> 10	
	<211> 22	
	<212> ADN	
50	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 10	
	tgcccttgcc gtcttatccc gc	22
	<210> 11	
55	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 11	
60	ccttgccgtc ttatcccgc	19
	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> ADN	
65	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 12	
	ccgtgccgcc gccaccatca	20

	<210> 13	
	<211> 17	
	<212> ADN	
5	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 13	
	tgccgccgcc accatca	17
10	<210> 14	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Citomegalovirus humano	
15	<400> 14	
	agcgacggtg gaagtggcg	19
	<210> 15	
	<211> 25	
20	<212> ADN	
	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 15	
25	gcgggttcca atcagcagca gcaac	25
	<210> 16	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Citomegalovirus humano	
30	<400> 16	
	cggctagtgt cgtgtagc	19
	<210> 17	
35	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 17	
40	cgccgcagct tcccagagc	19
	<210> 18	
	<211> 22	
	<212> ADN	
45	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 18	
	ccgctacggc tcctccaggt gc	22
50	<210> 19	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Citomegalovirus humano	
55	<400> 19	
	gcacctggag gagccgtagc gg	22
	<210> 20	
	<211> 21	
60	<212> ADN	
	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 20	
65	taccgtggca ggtgcgtcgc c	21
	<210> 21	
	<211> 22	
	<212> ADN	

	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 21	
5	cgacgcacct gccacggtag ca	22
	<210> 22	
	<211> 26	
	<212> ADN	
10	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 22	
	gcctcacgac ggagtttatt taccca	26
	<210> 23	
15	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 23	
20	ggtgctggcg aagcagaagg a	21
	<210> 24	
	<211> 24	
	<212> ADN	
25	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 24	
	cgtcgtgggt tacgaccagt tggc	24
30	<210> 25	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Citomegalovirus humano	
35	<400> 25	
	gccaactggt cgtaaccac gac	23
	<210> 26	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 26	
45	gcctattacc gtcggcgcga	20
	<210> 27	
	<211> 20	
	<212> ADN	
50	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 27	
	tcgcgccgac ggtaataggc	20
	<210> 28	
55	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 28	
60	gcgggttcca atcagcagca gcaac	25
	<210> 29	
	<211> 25	
	<212> ADN	
65	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 29	
	gttgctgctg ctgattggaa cccgc	25

<210> 30
 <211> 25
 <212> ADN
 5 <213> Citomegalovirus humano

 <400> 30
 cgatgaactg cgggatgcca ttcac 25

 10 <210> 31
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Citomegalovirus humano

 15 <400> 31
 gtgaatggca tcccgcagtt catcg 25

 20 <210> 32
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Citomegalovirus humano

 25 <400> 32
 cgccgcagct tcccagagc 19

 30 <210> 33
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Citomegalovirus humano

 <400> 33
 ggctctggga agctgcggc 19

 35 <210> 34
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Citomegalovirus humano

 40 <400> 34
 cacaaaaatc cgccgattca gatc 24

 45 <210> 35
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Citomegalovirus humano

 <400> 35
 cggcgacgca cctgccacg 19

 50 <210> 36
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Citomegalovirus humano

 55 <400> 36
 cacagccggc gacgcacct 19

 60 <210> 37
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Citomegalovirus humano

 65 <400> 37
 ggtaaataaaa ctccgctcgtg aggc 24

 <210> 38
 <211> 21
 <212> ADN

	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 38	
5	ctggcccca gtagcgagaa a	21
	<210> 39	
	<211> 19	
	<212> ADN	
10	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 39	
	ggcgctgccg agcgactgg	19
	<210> 40	
15	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 40	
20	gcgggataag acggcaaag	19
	<210> 41	
	<211> 20	
	<212> ADN	
25	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 41	
	acgtagtccg caaagtgacg	20
30	<210> 42	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Citomegalovirus humano	
35	<400> 42	
	tccatccata ccgcccggag	20
	<210> 43	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 43	
45	aatggcatcc cgcagttcat	20
	<210> 44	
	<211> 25	
	<212> ADN	
50	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 44	
	ccgaaagtaa cgtagaactc tgccg	25
55	<210> 45	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 45	
60	agagccgccg aaagtaacgt ag	22
	<210> 46	
	<211> 25	
	<212> ADN	
65	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 46	
	cgattcagat ctaccatgtc tttgg	25

<210> 47
 <211> 24
 <212> ADN
 5 <213> Citomegalovirus humano

 <400> 47
 cacaaaaatc cgccgattca gatc 24

 10 <210> 48
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Citomegalovirus humano

 15 <400> 48
 tcgagcttat tgagcgca 18

 20 <210> 49
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Citomegalovirus humano

 25 <400> 49
 tgaacttcat catcaccacc cgagact 27

 30 <210> 50
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Citomegalovirus humano

 <400> 50
 ccttgtacgc tttggaaatc gagcctg 27

 35 <210> 51
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Citomegalovirus humano

 40 <400> 51
 cgacgattca gtcctgcgag cc 22

 45 <210> 52
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Citomegalovirus humano

 <400> 52
 aagccgccgc agcttcccag 20

 50 <210> 53
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Cucurbita pepo

 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> N es 5-propinil du

 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(9)
 <223> N es 5-propinil du

 65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)

	<223> N es 5-propinil du	
	<220>	
5	<221> misc_feature	
	<222> (13)..(14)	
	<223> N es 5-propinil du	
	<400> 53	
10	cnnacnnc ncngcag	18
	<210> 54	
	<211> 23	
	<212> ADN	
15	<213> Cucurbita pepo	
	<400> 54	
	acaaatttg aagccatgca tca	23
	<210> 55	
20	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Cucurbita pepo	
	<400> 55	
25	aagctgacga gttcatgagg gcagg	25
	<210> 56	
	<211> 27	
30	<212> ADN	
	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 56	
	acttcatcat caccacccga gacttct	27
35	<210> 57	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Citomegalovirus humano	
40	<400> 57	
	tgtacgcttt ggaaatcgag cctgcc	26
	<210> 58	
45	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 58	
50	acgattcagt cctgcgagcc gccga	25
	<210> 59	
	<211> 20	
55	<212> ADN	
	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 59	
	ctgggaagct gcggcggctt	20
60	<210> 60	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Citomegalovirus humano	
65	<400> 60	
	ctctgggaag ctgcgcggc	20
	<210> 61	

ES 2 657 064 T3

<211> 1224
 <212> ADN
 <213> Citomegalovirus humano

5 <400> 61
 atgaacttca tcatacaccac ccgagacttc tccaacgacg attcagtcct gcgagccgcc 60
 gagatgcgtg acaacgtggc aggctcgatt tccaaagcgt acaagggcac ggtacgcgcc 120
 10 gaaggcaaga agaagctgct gctgaagcac ttgcccgtgc cgcccggcgg ctgctcgcgc 180
 cgcaacagca acctcttcgt tttctgcacc gagcgcgact accgcaagtt ccaccagggc 240
 atcgcacagc tcaagcgcgc gccggccgaa ctggaccccc acgagatcca gcaagtcacg 300
 15 gccagtatcc gctgcccctt gcagcccagt ctccgcgagc cgcccacgcc ggccgacgag 360
 ctgcagacgg ctgtgtcgcg cgtgtgcgcg ctcttcaacc agctggtttt cacggcccag 420
 20 ctgcgccact actgcgagca ccaggacaag gtggtgagct acgcgcgcga cgagttgacc 480
 aaacgctgcg gcgaaaaatc ggcgctgggc gtagaggtgc atcaactggt agccttgctg 540
 ccacacgagc gccaccgcga actgtgccac gtcctcatcg gcttggtgca ccagacgccg 600
 25 cacatgtggg cgcgctccat ccgtctcatc ggacacctgc gccactacct gcagaacagc 660
 ttctacacc tgttgatgaa ctcaggtttg gatatcgcac aagtcttcga cggctgttac 720
 30 cacagcgagg cctaccgcat gctcttccag atcggtcata cggactcggg gtcggcggcc 780
 ctggaactct cacacagcgc gccggccggg ccgcccgagg ccgatgagaa caacgacgag 840
 ggagaggagg acgacgacga gctccgtcac agcgacccgg cgccgcttca cgattccaag 900
 35 aagccccgca acgcccgtcg tccccgcaca cgcgtgccgc ctcacgagca aaagccccgaa 960
 gaaaacgagg aggaagaaga ggagctgttt ccctcctgca aggcaaccgc agcattcctg 1020
 40 cgggcagaac cctccgtctc caacgacgac ggcaacggtg gcgaaacgctg cgacacgcta 1080
 gcgaccgcc tgcggcatcg cgccgacgaa gaagacggac ctctagccag ccagacctct 1140
 gtgcgagtcg ccgcgacccc ctcaccttca gtcacctcag cccttacccc cgtcacgtcc 1200
 45 cccataaccc cgttgtgtat ttaa 1224

<210> 62
 <211> 1224
 <212> ADN
 <213> Citomegalovirus humano

50 <400> 62
 55 atgaacttca tcatacaccac ccgagacttc tccaacgacg attcagtcct gcgagccgcc 60
 gagatgcgtg acaacgtggc aggctcgatt tccaaagcgt acaagggcac ggtacgcgcc 120
 gaaggcaaga agaagctgct gctgaagcac ttgcccgtgc cgcccggcgg ctgctcgcgc 180
 60 cgcaacagca acctcttcgt tttctgcacc gagcgcgact accgcaagtt ccaccagggc 240
 atcgcacagc tcaagcgcgc gccggccgaa ctggaccccc acgagatcca gcaagtcacg 300
 gccagtatcc gctgcccctt gcagcccagt ctccgcgagc cgcccacgcc ggccgacgag 360
 65 ctgcagacgg ctgtgtcgcg cgtgtgcgcg ctcttcaacc agctggtttt cacggcccag 420
 ctgcgccact actgcgagca ccaggacaag gtggtgagct acgcgcgcga cgagctgact 480

ES 2 657 064 T3

aaacgctgcg gcgaaaaatc ggcgctgggc gtggaagtgc atcaactggt agccctgctg 540
 5 ccacacgagc gccaccgcga actgtgccac gtcctcatcg gcttgttgca ccagacgccg 600
 cacatgtggg cgcgctccat ccgctctcatc ggacacctgc gccactacct gcagaacagc 660
 ttcttacacc tgttgatgaa ctcaggtttg gatatcgcac aagttttcga cggctgttac 720
 10 cacagcgagg cctaccgcat gctcttccag atcggtcata cggactcggg gtcggcggcc 780
 ctggaactct cacacggcgc ggcggccggg ccgcccgagg ccgatgaaaa caacgacgag 840
 15 ggagaggagg acgacgacga gctccgtcac agcgaccggg cgccgcttca cgagtccaag 900
 aagccccgca acgcccgtcg tccccgcaca cgcgtgccgc ctcacgagca aaagccccgaa 960
 gaaaacgagg aggaagaaga ggagctgttt ccctcctgca aggcaaccgc agcattcctg 1020
 20 cgggcagaac cctccgtctc caacgacgac ggcaacggcg gcgaacgctg cgacacgcta 1080
 gcgaccgccc tgcggcatcg cgccgacgaa gaagacggac ctctagccag ccagaccgct 1140
 25 gtgcgggctg cgcgacccc ctcaccttca gtcaccccag cccttaccac cgtcacgtcc 1200
 ccataacc cgttggtgat ttaa 1224
 <210> 63
 <211> 1224
 30 <212> ADN
 <213> Citomegalovirus humano
 <400> 63
 35 atgaacttca tcatcaccac ccgagacttc tccaacgacg attcagtcct gcgagccgcc 60
 gagatgcgtg acaacgtggc aggctcgatt tccaaagcgt acaagggtac ggtacgcgcc 120
 gaaggcaaga agaagctgct gctgaagcac ttgcccgctg cgcccggcgg ctgctcgcgc 180
 40 cgcaacagca acctcttcgt tttctgcacc gagcgcgact accgcaagtt ccaccagggc 240
 atcgcacagc tcaagcgcgc gccggccgaa ctggaccccc acgagatcca gcaagtcacg 300
 gccagtatcc gctgccgctt gcagcccagt ctccgcgagc cgcccacgcc ggccgacgag 360
 45 ctgcagacgg ctgtgtcgcg cgtgtgcgcg ctcttcaacc agttggtttt cacggcccag 420
 ctgcgccact actgcgagca ccaggacaag gtggtgagct acgcgcgcga cgagctgact 480
 50 aaacgctgcg gcgaaaaatc ggcgctgggc gtggagggtgc atcaactggt agccctgctg 540
 ccacacgagc gccaccgcga actgtgccac gtcctcatcg gcttgttgca ccagacgccg 600
 cacatgtggg cgcgctccat ccgctctcatc ggacacctgc gccactacct gcagaacagc 660
 55 ttcttacacc tgttgatgaa ctcaggtttg gatatcgcac aagttttcga cggctgttac 720
 cacagcgagg cctaccgcat gctcttccag atcggtcata cggactcggg gtcggcggcc 780
 60 ctggaacttt cacacagcgc ggcggccggg ccgcccgagg ccgatgagaa caacgacgaa 840
 ggagaggagg acgacgacga gctccgtcac agcgaccggg cgccgcttca cgagtccaag 900
 aagccccgca acgcccgtcg tccccgcaca cgcgtgccgc ctcacgagca aaagccccgaa 960
 65 gaaaacgagg aggaagaaga ggagctgttt ccctcctgca aggcaaccgc agcattcctg 1020
 cgggcagaac cctccgtctc caacgacgac ggcaacggcg gcgaacgctg cgacacgcta 1080

ES 2 657 064 T3

gcgaccgccc tgcggcattg cgccgacgaa gaagacggac ctctagccag ccagaccgct 1140
 5 gtgCGGGTcg ccgCGacccc ctcaccttca gtcaccccag cccttacccc cgtcacgtcc 1200
 cccataaccc cgTTgtgtat ttaa 1224
 <210> 64
 <211> 1224
 10 <212> ADN
 <213> Citomegalovirus humano
 <400> 64
 15 atgaacttca tcatcaccac ccgagacttc tccaacgacg attcagtcct gcgagccgcc 60
 gagatgcgtg acaacgtggc aggctcgatt tccaaagcgt acaagggcac ggtacgcgcc 120
 gaaggcaaga agaagctgct gctgaagcac ttgcccgtac cgcccggcgg ctgctcgcgc 180
 20 cgcaacagca acctcttcgt tttctgcacc gagcgcgatt accgcaagtt ccaccagggc 240
 atcgcacagc tcaagcgcgc gccggccgaa ctggaccccc acgagatcca gcaagtcacg 300
 gccagtatcc gctgccgcct gcagcccagt ctccgcgagc cgcccacgcc ggccgacgag 360
 25 ctgcagacgg ctgtgtcgcg cgtgtgcgcg ctcttcaacc agctggtttt cacggcccag 420
 ctgCGccact actgcgagca ccaggacaag gtgggtgagct acgcgcgcga cgaactgact 480
 30 aaacgctgcg gcgaaaaatc ggcgctgggc gtggaagtgc atcaactggg agccctgctg 540
 ccacacgagc gccaccgcga actgtgccac gtcctcatcg gcttgttgca ccagacgccg 600
 cacatgtggg cgcgctccat ccgtctcatc ggacacctgc gccactacct gcagaacagc 660
 35 ttcttacacc tgTTgatgaa ctcaggTTtg gatatcgcac aagTTTTcga cggctgttac 720
 cacagcgagg cctaccgcat gctcttccag atcggtcata cggactcggg gtcggcagcc 780
 40 ctggaattct cacacagcgc ggcggccggg ccgcccgagg ccgatgagaa caacgacgag 840
 ggagaggagg acgacgacga gctccgtcac agcgacccgg cgccgcttca cgagtccaag 900
 aagccccgca acgcccgtcg tccccgcaca cgcatgccgc ctcacgagca aaagccccgaa 960
 45 gaaaacgagg aggaagaaga ggagctgTTT cctcctgca aggcaaccgc agcattcctg 1020
 cgggcagaac cctccgtctc caacgacgac ggcaacggcg gcgaacgctg cgacacgcta 1080
 50 gcgaccgccc tgcggcattg cgccgacgaa gaagacggac ctctagccag ccagaccgct 1140
 gtgCGGGTcg ccgCGacccc ctcaccttca gtcaccccag cccttacccc cgtcacgtcc 1200
 cccataaccc cgTTgtgtat ttaa 1224
 55 <210> 65
 <211> 1224
 <212> ADN
 <213> Citomegalovirus humano
 60 <400> 65
 atgaacttca tcatcaccac ccgagacttc tccaacgacg attcagtcct gcgagccgcc 60
 gagatgcgtg acaacgtggc aggctcgatt tccaaagcgt acaagggcac ggtacgcgcc 120
 65 gaaggcaaga agaagctgct gctgaagcac ttgcccgtgc cgcccggcgg ctgctcgcgc 180
 cgcaacagca acctcttcgt tttctgcacc gagcgcgact accgcaagtt ccaccagggc 240

ES 2 657 064 T3

	atgcacagc tcaagcgcgc gccggccgaa ctggaccccc acgagatcca gcaagtcacg	300
5	gccagtatcc gctgccgcct gcagcccagt ctccgcgagc cgcccacgcc ggccgacgaa	360
	ctgcagacgg ctgtgtcgcg cgtgtgcgcg ctcttcaacc agctggtttt cacggcccag	420
	ctgcgccact actgcgagca ccaggacaag gtggtgagct acgcgcgca cgagttgacc	480
10	aaacgctgcg gcgaaaaatc ggcgctgggc gtagaggtgc atcaactggt agccttgctg	540
	ccacacgagc gccaccgcga actgtgccac gtcctcatcg gcttgttgca ccagacgccg	600
15	cacatgtggg cgcgctccat ccgtctcatc ggacacctgc gccactacct gcagaacagc	660
	ttcctacacc tgttgatgaa ctcaggtttg gatatcgcac aagtcttcga cggctgttac	720
	cacagcgagg cctaccgcat gctcttccag atcggtcata cggactcggg gtcggcggcc	780
20	ctggaactct cacacagcgc gccggccggg ccgcccagg ccgatgagaa caacgacgag	840
	ggagaggagg acgacgacga gctccgtcac agcgacccgg cgccgcttca cgattccaag	900
25	aagccccgca acgcccgtcg tccccgcaca cgcgtgccgc ctcacgagca aaagccccgaa	960
	gaaaacgagg aggaagaaga ggagctgttt ccctcctgca aggaaccgc agcattcctg	1020
	cgggcagaac cctccgtctc caacaacgac ggcaacggtg gcgaacgctg cgacacgcta	1080
30	gcgaccgccc tgcggcatcg cgccgacgaa gaagacggac ctctagccag ccagacctct	1140
	gtgcgagtcg ccgcgacccc ctcaccttca gtcacctcag cccttacccc cgtcacgtcc	1200
35	cccataaccc cgttgtgtat ttaa	1224
	<210> 66	
	<211> 1224	
	<212> ADN	
40	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 66	
	atgaacttca tcatcaccac ccgagacttc tccaacgacg attcagtcct gcgagccgcc	60
45	gagatgcgtg acaacgtggc aggctcgatt tccaaagcgt acaagggcac ggtacgcgcc	120
	gaaggcaaga agaagctgct gctgaagcac ttgcccgtgc cgcccggcgg ctgctcgcgc	180
	cgcaacagca acctcttcgt tttctgcacc gagcgcgact accgcaagtt ccaccagggc	240
50	atgcacagc tcaagcgcgc gccggccgaa ctggaccccc acgagatcca gcaagtcacg	300
	gccagtatcc gctgccgcct gcagcccagt ctccgcgagc cgcccacgcc ggccgacgaa	360
55	ctgcagacgg ctgtgtcgcg cgtgtgcgcg ctcttcaacc agctggtttt cacggcccag	420
	ctgcgccact actgcgagca ccaggacaag gtggtgagct acgcgcgca cgagttgacc	480
	aaacgctgcg gcgaaaaatc ggcgctgggc gtagaggtgc atcaactggt agccttgctg	540
60	ccacacgagc gccaccgcga actgtgccac gtcctcatcg gcttgttgca ccagacgccg	600
	cacatgtggg cgcgctccat ccgtctcatc ggacacctgc gccactacct gcagaacagc	660
65	ttcctacacc tgttgatgaa ctcaggtttg gatatcgcac aagtcttcga cggctgttac	720
	cacagcgagg cctaccgcat gctcttccag atcggtcata cggactcggg gtcggcggcc	780
	ctggaactct cacacagcgc gccggccggg ccgcccagg ccgatgagaa caacgacgag	840

ES 2 657 064 T3

ggagaggagg acgacgacga gctccgtcac agcgacccgg cgccgcttca cgattccaag 900
 5 aagccccgca acgcccgtcg tccccgcaca cgcgtgccgc ctcacgagca aaagccccgaa 960
 gaaaacgagg aggaagaaga ggagctgttt ccctcctgca aggcaaccgc agcattcctg 1020
 cgggcagaac cctccgtctc caacaacgac ggcaacggcg gcgaacgctg cgacacgcta 1080
 10 gcgaccgccc tgcggcatcg cgccgacgaa gaagacggac ctctagccag ccagacctct 1140
 gtgcgagtcg ccgcgacccc ctcaccttca gtcacctcag cccttacccc cgtcacgtcc 1200
 ccataaccc cgttgtgtat ttaa 1224
 15 <210> 67
 <211> 1224
 <212> ADN
 <213> Citomegalovirus humano
 20 <400> 67
 atgaacttca tcatcaccac ccgagacttc tccaacgacg attcagtcct gcgagccgcc 60
 25 gagatgcgtg acaacgtggc aggctcgatt tccaaagcgt acaagggcac ggtacgcgcc 120
 gaaggcaaga agaagctgct gctgaagcac ttgcccgctg cgcccggcgg ctgctcgcgc 180
 cgcaacagca acctcttcgt tttctgcacc gagcgcgact accgcaagtt ccaccagggc 240
 30 atcgcacagc tcaagcgcgc gccggccgaa ctggaccccc acgagatcca gcaagtcacg 300
 gccagtatcc gctgccgctt gcagcccagt ctccgcgagc cgcccacgcc ggccgacgag 360
 ctgcagacgg ctgtgtcgcg cgtgtgcgcg ctcttcaacc agctggtttt cacggcccag 420
 35 ctgcccact actgcgagca ccaggacaag gtggtgagct acgcgcgcga cgagttgacc 480
 aaacgctgcg gcgaaaaatc ggcgctgggc gtggagggtg atcaactggt agccttgcgt 540
 40 ccacacgagc gccaccgcga actgtgccac gtcctcatcg gcttgttgca ccagacgccg 600
 cacatgtggg cgcgctccat ccgtctcatc ggacacctgc gccactacct gcagaacagc 660
 45 ttctacacc tgttgatgaa ctcaggtttg gatatcgac aagttttcga cggctgttac 720
 cacagcgagg cctaccgcat gctcttcag atcggtcata cggactcggg gtcggcggcc 780
 ctggaactct cacacagcgc agcggccggg ccgcccgagg ccgatgagaa caacgacgag 840
 50 ggagaggagg acgacgacga gctccgtcac agcgacccgg cgccgcttca cgagtccaag 900
 aagccccgca acgcccgccg tccccgcaca cgcatgccgc ctcacgagca aaagccccgaa 960
 55 gaaaacgagg aggaagaaga ggagctgttt ccctcctgca aggcaaccgc agcattcctg 1020
 cgggcagaac cctccgtctc caacgacgac ggcaacggcg gcgaacgctg cgacacgcta 1080
 gcgaccgccc tgcggcattg cgccgacgaa gaagacggac ctctagccag ccagaccgct 1140
 60 gtgcgggtcg ccgcgacccc ctcaccttca gtcaccccag cccttacccc cgtcacgtcc 1200
 ccataaccc cgttgtgtat ttaa 1224
 65 <210> 68
 <211> 1224
 <212> ADN
 <213> Citomegalovirus humano

ES 2 657 064 T3

<400> 68
atgaacttca tcatacaccac ccgagacttc tccaacgacg attcagtcct gcgagccgcc 60
5 gagatgcgtg acaacgtggc aggctcgatt tccaaagcgt acaagggcac ggtacgcgcc 120
gaaggcaaga agaagctgct gctgaagcac ttgcccgtgc cgcccggcgg ctgctcgcgc 180
cgcaacagca acctcttcgt tttctgcacc gaacgcgact accgcaagtt ccaccagggc 240
10 atcgcacagc tcaagcgcgc gccggccgaa ctggaccccc acgagatcca gcaagtcacg 300
gccagtatcc gctgcccctt gcagcccagt ctccgcgagc cgcccacgcc ggccgacgag 360
ctgcagacgg ctgtgtcgcg cgtgtgcgcg ctcttcaacc agctggtttt cacggcccag 420
15 ctgcgccact actgcgagca ccaggacaag gtggtgagct acgcgcgcga cgagttgacc 480
aaacgctgcg gcgaaaaatc ggcgctgggc gtggaggtgc atcaactggt agccttgctg 540
20 ccacacgagc gccaccgcga actgtgccac gtcctcatcg gcttggtgca ccagacgccg 600
cacatgtggg cgcgctccat ccgtctcatc ggacacctgc gccactacct gcagaacagc 660
ttcctacacc tgttgatgaa ctcaggtttg gatatcgcgc aagtcttcga cggctgttac 720
25 cacagcgagg cctaccgcat gctcttcagc atcggtcata cggactcggg gtcggcggcc 780
ctggaactct cacacagcgc ggcggccggg ctgcccgagg ccgatgagaa caacgacgag 840
30 ggagaggagg acgacgacga gctccgtcac agcgacccgg cgccgcttca cgagtccaag 900
aagccccgca acgcccgtcg tccccgcaca cgcattgccg ctcacgagca aaagccccgaa 960
gaaaacgagg aggaagaaga ggagctgttt cctcctgca aggcaaccgc agcattcctg 1020
35 cgggcagaac cctccgtctc caacgacgac ggcaacggcg gcgaacgctg cgacacgcta 1080
gcgaccgccc tgcggcattg cgccgacgaa gaagacggac ctctagccag ccagaccgct 1140
40 gtgcgggctg ccgcgacccc ctcaccttca gtcaccccag cccttacccc cgtcacgtcc 1200
cccataacc cgttgtgtat ttaa 1224

<210> 69
45 <211> 2127
<212> ADN
<213> Citomegalovirus humano

<400> 69
50 atgacgatgg acgagcagca gtcgcaggct gtggcgccgg tctacgtggg cggctttctc 60
gcccgctacg accagtctcc ggacgaggcc gaattgctgt tgccgcggga cgtagtggag 120
cactggttgc acgcgcaggg ccagggacag ccttcgttgt cggtcgcgct cccgctcaac 180
55 atcaaccacg acgacacggc cgttgtagga cacgttgcgg cgatgcagag cgtccgcgac 240
ggtctttttt gcctgggctg cgtcacttcg cccaggtttc tggagattgt acgccgcgct 300
60 tcggaaaagt ccgagctggg ttcgcgcggg cccgtcagtc cgctgcagcc agacaagggtg 360
gtggagtttc tcagcggcag ctacgccggc ctctcgtctt ccagccggcg ctgcgacgac 420
gtggaggccg cgacgtcgtt ttcgggctcg gaaaccacgc cgttcaaaca cgtggctttg 480
65 tgcagcgtgg gtcggcgtcg cggtagcttg gccgtgtacg ggcgcgatcc cgagtgggtc 540
acacagcggg ttccagacct cacggcggcc gaccgtgacg ggctacgtgc acagtggcag 600

ES 2 657 064 T3

cgctgctgca gcaactgctgt cgacgcgtcg ggcgatccct ttcgctcaga cagctacggc 660
 5 ctgttgggca acagcgtgga cgcgctctac atccgtgagc gactgcccga gctgctgtac 720
 gacaagcaac tagtcggcgt gacggagcgc gagtcgtacg tcaaggcgag cgtttcgcct 780
 gagggcggcgt gcgttattaa agcggcgtcc gccgagcgtt cgggagacag ccgcagtcag 840
 10 gccgccacgc cggcggctgg ggcgcgcggt ccctcttcgt ccccgctgcc tccagtcgaa 900
 ccgccatctc ctgtacagcc gcctgcgctt ccagcgtcgc cgtccgttct tcccgcggaa 960
 tcaccgccgt cgctttctcc ctcggagccg gcagaggcgg cgtccatgct gcaccctctg 1020
 15 agtgctgctg tttccgcccgc tacggctcct ccagggtgcta cctgggagcgg tgcgtcgcgg 1080
 gctgtgtcgt ctctagcgtg gcctcacgac ggagtttatt taccxaaaga cgcttttttc 1140
 20 tcgctacttg gggccagtcg ctcggcagcg cccgtcatgt atcccggcgc cgtagcggcc 1200
 cctccttctg cttcgccagc accgctgcct ttgccgtctt atcccgcgtc ctacggcggc 1260
 cccgctcgtg gttacgacca gttggcggca cgtcactttg cggactacgt ggatcccat 1320
 25 tatcccgggt ggggtcggcg ttacgagccc gcgccgtctt tgcattccgtc ttatcccgtg 1380
 ccgccgccac catcaccggc ctattaccgt cggcgcgact ctccgggagg tatggatgaa 1440
 30 ccaccgtccg gatgggagcg ttacgacggt ggtcaccgtg gtcagtcgca gaagcagcac 1500
 cgtcacgggg gcagcggcgg acacaacaaa cgccgtaagg aaaccgcggc ggcgtcgtcg 1560
 tcgtcctcgg acgaagactt gagtttcca ggcgaggccg agcacggccg ggcacgaaag 1620
 35 cgtctaaaaa gtcacgtcaa tagcgacggt ggaagtggcg ggcacgcggg ttccaatcag 1680
 cagcagcaac aacgttacga tgaactgcgg gatgccattc acgagctgaa acgcgatctg 1740
 40 tttgccgcgc ggcagagttc tacgttactt tcggcggctc tcccctctgc ggcctcttcc 1800
 tcccacta ctactaccgt gtgtactccc accagcagc tgacgagtg cggaggagaa 1860
 acaccacgg cacttctatc cggagggtgcc aaggtagctg agcgcgctca ggccggcgtg 1920
 45 gtgaacgcca gttgccgctt cgctaccgcg tcgggttctg aggcggcaac ggccgggccc 1980
 tcgacggcag gttcttcttc ctgcccggct agtgctcgtg tagccgcccg tgctgccaa 2040
 50 gccgccgag cttcccagag cccgccc aaa gacatggtag atctgaatcg gcggattttt 2100
 gtggctgctc tcaataagct cgagtaa 2127
 <210> 70
 55 <211> 2127
 <212> ADN
 <213> Citomegalovirus humano
 <400> 70
 60 atgacgatgg acgagcagca gtcgcaggct gtggcggcgg tctacgtggg cggctttctc 60
 gccgctacg accagtctcc ggacgaggcc gaattgctgt tgccgaggga cgtagtgag 120
 cactggttgc acgcgcaggg ccagggacag ccttcgttgt cggctcgcgt cccgctcaac 180
 65 atcaaccacg acgacacggc cgttgtagga cacgttgagg cgatgcagag cgtccgcgac 240
 ggtctttttt gcctgggctg cgtcacttcg cccaggtttc tggagattgt acgccgcgct 300

ES 2 657 064 T3

	tcggaaaagt ccgagctggt ttcgcgcggg cccgtcagtc cgctgcagcc agacaaggtg	360
5	gtggagtttc tcagcggcag ctacgccggc ctctcgctct ccagccggcg ctgcgacgac	420
	gtggaggccg cgacgtcgct ttcgggctcg gaaaccacgc cgttcaaaca cgtggctttg	480
	tgcagcgtgg gtcggcgctg cgggtacgttg gccgtgtacg ggcgcgatcc cgagtgggtc	540
10	acacagcggg ttccagacct cacggcggcc gaccgtgacg ggctacgtgc acagtggcag	600
	cgctgcggca gcaactgctgt cgacgcgctg ggcgatccct ttcgctcaga cagctacggc	660
15	ctgttgggca acagcgtgga cgcgctctac atccgtgagc gactgcccaa gctgcgctac	720
	gacaagcaac tagtcggcgt gacggagcgc gagtcatacg tcaaggcgag cgtttcgcct	780
	gaggcggcgt gcgatattaa agcggcgctc gccgagcgtt cgggcgacag ccgcagtcag	840
20	gccgccacgc cggcggctgg ggcgcgctt ccctcttcgt ccccgctgcc tccagtcgaa	900
	ccgccatctc ctgtacagcc gcctgcgctt ccagcgtcgc cgtccgttct tcccgcggaa	960
25	tcaccgccgt cgctttctcc ctcggagccg gcagaggcgg cgtccatgtc gcaccctctg	1020
	agtgtctcgg ttcccgccgc tacggctcct ccagggtgcta ccgtggcagg tgcgtcgccg	1080
	gctgtgtcgt ctctagcgtg gcctcacgac ggagtttatt tacccaaaga cgcttttttc	1140
30	tcgctacttg gggccagtcg ctcggcagtg cccgtcatgt atcccggcgc cgtagcggcc	1200
	cctccttctg cttcgccagc accgctgcct ttgccgtctt atcccgcgtc ctacggcgcc	1260
35	cccgtcgtgg gttacgacca gttggcggca cgtcactttg cggactacgt ggatcccat	1320
	tatcccgggt ggggtcggcg ttacgagccc gcgccgtctt tgcatccgtc ttatcccgtg	1380
	ccgccgccac catcaccggc ctattaccgt cggcgcgact ctccgggagg tatggatgaa	1440
40	ccaccgtccg gatgggagcg ttacgacggt ggtcaccgtg gtcagtcgca gaagcagcac	1500
	cgtcacgggg gcagcggcgg acacaacaaa cgccgtaagg aaaccgcggc ggcgtcgtcg	1560
45	tcgtcctcgg acgaagactt gagtttcca ggcgaggccg agcacggccg ggcacgaaag	1620
	cgtctaaaaa gtcacgtcaa tagcgacggt ggaagtggcg ggcacgcggg ttccaatcag	1680
	cagcagcaac aacgttacga tgaactgcgg gatgccattc acgagctgaa acgcgatctg	1740
50	tttgctgcgc ggcagagttc tacgttactt tcggcggctc ttccctctgc ggcctcttcc	1800
	tccccaaacta ctactaccgt gtgtactccc accggcgagc tgacgagtgg cggaggagaa	1860
55	acaccacgg cacttctatc cggagggtgcc aaggtagctg agcgcgctca ggccggcgtg	1920
	gtgaacgcca gttgccgctt cgctaccgcg tcgggttctg aggcggcaac ggccgggccc	1980
	tcgacggcag gttcttcttc ctgcccggct agtgtcgtgt tagccgccgc tgctgcccaa	2040
60	gccgccgcag cttcccagag cccgcccaaa gacatggtag atctgaatcg gcggatTTTT	2100
	gtggctgcgc tcaataagct cgagtaa	2127
65	<210> 71	
	<211> 2124	
	<212> ADN	
	<213> Citomegalovirus humano	

ES 2 657 064 T3

<400> 71
atgacgatgg acgagcagca gccgcaggct gtgacgccgg tctacgtggg cggctttctc 60
5 gcccgttacg accagtctcc ggacgaggcc gaattgctgt tgccgcggga cgtagtggag 120
cactggttgc acgcgcaggg ccagggacag ccttcgttgt cggtcgcgct cccgctcaac 180
10 atcaaccacg acgacacggc cgttgtagga cacgttgccg cgatgcagag cgttcgcgac 240
ggtctttttt gtctaggttg cgtcacttcg cccaggtttc tggagattgt gcgccgct 300
tcggaaaagt ccgagctggt ttcgcgcggg cccgtcagtc cgctgcagcc ggacaagggtg 360
15 gtggagtttc tcagcggcag ctacgccggc ctctcgctct ccagccggcg ctgcgacgac 420
gtggaggccg cgacgtcgtt ttcgggctcg gaaaccacgc cgttcaaaca cgtggctttg 480
tgcagcgtgg gtcggcgctc cggtagcttg gctgtgtacg gacgcgatcc cgagtggggtt 540
20 acccagcggg ttccagacct cacggcggcc gaccgcgacg ggctacgtgc acagtggcag 600
cgctgcggca gcaactgctg cgacgcgctc ggcgatccct ttcgctcaga cagctacggc 660
25 ctggtgggca acagcgtgga cgcgctctac atccgtgagc gactgcccaa gctgcgctac 720
gacaagcaac tagtcggcgt gacggagcgc gagtcgtacg tcaaggcgag cgtttcgcct 780
gaggcggcgt gcgatattaa agcggcgtcc gccgagcgtt cgggcgacag ccgagtcag 840
30 gccgccacgc cggcggctgg ggcgcgtggt ccctcttcat ccccgtcgcc tccagtcgaa 900
ccgccatctc ctgtccagcc gcctgcgctt ccagcgtcgc cgtccgttct ccccgcggaa 960
35 tcatcgccgt cgctttctcc ttcggagccg gcagaggcgg cgtccatgtc gcaccctctg 1020
agtgtcgcgg ttaccgccgc tacggctcct ccaggtgcta ccgtggcagg tgcgtcgccg 1080
gctgtgccgt ctttagcgtg gcctcacgac ggagtttatt taccxaaaga cgcttttttc 1140
40 tcgctacttg gggccagtcg ctcggcagcg cccgtcatgt atcccggcg cgtagcggcc 1200
cctccttctg cttcgccagc accgctgcct ttgccgtctt atcccgcgtc ctacggcgcc 1260
45 cccgtcgtgg gttacgacca gttggcggca cgtcactttg cggactacgt ggatcccat 1320
tatcccgggt ggggtcggcg ttacgagccc gcgccgtctt tgcatccgtc ttatcccgtg 1380
ccgccgccac catcaccggc ctattaccgt cggcgcgact ctccgggagg tatggatgaa 1440
50 ccaccgtccg gatgggagcg ttacgacggt agtcaccgtg gtcagtcgca gaagcagcac 1500
cgtcacgggg gcagcggcgg acacaacaaa cgccgtaagg aagccgcggc ggcgtcgtcg 1560
55 tcctcggacg aagacttgag tttccccggc gaggccgagc acggccgggc gcgaaagcgt 1620
ctaaaagtc acgtcaatag cgacggtgga agtggcgggc acgcgggttc caatcagcag 1680
cagcaacaac gttacgatga actgcgggat gccattcacg agctgaaacg cgatctgttt 1740
60 gccgcgcggc agagttctac gttacttttc gcggctctcc ccgctgcggc ctcttcctcc 1800
ccgactacta ctaccgtgtg tactcccacc ggcgagctga cgagcggcgg aggagaaaca 1860
65 ccgacggcac ttctatcagg aggtgccaag gtagctgagc gcgctcaggc cgggtgtggtg 1920
aacgccagtt gccgcctcgc taccgcgtcg ggttctgagg cggcaacggc agggccttcg 1980

ES 2 657 064 T3

acggcggggtt cttcttcctg cccggctagt gtcgtgtag cgcgctgc tgcccaagcc 2040
 gccgcagctt cccagagccc gcccaaagac atggtggatc tgaatcggcg gatttttgtg 2100
 5 gctgcgctca ataagctcga gtaa 2124

 <210> 72
 <211> 2130
 <212> ADN
 <213> Citomegalovirus humano

 <400> 72
 15 atgacgatgg acgagcaaca gccgcaggct gtggcgccgg tctacgtggg cggctttctc 60
 gcccgctacg accagtctcc ggacgaggcc gaattgctgt tgccgcggga cgtagtggag 120
 cactggttgt atgcgcagag ccagggacag ccttcgttgt cggtcgctc cccgctcaac 180
 20 atcaaccacg acgatacggc cgttgtagga cacgttgcgg cgatgcagag cgtccgcgac 240
 ggtctttttt gcctgggctg cgtcacttcg cccaggtttc tggagattgt acgccgcgct 300
 tcggaaaagt ccgagctggt ttcgcgcggg cccgtcagtc cgctgcagcc agacaagggtg 360
 25 gtggagtttc tcagcggcag ctacgccggc ctctcgtctt ccagccggcg ctgcgacgac 420
 gtggaggccg cgacgtcgtt ttcgggctcg gaaaccacgc cgttcaaaca cgtggctttg 480
 30 tgcagcgtgg gtcggcgtcg cggtagcttg gccgtgtacg ggcgcgatcc cgagtgggtc 540
 acccagcggg ttccagacct cacggcggcc gaccgcgacg ggctacgtgc acagtggcag 600
 cgctgcggca gcaactgctg cgacgcgtcg ggcgatccct ttcgctcaga cagctacggc 660
 35 ctggtgggca acagcgtgga cgcgctctac atccgtgagc gactgcccaa gctgcgctac 720
 gacaagcaac tagtcggcgt gacggagcgc gagtcgtacg tcaaggcgag cgtttcgcct 780
 40 gaggcggcgt gcgatattaa agcggcgtcc gccgagcgtt cgggcgacag cgcagtcag 840
 gccgccacgc cggcgactgg ggcgcgcggt ccctcttcgt ccccgctcgc tccagtcgaa 900
 ccgccatctc ctgtccagcc gcctgcgctt ccagcgtcgc cgtccgttct tcccgcggaa 960
 45 tcaccgccgt cgctttctcc ctcggagccg gcagaggcgg cgtccatgtc gcaccctctg 1020
 agtgctgcgg ttaccgccgc tacggctcct ccaggtgcta ccgtggcagg tgcgtcgcgg 1080
 50 gctgtgccgt ctctagcgtg gcctcacgac ggagtttatt tacccaagga cgcttttttc 1140
 tcgttacttg gggccagtcg ctcggcagcg cccgtaatgt atcccggcgc cgtagcggcc 1200
 cctccttctg cttcgccagc accgctgcct ttgccatctt atcccgcgtc ctacggcgcc 1260
 55 cccgtcgtgg gttacgacca gttggcggta cgtcactttg cggattacgt ggatcccat 1320
 tatcccgggt ggggtcggcg ttacgagccc gcgccgtctt tgcattccgtc ttatcccgtg 1380
 60 ccaccgccac catcaccggc ctattaccgt cggcgcgact ctccgggcgg tatggatgaa 1440
 ccaccgtccg gatgggagcg ttacgacggt ggtcaccgtg gtcagtcgca gaagcagcac 1500
 cgtcacgggg gcagcgggtg acacaacaaa cgccgtaagg aagccgcggc ggcgtcgtcg 1560
 65 tcgtcgtcct cggacgaaga cttgagtttc cccggcgagg ccgagcacgg ccgggcgcga 1620
 aagcgtctaa aaagtcacgt caatagcgac ggtggaagtg gcgggcacgc gggttccaat 1680

ES 2 657 064 T3

	cagcagcagc aacaacgtta cgatgaactg cgggatgcca ttcacgagct gaaacgcgat	1740
5	ctgtttgccg cgcggcagag ttctacgtta ctttcggcgg ctctccccgc tgcggcctct	1800
	tcctccccga ctactactac cgtgtgtact cccaccggcg agctgacgag cggcggagga	1860
	gaaacaccga cggcacttct atcaggaggt gccaaaggtag ctgagcgcgc tcaggccggc	1920
10	gtgggtgaacg ccagttgccg cctcgctacc gcgtcgggtt ctgaggcggc aacggcaggg	1980
	ccttcgacgg cgggttcttc ttctgtccg gctagtgtcg tgtagccgc cgctgctgcc	2040
	caagccgccg cagcttccca gagcccgcc aaagacatgg tggatctgaa tcggcggatt	2100
15	tttgtggctg cgctcaataa gctcgaataa	2130
	<210> 73	
20	<211> 2127	
	<212> ADN	
	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 73	
25	atgacgatgg acgagcagca gccgcaggct gtagcggcgg tctacgtggg cggctttctc	60
	gcccgcgatg accagtctcc ggacgaggcc gaattgctgt tgccgcggga cgtagtggag	120
30	cactggttgc acgcgcaggg ccagagacag ctttcgttgt cggtcgcgct cccgctcaac	180
	atcaaccacg acgacacggc cgttgtagga cacgttgccg cgatgcagag cgtccgcgac	240
	ggtctttttt gcctgggctg cgctcacttcg cccaggtttc tggagattgt acgccgcgct	300
35	tcggaaaagt ccgagctggt ttcgcgcggg cccgtcagtc cgctgcagcc agacaaggtg	360
	gtggagtttc tcagcggcag ctacgccggc ctctcgtctt ccagccggcg ctgcgacgac	420
40	gtggaggccg cgacgtcgtt ttcgggctcg gaaaccacgc cgttcaaaca cgtggctttg	480
	tgcagcgtgg gtcggcgtcg cggtagcttg gccgtgtacg ggcgcgatcc cgagtgggtc	540
	acgcagcggg ttccagacct cacggcggcc gaccgtgacg ggctacgtgc acagtggcag	600
45	cgctgcggca gcactgctgt cgacgcgtcg ggcgatccct ttcgctcaga cagctacggc	660
	ctgttgggca acagcgtgga cgcgctctac atccgtgagc gactgccaa gctgcgctac	720
50	gacaagcaac tagtcggcgt gacggagcgc gagtcgtacg tcaaggcgag cgtttcgcct	780
	gaggcggcgt gcgatattaa agcggcgtcc gccgagcgtt cgggcgacag ccgcagtcag	840
	gccgccacgc cggcggctgg ggcgcgggtt ccctcttcgt ccccgctgcc tccagtcgaa	900
55	ccgccatctc ctgtccagcc gcctgcgctt ccagcgtcgc cgtccgttct tcccgcggaa	960
	tcaccgccgt cgctttctcc ctcggagccg gcagaggcgg cgtccatgtc gcaccctctg	1020
60	agtgctgcgg ttcccgccgc tacggctcct ccagggtgcta ccgtggcagg tgcgtcggc	1080
	gctgtgccgt ctctagcgtg gcctcacgac ggagtttatt tacccaaaga cgcttttttc	1140
	tcgctacttg gggccagtcg ctcggcagcg cccgtcatgt atcccgggtc cgtagcggct	1200
65	cctccttctg cttcgccagc accgttgcct ttgccgtctt atcccgcgcc ctacggcgcc	1260
	cccgtcgtgg gttacgacca gttggcggca cgtcactttg cggaatacgt ggatccccat	1320

ES 2 657 064 T3

	tatcccgggt ggggtcggcg ttacgagccc gcgccgcctt tgcattcggc ttgtcccgtg	1380
	ccgccgccac catcaccagc ctattaccgt cggcgcgatt ctccgggcgg tatggatgaa	1440
5	ccaccgtccg gatgggagcg ttacgacggt ggtcaccgtg gtcagtgcga gaagcagcac	1500
	cgtcacgggg gcagcgggtg acacaacaaa cgccgtaagg aagctgcggc ggcgtcgtcg	1560
10	tcgtcctcgg acgaagactt gagtttcccc ggcgaggccg agcacggccg ggcgcgaaag	1620
	cgtctaaaaa gtcacgtcaa tagcgacggt ggaagtggcg ggcacgcggg ttccaatcag	1680
	cagcagcaac aacgttacga tgaactgcgg gatgccattc acgagctgaa acgcgatctg	1740
15	tttgccgcgc ggcagagttc tacgttactt tcggcggctc tccccgctgc ggcctcttcc	1800
	tccccaaacta ctactaccgt gtgtactccc accggcgagc tgacgagtgg cggaggagaa	1860
20	acaccacggy cacttctatc cggagggtgcc aaggtagctg agcgcgctca ggctggcgtg	1920
	gtgaacgcca gttgccgcct cgctaccacg tcgggttctg agacggcaac ggccgggccc	1980
	tcgacggaag gttcttcttc ctgcccggct agtgtcgtgt tagccgccgc tgctgccaa	2040
25	gccgccgag cttcccagag cccgccaaa gacatggtag atctgaatcg gcggttttt	2100
	gtggctgcgc tcaataagct cgagtaa	2127
30	<210> 74	
	<211> 2127	
	<212> ADN	
	<213> Citomegalovirus humano	
35	<400> 74	
	atgacgatgg acgaacagca gccgcaggct gtagcgcgg tctacgtggg cggctttctc	60
	gcccgttacg accagtctcc ggacgaggcc gaattgctgt tgccgcggga cgtagtggag	120
40	cactggttgc acgcgcaggg ccagggacag ccttcgttgt cggtcgcgct cccgctcaac	180
	atcaatcacg acgacacggc cgttgtagga cacgttgcg cgatgcagag cgttcgcgac	240
45	ggtctttttt gcctaggctg cgtcacttcg cccaggtttc tggagattgt gcgccgcgct	300
	tcggaaaagt ccgagcttgt ttcgcgtggg cccgtcagtc cgctgcagcc ggacaagggtg	360
	gtggagtttc tcagcggcag ctacgccggc ctctcgtctt ccagccggcg ctgcgacgac	420
50	gtggaggccg cgacgtcgtt ttcgggctcg gaaaccacgc cgttcaaaca cgtggctttg	480
	tgcagcgtgg gtcggcgtcg cggtagcttg gccgtgtacg ggcgcgatcc cgagtgggtt	540
55	accagcggg ttccagacct cacggcggcc gaccgcgacg ggctacgtgc acagtggcag	600
	cgctgcggca gcaactgctg cgacgcgtcg ggcgatccct ttcgctcaga cagctacggc	660
	ctgttgggca acagcgtgga cgcgctctac atccgtgagc gactgcccaa gctgcgctac	720
60	gacaagcaac tagtcggcgt gacggagcgc gagtcgtacg tcaaggcgag cgtttcgcct	780
	gaggcggcgt gcgatattaa agcggcgtcc gccgagcgtt cgggcgacag ccgcagtcag	840
65	gccgccacgc cggcggctgg ggcgcgcggt ccctcttcat ccccgtcgcc tccagtcgaa	900
	ccgccatctc ctgtccagcc gcctgcgctt ccagcgtcgc cgtccgttct cccacggaa	960
	tcaccgccgt cgctttctcc tttggagccg gcagaggcgg cgtccatgtc gcaccctctg	1020

ES 2 657 064 T3

	agtgctgctg	ttaccgccc	tacggctcct	ccaggtgcta	ccgtggcagg	tgcgtcgccc	1080
5	gctgtgccgt	ctttagcgtg	gcctcacgac	ggagtttatt	tacccaaaga	cgcttttttc	1140
	tcgctacttg	gggcccagtcg	ctcggcagcg	cccgtcatgt	atcccggcgc	cgtagcggcc	1200
	cctccttctg	cttcgccagc	accgctgcct	ttgccgtctt	atcccgcgtc	ctacggcgcc	1260
10	cccgtcgtgg	gttacgacca	gttggcggca	cgctactttg	cggactacgt	ggatcccat	1320
	tatcccgggt	ggggtcggcg	ttacgagccc	gcgccgcctt	tgcatccgtc	ttatcccgtg	1380
	ccgccgccac	catcaccggc	ctattaccgt	cggcgcgact	ctccggggcg	tatggatgaa	1440
15	ccaccgtccg	gatgggagcg	ttacgacggt	ggtcaccgtg	gtcagtcgca	gaagcagcac	1500
	cgtcacgggg	gcagcggcgg	acacaacaaa	cgccgtaagg	aagccgcggc	ggcgtcgtcg	1560
20	tcgtcctcgg	acgaagactt	gagtttcccc	ggcgaggccg	agcacggccg	ggcgcgaaag	1620
	cgtctaaaaa	gtcacgtcaa	cagcgacggt	ggaagtggcg	ggcacgcggg	ttccaatcag	1680
	cagcagcaac	aacgttacga	tgaactgcgg	gatgccattc	acgagctgaa	acgcgatctg	1740
25	tttgccgcgc	ggcagagttc	tacgttactt	tcggcggctc	tccctgctgc	ggcctcttcc	1800
	tccccgacta	ctactaccgt	gtgtactccc	accggcgagc	tgacgagcgg	cggaggagaa	1860
30	acaccgacgg	cacttctatc	aggaggtgcc	aaggtagctg	agcgcgctca	ggccggcgtg	1920
	gtgaaccca	gttgccgcct	cgctaccgcg	tcgggttctg	aggcggcaac	ggcagggcct	1980
	tcgacggcgg	gttcttcttc	ctgcccggct	agtgtcgtgt	tagccgccgc	tgctgcccaa	2040
35	gccgccgag	cttcccagag	cccgcccaaa	gacatggtgg	atctgaatcg	gcggatTTTT	2100
	gtggctgctg	tcaataagct	cgagtaa				2127
40	<210>	75					
	<211>	2127					
	<212>	ADN					
	<213>	Citomegalovirus humano					
45	<400>	75					
	atgacgatgg	acgagcagca	gccgcaggct	gtagcgcggg	tctacgtggg	cggctttctc	60
	gcccgcctacg	accagtctcc	ggacgaggcc	gaattgctgt	tgccgcggga	cgtagtggag	120
50	cactggttgc	acgcgcaggg	ccagggacag	ccttcgttgt	cggtcgcgct	cccgtcaac	180
	atcaaccacg	acgacacggc	cgttgtagga	cacgttgccg	cgatgcagag	cgccgcgac	240
55	ggtctttttt	gcctgggctg	cgctacttcg	cccaggtttc	tggagattgt	acgccgcgct	300
	tcggaaaagt	ccgagctggt	ttcgcgcggg	cccgtcagtc	cgctgcagcc	agacaagggtg	360
	gtggagtttc	tcagcggcag	ctacgccggc	ctctcgtctt	ccagccggcg	ctgcgacgac	420
60	gtggaggccg	cgacgtcgtt	ttcgggctcg	gaaaccacgc	cgttcaaaca	cgtggctttg	480
	tgacgcgtgg	gtcggcgtcg	cggtacgttg	gccgtgtacg	ggcgcgatcc	cgagtgggtc	540
65	acacaacggt	ttccagacct	cacggcggcc	gaccgtgacg	ggctacgtgc	acagtggcag	600
	cgctgcggca	gcaactgctgt	cgacgcgtcg	ggcgtatccct	ttcgctcaga	cagctacggc	660

ES 2 657 064 T3

	ctgttgggca acagcgtgga cgcgctctac atccgtgagc gactgcccac gctgcgctac	720
	gacaagcaac tagtcggcgt gacggagcgc gagtcgtacg tcaaggcgag cgtttcgcct	780
5	gaggcggcgt gcgatattaa agcggcgtcc gccgagcgtt cgggacgacag cgcagtcag	840
	gccgccacgc cggcggctgg ggcgcgcggt ccctcttcgt ccccgtcgcc tccagtcgaa	900
10	ccgccatctc ctgtccagcc gcctgcgctt ccagcgtcgc cgtccgttct tcccgcgaa	960
	tcaccgccgt cgctttctcc ctcggagccg gcagaggcgg cgtccatgtc gcaccctctg	1020
	agtgtgctgg ttcccgcgc tacggctcct ccaggtgcta ccgtggcagg tgcgtcgccg	1080
15	gctgtgccgt ctctagcgtg gcctcacgac ggagtttatt taccxaaaga cgctttttc	1140
	tcgctacttg gggccagtcg ctcggcagcg cccgtcatgt atcccggcgc cgtagcggct	1200
20	cctccttctg cttcgccagc accgttgcct ttgccgtctt atcccgcgcc ctacggcgcc	1260
	cccgtcgtgg gttacgacca gttggcgaca cgtcactttg cggaatacgt ggatcccat	1320
	tatcccgggt ggggtcggcg ttacgagccc gcgccgcctt tgcattcggc ttgtcccgtg	1380
25	ccgccgccac catcaccagc ctattaccgt cggcgcgatt ctccgggagg tatggatgaa	1440
	ccaccgtccg gatgggagcg ttacgacggt ggtcaccgtg gtcagtcgca gaagcagcac	1500
30	cgtcacgggg gcagcggcgg acacaacaaa cggcgtaagg aagctgcggc ggcgtcgtcg	1560
	tcgtcctcgg acgaagactt gagtttcccc ggcgaggccg agcacggccg ggcgcgaaag	1620
	cgtctaaaaa gtcacgtcaa tagcgacggt ggaagtggcg ggcacgcggg ttccaatcag	1680
35	cagcagcaac aacgttacga tgaactgcgg gatgccattc acgagctgaa acgcgatctg	1740
	tttgccgcgc ggcagagttc tacgttactt tcggcggctc tcccgcgtgc ggcctcttcc	1800
40	tcccxaacta ctactaccgt gtgtactccc accggcgagc tgacgagtgg cggaggagaa	1860
	acaccacg cacttctatc cggaggcgtc aaggtagctg agcgcgctca ggccggcgtg	1920
	gtgaacgcca gttgccgctt cgctaccgcg tcgggttctg aggcggcaac ggccgggccc	1980
45	tcgacggcag gttcttcttc ctgcccggct agtgtcgtgt tagccgccgc tgctgccaa	2040
	gccgccgag cttcccagag cccgcccxxx gacatggtag atctgaatcg gcggattttt	2100
50	gtggctgctc tcaataagct cgagtaa	2127
	<210> 76	
	<211> 2127	
	<212> ADN	
55	<213> Citomegalovirus humano	
	<400> 76	
	atgacgatgg acgagcagca gtcgcaggct gtggcggcgg tctacgtggg cggctttctc	60
60	gcccgcctacg accagtctcc ggacgaggcc gaattgctgt tgccgcggga cgtagtggag	120
	cactggttgc acgcgcaggg ccagggacag ccttcgttgt cggcgcgct cccgctcaat	180
	atcaaccacg acgacacggc cgttgtagga cacgttgagg cgatgcagag cgtccgcgac	240
65	ggcttttttt gcctgggctg cgtcacttcg cccaggtttc tggagattgt acgccgcgct	300
	tcggaaaagt ccgagctggt ttcgcgcggg cccgtcagtc cgctgcagcc ggacaaggctg	360

ES 2 657 064 T3

	gtggagtttc tcagcggcag ttacgccggc ctctcgctct ccagccggcg ctgcgacgac	420
5	gtggaggccg cgacgtcgct ttcgggctcg gaaaccacgc cgttcaaaca cgtggctttg	480
	tgcagcgtgg gtcggcgtcg cggtagcttg gccgtgtacg ggcgcgatcc cgagtgggtc	540
	actcagcggg ttccagacct cacggcggcc gaccgcgacg ggctacgtgc acagtggcag	600
10	cgctgcbggca gcaactgctgt cgacgcgtcg ggcgatccct ttcgctcaga cagctacggc	660
	ctggtgggca acagcgtgga cgcgctctac atccgtgagc gactgcccaa gctgcgctac	720
	gacaagcaac tagtcggcgt gacggagcgc gagtcgtacg tcaaggcgag cgtttcgcct	780
15	gaggcggcgt gcgatattaa agcggcggcc gccgagcgtt cgggcgacag ccgcagtcgg	840
	gccgccacgc cggcggctgg ggcgcgcggt ccctcttcat ccccgtcacc tccagtcgaa	900
20	ccgccatctc ctgttcagtc gcctgcgctt ccagtgtcgc cgtccgttct ccccgcgga	960
	tcaccgccgt cgctttctcc ctcggagtcg gcagaggcgg cgtccatgtc gcaccctctg	1020
	agtgtgcggt ttaccgccgc tacggctcct ccagggtgcta ccgtggcagg tgcgtcgccg	1080
25	gctgtgccgt ctctagcgtg gcctcacgac ggagtttatt taccxaaaga cgcttttttc	1140
	tcgctacttg gggccagtcg ctcggcagcg cccgtcatgt atcccggcgc cgtagcggcc	1200
30	cctccttctg cttcgccagc accgctgcct ttgccgtctt atcccgcgtc ctacggcgcc	1260
	cccgctcgtg gttacgacca gttggcggca cgtcactttg cggactacgt ggatcccat	1320
	tatcccgggt ggggtcggcg ttacgagccc acgccgcctt tgcattcgtc ttatcccgtg	1380
35	ccgccgccac catcaccggc ctattaccgt cggcgcgact ctccgggcgg tatggatgaa	1440
	ccaccgtccg gatgggagcg ttacgacggg ggtcaccgtg gtcagtcgca gaagcagcac	1500
40	cgtcacgggg gcagcggcgg acacaacaaa cgccgtaagg aagccgcggc ggcgtcgtcg	1560
	tcgtcctcgg acgaagactt gagtttcccc ggcgaggccg agcacggccg ggcgcgaaag	1620
	cgtctaaaaa gtcacgtcaa tagcgacggg ggaagtggcg ggcacgcggg ttccaatcag	1680
45	cagcagcaac aacgttacga tgaactgcgg gatgccattc acgagctgaa acgcgatctg	1740
	tttgccgcgc ggcagagttc tacgttactt tcggcggctc tccccgctgc ggcctcttcc	1800
50	tccccaaacta ctactaccgt gtgtactccc accggcgagc tgacgagcgg cggaggagaa	1860
	acaccgacgg cacttctatc cggagggtgcc aaggtagctg agcgcgctca ggccggcgtg	1920
	gtgaacgcca gttgccgcct cgctaccgcg tcgggttctg aggcggcaac ggccgggccc	1980
55	tcgatggcag gttcttcttc ctgcccggct agtgtcgtgt tagccgccgc tgctgctcaa	2040
	gccgccgcag cttcccagag cccgccc aaa gacatggtag atctgaatcg gcggatTTTT	2100
60	gtggctgcgc tcaataagct cgagtaa	2127

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de amplificación de las secuencias de ácido nucleico UL34 y UL80.5 de citomegalovirus (CMV) en una muestra, cuyo procedimiento comprende:
- 5 (a) formar una mezcla que comprende la muestra, los reactivos de amplificación de ácido nucleico, un par de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34, y un par de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5; y
- (b) someter la mezcla a condiciones que promuevan la amplificación de la secuencia de ácido nucleico UL34 y la secuencia de ácido nucleico UL80.5,
- 10 con lo cual las secuencias de ácido nucleico UL34 y UL80.5 de CMV en una muestra se amplifican, en el que:
- (i) los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 comprenden:
5' TGA ACT TCA TCA TCA CCA CCC GAG ACT 3' [SEQ ID NO: 49] como cebador directo y
5' CCT TGT ACG CTT TGG AAA TCG AGC CTG 3' [SEQ ID NO: 50] como cebador inverso; o
- (ii) los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 consisten en:
- 15 5' TGA ACT TCA TCA TCA CCA CCC GAG ACT 3' [SEQ ID NO: 49] como cebador directo y
5' CCT TGT ACG CTT TGG AAA TCG AGC CTG 3' [SEQ ID NO: 50] como cebador inverso, y en el que:
- (i) los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 comprenden:
5' CGG CTA GTG TCG TGT TAG C 3' [SEQ ID NO: 16] como cebador directo y
5' CAC AAA AAT CCG CCG ATT CAG ATC 3' [SEQ ID NO: 47] como cebador inverso; o
- 20 (ii) los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 consisten en:
5' CGG CTA GTG TCG TGT TAG C 3' [SEQ ID NO: 16] como cebador directo y
5' CAC AAA AAT CCG CCG ATT CAG ATC 3' [SEQ ID NO: 47] como cebador inverso.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la mezcla en (a) comprende además un ácido nucleico de control interno (IC) y un par de cebadores para amplificar el ácido nucleico de IC y en el que las condiciones en (b) también promueven la amplificación del ácido nucleico de IC, con lo cual se amplifica la secuencia de ácido nucleico de IC,
- 25 opcionalmente en el que dicho procedimiento comprende, además, simultánea o posteriormente, detectar la presencia, cantidad o concentración de IC en la mezcla, con lo cual se detecta la IC en la mezcla.
3. Procedimiento, según la reivindicación 1 o 2, que comprende, además, simultánea o posteriormente, detectar la presencia, cantidad o concentración de CMV en la muestra, con lo cual se detecta el CMV en la muestra.
- 30 4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la mezcla en (a) comprende, además, una sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 y una sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5, en el que la sonda está marcada opcionalmente con FAM y se inactiva con BHQ-1.
5. Procedimiento, según la reivindicación 4, en el que:
- 40 (i) la secuencia de nucleótidos de la sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 comprende:
5' CG ACG ATT CAG TCC TGC GAG CC 3' [SEQ ID NO: 51]; o
- (ii) la secuencia de nucleótidos de la sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 consiste en:
- 45 5' CG ACG ATT CAG TCC TGC GAG CC 3' [SEQ ID NO: 51],
y/o en el que:
- (i) la secuencia de nucleótidos de la sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 comprende:
5' AAGCCGCCGAGCTTCCCAG 3' [SEQ ID NO: 52]; o
- 50 (ii) la secuencia de nucleótidos de la sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 consiste en:
5' AAGCCGCCGAGCTTCCCAG 3' [SEQ ID NO: 52].
6. Conjunto de cebadores que comprenden un par de cebadores directo e inverso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 de CMV y un par de cebadores directo e inverso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 de CMV, en el que:
- 55 (i) los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 comprenden:
5' TGA ACT TCA TCA TCA CCA CCC GAG ACT 3' [SEQ ID NO: 49] como cebador directo y
5' CCT TGT ACG CTT TGG AAA TCG AGC CTG 3' [SEQ ID NO: 50] como cebador inverso,
- 60 y los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 comprenden:
5' CGG CTA GTG TCG TGT TAG C 3' [SEQ ID NO: 16] como cebador directo y
5' CAC AAA AAT CCG CCG ATT CAG ATC 3' [SEQ ID NO: 47] como cebador inverso; o
- (ii) los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 consisten en:
5' TGA ACT TCA TCA TCA CCA CCC GAG ACT 3' [SEQ ID NO: 49] como cebador directo y
- 65 5' CCT TGT ACG CTT TGG AAA TCG AGC CTG 3' [SEQ ID NO: 50] como cebador inverso,
y los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 consisten en:

5' CGG CTA GTG TCG TGT TAG C 3' [SEQ ID NO: 16] como cebador directo y
5' CAC AAA AAT CCG CCG ATT CAG ATC 3' [SEQ ID NO: 47] como cebador inverso.

5 7. Conjunto de sondas que comprenden una sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 de CMV y una sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 de CMV, en el que la sonda está opcionalmente marcada con FAM y se inactiva con BHQ-1, en el que:

(i) la secuencia de nucleótidos de la sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 comprende:

5' CG ACG ATT CAG TCC TGC GAG CC 3' [SEQ ID NO: 51]

10 y la secuencia de nucleótidos de la sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 comprende:

5'AAGCCGCCGCAGCTTCCCAG 3' [SEQ ID NO: 52]; o

(ii) la secuencia de nucleótidos de la sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 consiste en: 5' CG ACG ATT CAG TCC TGC GAG CC 3' [SEQ ID NO: 51]

15 y la secuencia de nucleótidos de la sonda para detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 consiste en: 5'AAGCCGCCGCAGCTTCCCAG 3' [SEQ ID NO: 52].

20 8. Kit para la amplificación de secuencias de ácido nucleico de CMV en una muestra, en el que el kit comprende (i) un conjunto de cebadores que comprenden un par de cebadores directo e inverso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 de CMV y un par de cebadores directo e inverso para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 de CMV y (ii) instrucciones para utilizar el conjunto de cebadores en la amplificación de secuencias de ácido nucleico de CMV y/o uno o más reactivos para utilizar los conjuntos de cebadores en la amplificación de secuencias de ácido nucleico de CMV, en el que:

(i) los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 comprenden:

25 5' TGA ACT TCA TCA TCA CCA CCC GAG ACT 3' [SEQ ID NO: 49] como cebador directo y

5' CCT TGT ACG CTT TGG AAA TCG AGC CTG 3' [SEQ ID NO: 50] como cebador inverso,

y los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 comprenden:

5' CGG CTA GTG TCG TGT TAG C 3' [SEQ ID NO: 16] como cebador directo y

5' CAC AAA AAT CCG CCG ATT CAG ATC 3' [SEQ ID NO: 47] como cebador inverso; o

30 (ii) los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 consisten en:

5' TGA ACT TCA TCA TCA CCA CCC GAG ACT 3' [SEQ ID NO: 49] como cebador directo y

5' CCT TGT ACG CTT TGG AAA TCG AGC CTG 3' [SEQ ID NO: 50] como cebador inverso,

y los cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 consisten en:

5' CGG CTA GTG TCG TGT TAG C 3' [SEQ ID NO: 16] como cebador directo y

35 5' CAC AAA AAT CCG CCG ATT CAG ATC 3' [SEQ ID NO: 47] como cebador inverso.

40 9. Kit, según la reivindicación 8, en el que el kit comprende, además, (i) una sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 de CMV de las SEQ ID NOS: 61-68 y una sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 de CMV de las SEQ ID NOS: 69-76, en el que la sonda está opcionalmente marcada con FAM y se inactiva con BHQ-1, y (ii) instrucciones para utilizar las sondas en la detección de la amplificación de secuencias de ácido nucleico de CMV y/o uno o más reactivos para utilizar las sondas en la detección de la amplificación de secuencias de ácido nucleico de CMV.

10. Kit, según la reivindicación 9, en el que:

45 (i) la secuencia de nucleótidos de la sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 comprende:

5' CG ACG ATT CAG TCC TGC GAG CC 3' [SEQ ID NO: 51]

y la secuencia de nucleótidos de la sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 comprende:

50 5'AAGCCGCCGCAGCTTCCCAG 3' [SEQ ID NO: 52]; o

(ii) la secuencia de nucleótidos de la sonda para la detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL34 consiste en: 5' CG ACG ATT CAG TCC TGC GAG CC 3' [SEQ ID NO: 51]

y la secuencia de nucleótidos de la sonda para detección de la amplificación de una secuencia de ácido nucleico UL80.5 consiste en: 5'AAGCCGCCGCAGCTTCCCAG 3' [SEQ ID NO: 52].

55

CMV UL34_Merlin
 CMV UL34_AD169
 CMV UL34_Towne
 CMV UL34_Toledo
 CMV UL34_FIX
 CMV UL34_TB40/E
 CMV UL34_TR

(501) GCGGTGGGGCT**A**GAGTTGGATCAAACTGGTAGCC**T**TGTTGCCACACGAGCGGCCACCGGAACTGTGCCACCGTCTCTCATCGGCTTGTGGCCAGACGCGCGG
 (501) GCGGTGGGGCT**G**AA**A**STGTCATCAACTGGTAGCC**C**TGTTCCACACGAGCGGCCACCGGAACTGTGCCACCGTCTCTCATCGGCTTGTGGCCAGACGCGCGG
 (501) GCGGTGGGGCT**T**GGAGTTGGATCAAACTGGTAGCC**C**TGTTCCACACGAGCGGCCACCGGAACTGTGCCACCGTCTCTCATCGGCTTGTGGCCAGACGCGCGG
 (501) GCGGTGGGGCT**G**AA**A**STGTCATCAAACTGGTAGCC**T**TGTTGCCACACGAGCGGCCACCGGAACTGTGCCACCGTCTCTCATCGGCTTGTGGCCAGACGCGCGG
 (501) GCGGTGGGGCT**A**GAGTTGGATCAAACTGGTAGCC**T**TGTTCCACACGAGCGGCCACCGGAACTGTGCCACCGTCTCTCATCGGCTTGTGGCCAGACGCGCGG
 (501) GCGGTGGGGCT**G**AA**A**STGTCATCAAACTGGTAGCC**T**TGTTCCACACGAGCGGCCACCGGAACTGTGCCACCGTCTCTCATCGGCTTGTGGCCAGACGCGCGG
 (501) GCGGTGGGGCT**G**AA**A**STGTCATCAAACTGGTAGCC**T**TGTTCCACACGAGCGGCCACCGGAACTGTGCCACCGTCTCTCATCGGCTTGTGGCCAGACGCGCGG

CMV UL34_Merlin
 CMV UL34_AD169
 CMV UL34_Towne
 CMV UL34_Toledo
 CMV UL34_FIX
 CMV UL34_TB40/E
 CMV UL34_TR

(601) CACATGTGGGGCGGCTCCATCCGTTCTCATCGGACACCTGGCCACTTACCCTCGAGACAGCTTCCCTACACCTGTTGATGAACCTACGTTTGGATATCGC**AC**
 (601) CACATGTGGGGCGGCTCCATCCGTTCTCATCGGACACCTGGCCACTTACCCTCGAGACAGCTTCCCTACACCTGTTGATGAACCTACGTTTGGATATCGC**AC**
 (601) CACATGTGGGGCGGCTCCATCCGTTCTCATCGGACACCTGGCCACTTACCCTCGAGACAGCTTCCCTACACCTGTTGATGAACCTACGTTTGGATATCGC**GC**
 (601) CACATGTGGGGCGGCTCCATCCGTTCTCATCGGACACCTGGCCACTTACCCTCGAGACAGCTTCCCTACACCTGTTGATGAACCTACGTTTGGATATCGC**AC**
 (601) CACATGTGGGGCGGCTCCATCCGTTCTCATCGGACACCTGGCCACTTACCCTCGAGACAGCTTCCCTACACCTGTTGATGAACCTACGTTTGGATATCGC**AC**
 (601) CACATGTGGGGCGGCTCCATCCGTTCTCATCGGACACCTGGCCACTTACCCTCGAGACAGCTTCCCTACACCTGTTGATGAACCTACGTTTGGATATCGC**AC**
 (601) CACATGTGGGGCGGCTCCATCCGTTCTCATCGGACACCTGGCCACTTACCCTCGAGACAGCTTCCCTACACCTGTTGATGAACCTACGTTTGGATATCGC**AC**
 (601) CACATGTGGGGCGGCTCCATCCGTTCTCATCGGACACCTGGCCACTTACCCTCGAGACAGCTTCCCTACACCTGTTGATGAACCTACGTTTGGATATCGC**GC**

CMV UL34_Merlin
 CMV UL34_AD169
 CMV UL34_Towne
 CMV UL34_Toledo
 CMV UL34_FIX
 CMV UL34_TB40/E
 CMV UL34_TR

(701) AAGTCTTCGACGGCTGTTACCCACGCGAGGCGCTTACCGCATGCTCTCCAGATCGGTCATACGGACTCGGTCGCGCGGCGCTGGAA**CTCT**CACAC**AG**CGCG
 (701) AAGTCTTCGACGGCTGTTACCCACGCGAGGCGCTTACCGCATGCTCTCCAGATCGGTCATACGGACTCGGTCGCGCGGCGCTGGAA**CTCT**CACAC**AG**CGCG

CMV UL34_Merlin
 CMV UL34_AD169
 CMV UL34_Towne
 CMV UL34_Toledo
 CMV UL34_FIX
 CMV UL34_TB40/E
 CMV UL34_TR

(801) GCGGGCGGGCGCCCGGAGCGCGATGAGAAACAACGACGAGGAGGAGCGAGGCTCCGTCAAGCGACCCCGCGCGCTTCCAGCA**T**TCCAA**G**
 (801) GCGGGCGGGCGCCCGGAGCGCGATGAGAAACAACGACGAGGAGGAGGAGCGAGGCTCCGTCAAGCGACCCCGCGCGCTTCCAGCA**T**TCCAA**G**
 (801) GCGGGCGGGCGCCCGGAGCGCGATGAGAAACAACGACGAGGAGGAGGAGCGAGGCTCCGTCAAGCGACCCCGCGCGCTTCCAGCA**T**TCCAA**G**
 (801) GCGGGCGGGCGCCCGGAGCGCGATGAGAAACAACGACGAGGAGGAGGAGCGAGGCTCCGTCAAGCGACCCCGCGCGCTTCCAGCA**T**TCCAA**G**
 (801) GCGGGCGGGCGCCCGGAGCGCGATGAGAAACAACGACGAGGAGGAGGAGCGAGGCTCCGTCAAGCGACCCCGCGCGCTTCCAGCA**T**TCCAA**G**
 (801) GCGGGCGGGCGCCCGGAGCGCGATGAGAAACAACGACGAGGAGGAGGAGCGAGGCTCCGTCAAGCGACCCCGCGCGCTTCCAGCA**T**TCCAA**G**
 (801) GCGGGCGGGCGCCCGGAGCGCGATGAGAAACAACGACGAGGAGGAGGAGCGAGGCTCCGTCAAGCGACCCCGCGCGCTTCCAGCA**T**TCCAA**G**
 (801) GCGGGCGGGCGCCCGGAGCGCGATGAGAAACAACGACGAGGAGGAGGAGCGAGGCTCCGTCAAGCGACCCCGCGCGCTTCCAGCA**T**TCCAA**G**

CMV UL34_Merlin
 CMV UL34_AD169
 CMV UL34_Towne
 CMV UL34_Toledo
 CMV UL34_FIX
 CMV UL34_TB40/E
 CMV UL34_TR

(901) AAGCCCGGCAAGCGCCCGCTCGTCCCGGCACACGGCTGCGCGCTCACGAGCAAAAAGCCCGAAGAAAACGAGGAGGAGGAGGCTGTTCCCTCCCTGCA
 (901) AAGCCCGGCAAGCGCCCGCTCGTCCCGGCACACGGCTGCGCGCTCACGAGCAAAAAGCCCGAAGAAAACGAGGAGGAGGAGGAGGCTGTTCCCTCCCTGCA
 (901) AAGCCCGGCAAGCGCCCGCTCGTCCCGGCACACGGCTGCGCGCTCACGAGCAAAAAGCCCGAAGAAAACGAGGAGGAGGAGGCTGTTCCCTCCCTGCA
 (901) AAGCCCGGCAAGCGCCCGCTCGTCCCGGCACACGGCTGCGCGCTCACGAGCAAAAAGCCCGAAGAAAACGAGGAGGAGGAGGCTGTTCCCTCCCTGCA
 (901) AAGCCCGGCAAGCGCCCGCTCGTCCCGGCACACGGCTGCGCGCTCACGAGCAAAAAGCCCGAAGAAAACGAGGAGGAGGAGGCTGTTCCCTCCCTGCA
 (901) AAGCCCGGCAAGCGCCCGCTCGTCCCGGCACACGGCTGCGCGCTCACGAGCAAAAAGCCCGAAGAAAACGAGGAGGAGGAGGCTGTTCCCTCCCTGCA
 (901) AAGCCCGGCAAGCGCCCGCTCGTCCCGGCACACGGCTGCGCGCTCACGAGCAAAAAGCCCGAAGAAAACGAGGAGGAGGAGGCTGTTCCCTCCCTGCA

FIGURA 1B

CMV UL34_Merlin (1001) AGGCAACCGCAGCATTCTTGGGGCAGAAACCCCTCCGTCCTCAAAAGACGAGGCAACGGTGGGGAACGGCTGCGGACACGGCTAGCGACCCGGCCCTGCGGGCATCG
 CMV UL34_AD169 (1001) AGGCAACCGCAGCATTCTTGGGGCAGAAACCCCTCCGTCCTCAAAAGACGAGGCAACGGTGGGGAACGGCTGCGGACACGGCTAGCGACCCGGCCCTGCGGGCATCG
 CMV UL34_Towne (1001) AGGCAACCGCAGCATTCTTGGGGCAGAAACCCCTCCGTCCTCAAAAGACGAGGCAACGGTGGGGAACGGCTGCGGACACGGCTAGCGACCCGGCCCTGCGGGCATCG
 CMV UL34_Toledo (1001) AGGCAACCGCAGCATTCTTGGGGCAGAAACCCCTCCGTCCTCAAAAGACGAGGCAACGGTGGGGAACGGCTGCGGACACGGCTAGCGACCCGGCCCTGCGGGCATCG
 CMV UL34_FIX (1001) AGGCAACCGCAGCATTCTTGGGGCAGAAACCCCTCCGTCCTCAAAAGACGAGGCAACGGTGGGGAACGGCTGCGGACACGGCTAGCGACCCGGCCCTGCGGGCATCG
 CMV UL34_PH (1001) AGGCAACCGCAGCATTCTTGGGGCAGAAACCCCTCCGTCCTCAAAAGACGAGGCAACGGTGGGGAACGGCTGCGGACACGGCTAGCGACCCGGCCCTGCGGGCATCG
 CMV UL34_TB40/E (1001) AGGCAACCGCAGCATTCTTGGGGCAGAAACCCCTCCGTCCTCAAAAGACGAGGCAACGGTGGGGAACGGCTGCGGACACGGCTAGCGACCCGGCCCTGCGGGCATCG
 CMV UL34_TR (1001) AGGCAACCGCAGCATTCTTGGGGCAGAAACCCCTCCGTCCTCAAAAGACGAGGCAACGGTGGGGAACGGCTGCGGACACGGCTAGCGACCCGGCCCTGCGGGCATCG

 CMV UL34_Merlin (1101) CGCCGACGGAAGAAGACGGACCTCTAGCCAGCCAGACCCCTGTGTGGGAGTGGGGGGGAGTGGGGGAGCCCTCACCTTCAGTCACCTTCAGTCACCCAGGCCCTTACCCCCCGTCAACGTCC
 CMV UL34_AD169 (1101) CGCCGACGGAAGAAGACGGACCTCTAGCCAGCCAGACCCCTGTGTGGGAGTGGGGGGGAGCCCTCACCTTCAGTCACCTTCAGTCACCCAGGCCCTTACCCCCCGTCAACGTCC
 CMV UL34_Towne (1101) CGCCGACGGAAGAAGACGGACCTCTAGCCAGCCAGACCCCTGTGTGGGAGTGGGGGGGAGCCCTCACCTTCAGTCACCTTCAGTCACCCAGGCCCTTACCCCCCGTCAACGTCC
 CMV UL34_Toledo (1101) CGCCGACGGAAGAAGACGGACCTCTAGCCAGCCAGACCCCTGTGTGGGAGTGGGGGGGAGCCCTCACCTTCAGTCACCTTCAGTCACCCAGGCCCTTACCCCCCGTCAACGTCC
 CMV UL34_FIX (1101) CGCCGACGGAAGAAGACGGACCTCTAGCCAGCCAGACCCCTGTGTGGGAGTGGGGGGGAGCCCTCACCTTCAGTCACCTTCAGTCACCCAGGCCCTTACCCCCCGTCAACGTCC
 CMV UL34_PH (1101) CGCCGACGGAAGAAGACGGACCTCTAGCCAGCCAGACCCCTGTGTGGGAGTGGGGGGGAGCCCTCACCTTCAGTCACCTTCAGTCACCCAGGCCCTTACCCCCCGTCAACGTCC
 CMV UL34_TB40/E (1101) CGCCGACGGAAGAAGACGGACCTCTAGCCAGCCAGACCCCTGTGTGGGAGTGGGGGGGAGCCCTCACCTTCAGTCACCTTCAGTCACCCAGGCCCTTACCCCCCGTCAACGTCC
 CMV UL34_TR (1101) CGCCGACGGAAGAAGACGGACCTCTAGCCAGCCAGACCCCTGTGTGGGAGTGGGGGGGAGCCCTCACCTTCAGTCACCTTCAGTCACCCAGGCCCTTACCCCCCGTCAACGTCC

 CMV UL34_Merlin (1201) CCCATAACCCCGTTGTGTAATTTAA [SEQ ID NO: 61]
 CMV UL34_AD169 (1201) CCCATAACCCCGTTGTGTAATTTAA [SEQ ID NO: 62]
 CMV UL34_Towne (1201) CCCATAACCCCGTTGTGTAATTTAA [SEQ ID NO: 63]
 CMV UL34_Toledo (1201) CCCATAACCCCGTTGTGTAATTTAA [SEQ ID NO: 64]
 CMV UL34_FIX (1201) CCCATAACCCCGTTGTGTAATTTAA [SEQ ID NO: 65]
 CMV UL34_PH (1201) CCCATAACCCCGTTGTGTAATTTAA [SEQ ID NO: 66]
 CMV UL34_TB40/E (1201) CCCATAACCCCGTTGTGTAATTTAA [SEQ ID NO: 67]
 CMV UL34_TR (1201) CCCATAACCCCGTTGTGTAATTTAA [SEQ ID NO: 68]

FIGURA 1C

CMV UL80_Merlin
 (1) ATGACGATGGACGAGCGAGTTCGGAGGCTGTGGGGGGGCTTACGTGGGGGGCTTTCTCGCCCGCTACGACCAGTCTCCGACGAGGCGCGAAATTCCTGT
 CMV UL80_AD169
 (1) ATGACGATGGACGAGCGAGTTCGGAGGCTGTGGGGGGGCTTACGTGGGGGGCTTTCTCGCCCGCTACGACCAGTCTCCGACGAGGCGCGAAATTCCTGT
 CMV UL80_Towne
 (1) ATGACGATGGACGAGCGAGTTCGGAGGCTGTGGGGGGGCTTACGTGGGGGGCTTTCTCGCCCGCTACGACCAGTCTCCGACGAGGCGCGAAATTCCTGT
 CMV UL80_Toledo
 (1) ATGACGATGGACGAGCGAGTTCGGAGGCTGTGGGGGGGCTTACGTGGGGGGCTTTCTCGCCCGCTACGACCAGTCTCCGACGAGGCGCGAAATTCCTGT
 CMV UL80_FIX
 (1) ATGACGATGGACGAGCGAGTTCGGAGGCTGTGGGGGGGCTTACGTGGGGGGCTTTCTCGCCCGCTACGACCAGTCTCCGACGAGGCGCGAAATTCCTGT
 CMV UL80_TB40/E
 (1) ATGACGATGGACGAGCGAGTTCGGAGGCTGTGGGGGGGCTTACGTGGGGGGCTTTCTCGCCCGCTACGACCAGTCTCCGACGAGGCGCGAAATTCCTGT
 CMV UL80_TR
 (1) ATGACGATGGACGAGCGAGTTCGGAGGCTGTGGGGGGGCTTACGTGGGGGGCTTTCTCGCCCGCTACGACCAGTCTCCGACGAGGCGCGAAATTCCTGT
 CMV UL80_Merlin
 (101) TGCCGGGGGACGTAGTGGAGCACTGGTTGCAGCGCGCAGGGCCAGGACAGCCTTCGTTGTCGGTCCGGTCCCGTCAACATCAACACACGACGACACGCGG
 CMV UL80_AD169
 (101) TGCCGGGGGACGTAGTGGAGCACTGGTTGCAGCGCGCAGGGCCAGGACAGCCTTCGTTGTCGGTCCGGTCCCGTCAACATCAACACACGACGACACGCGG
 CMV UL80_Towne
 (101) TGCCGGGGGACGTAGTGGAGCACTGGTTGCAGCGCGCAGGGCCAGGACAGCCTTCGTTGTCGGTCCGGTCCCGTCAACATCAACACACGACGACACGCGG
 CMV UL80_Toledo
 (101) TGCCGGGGGACGTAGTGGAGCACTGGTTGCAGCGCGCAGGGCCAGGACAGCCTTCGTTGTCGGTCCGGTCCCGTCAACATCAACACACGACGACACGCGG
 CMV UL80_FIX
 (101) TGCCGGGGGACGTAGTGGAGCACTGGTTGCAGCGCGCAGGGCCAGGACAGCCTTCGTTGTCGGTCCGGTCCCGTCAACATCAACACACGACGACACGCGG
 CMV UL80_TB40/E
 (101) TGCCGGGGGACGTAGTGGAGCACTGGTTGCAGCGCGCAGGGCCAGGACAGCCTTCGTTGTCGGTCCGGTCCCGTCAACATCAACACACGACGACACGCGG
 CMV UL80_TR
 (101) TGCCGGGGGACGTAGTGGAGCACTGGTTGCAGCGCGCAGGGCCAGGACAGCCTTCGTTGTCGGTCCGGTCCCGTCAACATCAACACACGACGACACGCGG
 CMV UL80_Merlin
 (201) CGTTGTAGGACACGTTGGCGGATGCAGAGGGTCCGGGACGGTCTTTTTTCCGGCTGGCTGGTCACTTCGGCCAGGTTTCTGGAGATTGTAACGGCGGGCT
 CMV UL80_AD169
 (201) CGTTGTAGGACACGTTGGCGGATGCAGAGGGTCCGGGACGGTCTTTTTTCCGGCTGGCTGGTCACTTCGGCCAGGTTTCTGGAGATTGTAACGGCGGGCT
 CMV UL80_Towne
 (201) CGTTGTAGGACACGTTGGCGGATGCAGAGGGTCCGGGACGGTCTTTTTTCCGGCTGGCTGGTCACTTCGGCCAGGTTTCTGGAGATTGTAACGGCGGGCT
 CMV UL80_Toledo
 (201) CGTTGTAGGACACGTTGGCGGATGCAGAGGGTCCGGGACGGTCTTTTTTCCGGCTGGCTGGTCACTTCGGCCAGGTTTCTGGAGATTGTAACGGCGGGCT
 CMV UL80_FIX
 (201) CGTTGTAGGACACGTTGGCGGATGCAGAGGGTCCGGGACGGTCTTTTTTCCGGCTGGCTGGTCACTTCGGCCAGGTTTCTGGAGATTGTAACGGCGGGCT
 CMV UL80_TB40/E
 (201) CGTTGTAGGACACGTTGGCGGATGCAGAGGGTCCGGGACGGTCTTTTTTCCGGCTGGCTGGTCACTTCGGCCAGGTTTCTGGAGATTGTAACGGCGGGCT
 CMV UL80_TR
 (201) CGTTGTAGGACACGTTGGCGGATGCAGAGGGTCCGGGACGGTCTTTTTTCCGGCTGGCTGGTCACTTCGGCCAGGTTTCTGGAGATTGTAACGGCGGGCT
 CMV UL80_Merlin
 (301) TCGGAAAAGTCCGAGCTGGTTTCGGGGGGGGCCGTCAGTCCGCTGCAGCCAGCAAGGTGGTGGAGTTTCTCAGCGGCAGCTACGGCGGCCCTCTCGCTCT
 CMV UL80_AD169
 (301) TCGGAAAAGTCCGAGCTGGTTTCGGGGGGGGCCGTCAGTCCGCTGCAGCCAGCAAGGTGGTGGAGTTTCTCAGCGGCAGCTACGGCGGCCCTCTCGCTCT
 CMV UL80_Towne
 (301) TCGGAAAAGTCCGAGCTGGTTTCGGGGGGGGCCGTCAGTCCGCTGCAGCCAGCAAGGTGGTGGAGTTTCTCAGCGGCAGCTACGGCGGCCCTCTCGCTCT
 CMV UL80_Toledo
 (301) TCGGAAAAGTCCGAGCTGGTTTCGGGGGGGGCCGTCAGTCCGCTGCAGCCAGCAAGGTGGTGGAGTTTCTCAGCGGCAGCTACGGCGGCCCTCTCGCTCT
 CMV UL80_FIX
 (301) TCGGAAAAGTCCGAGCTGGTTTCGGGGGGGGCCGTCAGTCCGCTGCAGCCAGCAAGGTGGTGGAGTTTCTCAGCGGCAGCTACGGCGGCCCTCTCGCTCT
 CMV UL80_TB40/E
 (301) TCGGAAAAGTCCGAGCTGGTTTCGGGGGGGGCCGTCAGTCCGCTGCAGCCAGCAAGGTGGTGGAGTTTCTCAGCGGCAGCTACGGCGGCCCTCTCGCTCT
 CMV UL80_TR
 (301) TCGGAAAAGTCCGAGCTGGTTTCGGGGGGGGCCGTCAGTCCGCTGCAGCCAGCAAGGTGGTGGAGTTTCTCAGCGGCAGCTACGGCGGCCCTCTCGCTCT
 CMV UL80_Merlin
 (401) CCAGCGGGCGCTCCGACGACCTGGAGCCCGGACCTCGCTTTCCGGCTCCGAAACACCGCCGTTCAAACACGTTGGCTTTGTCAGCGTGGGTCGGCGTCC
 CMV UL80_AD169
 (401) CCAGCGGGCGCTCCGACGACCTGGAGCCCGGACCTCGCTTTCCGGCTCCGAAACACCGCCGTTCAAACACGTTGGCTTTGTCAGCGTGGGTCGGCGTCC
 CMV UL80_Towne
 (401) CCAGCGGGCGCTCCGACGACCTGGAGCCCGGACCTCGCTTTCCGGCTCCGAAACACCGCCGTTCAAACACGTTGGCTTTGTCAGCGTGGGTCGGCGTCC
 CMV UL80_Toledo
 (401) CCAGCGGGCGCTCCGACGACCTGGAGCCCGGACCTCGCTTTCCGGCTCCGAAACACCGCCGTTCAAACACGTTGGCTTTGTCAGCGTGGGTCGGCGTCC
 CMV UL80_FIX
 (401) CCAGCGGGCGCTCCGACGACCTGGAGCCCGGACCTCGCTTTCCGGCTCCGAAACACCGCCGTTCAAACACGTTGGCTTTGTCAGCGTGGGTCGGCGTCC
 CMV UL80_TB40/E
 (401) CCAGCGGGCGCTCCGACGACCTGGAGCCCGGACCTCGCTTTCCGGCTCCGAAACACCGCCGTTCAAACACGTTGGCTTTGTCAGCGTGGGTCGGCGTCC
 CMV UL80_TR
 (401) CCAGCGGGCGCTCCGACGACCTGGAGCCCGGACCTCGCTTTCCGGCTCCGAAACACCGCCGTTCAAACACGTTGGCTTTGTCAGCGTGGGTCGGCGTCC

FIGURA 2A

CMV UL80_Merlin (501) CGGTACGTTGGCCGGTGTACGGGGGCGGATCCCGAGTGGSTCA**CA**CAGCGGTTTCCAGACCTCACGGCGGGCCGACCCG**TT**GACGGGGTACGTGGACAGTGGCAG

CMV UL80_AD169 (501) CGGTACGTTGGCCGGTGTACGGGGCGGATCCCGAGTGGSTCA**CA**CAGCGGTTTCCAGACCTCACGGCGGGCCGACCCG**TT**GACGGGTACGTGGACAGTGGCAG

CMV UL80_Towne (501) CGGTACGTTGGCCGGTGTACGGGAAGCGGATCCCGAGTGGST**TA**CCAGCGGTTTCCAGACCTCACGGGGCCGACCCG**CA**GACGGGTACGTGGACAGTGGCAG

CMV UL80_Toledo (501) CGGTACGTTGGCCGGTGTACGGGGCGGATCCCGAGTGGST**CA**CCAGCGGTTTCCAGACCTCACGGGGCCGACCCG**CC**GACGGGTACGTGGACAGTGGCAG

CMV UL80_FIX (501) CGGTACGTTGGCCGGTGTACGGGGCGGATCCCGAGTGGST**CA**CCAGCGGTTTCCAGACCTCACGGGGCCGACCCG**CC**GACGGGTACGTGGACAGTGGCAG

CMV UL80_PH (501) CGGTACGTTGGCCGGTGTACGGGGCGGATCCCGAGTGGST**TA**CCAGCGGTTTCCAGACCTCACGGGGCCGACCCG**CC**GACGGGTACGTGGACAGTGGCAG

CMV UL80_TB40/E (501) CGGTACGTTGGCCGGTGTACGGGGCGGATCCCGAGTGGST**CA**CAACCGGTTTCCAGACCTCACGGGGCCGACCCG**TT**GACGGGTACGTGGACAGTGGCAG

CMV UL80_TR (501) CGGTACGTTGGCCGGTGTACGGGGCGGATCCCGAGTGGST**CA**CTAGCGGTTTCCAGACCTCACGGGGCCGACCCG**CC**GACGGGTACGTGGACAGTGGCAG

CMV UL80_Merlin (601) CGGTGGGAGCACCTGCTGTGCAACGGCTGGGGGATCCCTTTCGCTCAGACAGCTACGGCCCTTTGGGCAACAGCGTGGACGGCCCTCTACATCCCGTGAGC

CMV UL80_AD169 (601) CGGTGGGAGCACCTGCTGTGCAACGGCTGGGGGATCCCTTTCGCTCAGACAGCTACGGCCCTTTGGGCAACAGCGTGGACGGCCCTCTACATCCCGTGAGC

CMV UL80_Towne (601) CGGTGGGAGCACCTGCTGTGCAACGGCTGGGGGATCCCTTTCGCTCAGACAGCTACGGCCCTTTGGGCAACAGCGTGGACGGCCCTCTACATCCCGTGAGC

CMV UL80_Toledo (601) CGGTGGGAGCACCTGCTGTGCAACGGCTGGGGGATCCCTTTCGCTCAGACAGCTACGGCCCTTTGGGCAACAGCGTGGACGGCCCTCTACATCCCGTGAGC

CMV UL80_FIX (601) CGGTGGGAGCACCTGCTGTGCAACGGCTGGGGGATCCCTTTCGCTCAGACAGCTACGGCCCTTTGGGCAACAGCGTGGACGGCCCTCTACATCCCGTGAGC

CMV UL80_PH (601) CGGTGGGAGCACCTGCTGTGCAACGGCTGGGGGATCCCTTTCGCTCAGACAGCTACGGCCCTTTGGGCAACAGCGTGGACGGCCCTCTACATCCCGTGAGC

CMV UL80_TB40/E (601) CGGTGGGAGCACCTGCTGTGCAACGGCTGGGGGATCCCTTTCGCTCAGACAGCTACGGCCCTTTGGGCAACAGCGTGGACGGCCCTCTACATCCCGTGAGC

CMV UL80_TR (601) CGGTGGGAGCACCTGCTGTGCAACGGCTGGGGGATCCCTTTCGCTCAGACAGCTACGGCCCTTTGGGCAACAGCGTGGACGGCCCTCTACATCCCGTGAGC

CMV UL80_Merlin (701) GACTGCCAAAGCTGGGTACGCAAGCAACTAGTGGGGTGACGGAGCGGGAGTGTACGTCAAAGCGGAGGTTTCGGCTGAGGGGGGCTGGGTATATAA

CMV UL80_AD169 (701) GACTGCCAAAGCTGGGTACGCAAGCAACTAGTGGGGTGACGGAGCGGGAGTCA**A**TACGTCAAAGCGGAGGTTTCGGCTGAGGGGGGCTGGGTATATAA

CMV UL80_Towne (701) GACTGCCAAAGCTGGGTACGCAAGCAACTAGTGGGGTGACGGAGCGGGAGTGTACGTCAAAGCGGAGGTTTCGGCTGAGGGGGGCTGGGTATATAA

CMV UL80_Toledo (701) GACTGCCAAAGCTGGGTACGCAAGCAACTAGTGGGGTGACGGAGCGGGAGTGTACGTCAAAGCGGAGGTTTCGGCTGAGGGGGGCTGGGTATATAA

CMV UL80_FIX (701) GACTGCCAAAGCTGGGTACGCAAGCAACTAGTGGGGTGACGGAGCGGGAGTGTACGTCAAAGCGGAGGTTTCGGCTGAGGGGGGCTGGGTATATAA

CMV UL80_PH (701) GACTGCCAAAGCTGGGTACGCAAGCAACTAGTGGGGTGACGGAGCGGGAGTGTACGTCAAAGCGGAGGTTTCGGCTGAGGGGGGCTGGGTATATAA

CMV UL80_TB40/E (701) GACTGCCAAAGCTGGGTACGCAAGCAACTAGTGGGGTGACGGAGCGGGAGTGTACGTCAAAGCGGAGGTTTCGGCTGAGGGGGGCTGGGTATATAA

CMV UL80_TR (701) GACTGCCAAAGCTGGGTACGCAAGCAACTAGTGGGGTGACGGAGCGGGAGTGTACGTCAAAGCGGAGGTTTCGGCTGAGGGGGGCTGGGTATATAA

CMV UL80_Merlin (801) AGCGGGGTCCGGCCGAGGGTTCGGGGGACAGCCCGCAGT**A**GGCCCGCACAGCCCGGGGGTGGGGGGCGCGTTCCTCCCTTTCGGTCCCGCTGGCTCCAGTCGAA

CMV UL80_AD169 (801) AGCGGGGTCCGGCCGAGGGTTCGGGGGACAGCCCGCAGT**A**GGCCCGCACAGCCCGGGGGTGGGGGGCGCGTTCCTCCCTTTCGGTCCCGCTGGCTCCAGTCGAA

CMV UL80_Towne (801) AGCGGGGTCCGGCCGAGGGTTCGGGGGACAGCCCGCAGT**A**GGCCCGCACAGCCCGGGGGTGGGGGGCGCGTTCCTCCCTTTCGGTCCCGCTGGCTCCAGTCGAA

CMV UL80_Toledo (801) AGCGGGGTCCGGCCGAGGGTTCGGGGGACAGCCCGCAGT**A**GGCCCGCACAGCCCGGGGG**A**CTGGGGGGCGCGTTCCTCCCTTTCGGTCCCGCTGGCTCCAGTCGAA

CMV UL80_FIX (801) AGCGGGGTCCGGCCGAGGGTTCGGGGGACAGCCCGCAGT**A**GGCCCGCACAGCCCGGGGGTGGGGGGCGCGTTCCTCCCTTTCGGTCCCGCTGGCTCCAGTCGAA

CMV UL80_PH (801) AGCGGGGTCCGGCCGAGGGTTCGGGGGACAGCCCGCAGT**A**GGCCCGCACAGCCCGGGGGTGGGGGGCGCGTTCCTCCCTTTCGGTCCCGCTGGCTCCAGTCGAA

CMV UL80_TB40/E (801) AGCGGGGTCCGGCCGAGGGTTCGGGGGACAGCCCGCAGT**A**GGCCCGCACAGCCCGGGGGTGGGGGGCGCGTTCCTCCCTTTCGGTCCCGCTGGCTCCAGTCGAA

CMV UL80_TR (801) AGCGGGGTCCGGCCGAGGGTTCGGGGGACAGCCCGCAGT**T**GGGGGGCGCGTTCCTCCCTTTCGGTCCCGCTGGCTCCAGTCGAA

CMV UL80_Merlin (901) CCGCCATCTCCCTGT**A**TAGCCGCTGGCTTCCAGCGTGGCCGCTCCGTTCT**TT**CCCGGGAA**T**ACCGCCGTCGGTTCCTCCCTCGGAGCCGGCAGAGGGGG

CMV UL80_AD169 (901) CCGCCATCTCCCTGT**A**TAGCCGCTGGCTTCCAGCGTGGCCGCTCCGTTCT**TT**CCCGGGAA**T**ACCGCCGTCGGTTCCTCCCTCGGAGCCGGCAGAGGGGG

CMV UL80_Towne (901) CCGCCATCTCCCTGT**TC**AGCCGCTGGCTTCCAGCGTGGCCGCTCCGTTCT**CC**CGGGAA**T**CA**T**GGCCGTCGCTTCCCTCCCT**TT**CGAGCCGGCAGAGGGGG

CMV UL80_Toledo (901) CCGCCATCTCCCTGT**TC**AGCCGCTGGCTTCCAGCGTGGCCGCTCCGTTCT**CC**CGGGAA**T**CA**T**GGCCGTCGCTTCCCTCCCT**TT**CGAGCCGGCAGAGGGGG

CMV UL80_FIX (901) CCGCCATCTCCCTGT**TC**AGCCGCTGGCTTCCAGCGTGGCCGCTCCGTTCT**CC**CGGGAA**T**CA**C**CGCCGTCGGTTCCTCCCT**TT**CGAGCCGGCAGAGGGGG

CMV UL80_PH (901) CCGCCATCTCCCTGT**TC**AGCCGCTGGCTTCCAGCGTGGCCGCTCCGTTCT**CC**CGGGAA**T**CA**C**CGCCGTCGGTTCCTCCCT**TT**CGAGCCGGCAGAGGGGG

CMV UL80_TB40/E (901) CCGCCATCTCCCTGT**TC**AGCCGCTGGCTTCCAGCGTGGCCGCTCCGTTCT**CC**CGGGAA**T**CA**C**CGCCGTCGGTTCCTCCCT**TT**CGAGCCGGCAGAGGGGG

CMV UL80_TR (901) CCGCCATCTCCCTGT**TT**CAG**T**GGCTGGCTTCCAG**T**GGCCGCTCCGTTCT**CC**CGGGAA**T**CA**C**CGCCGTCGGTTCCTCCCT**TT**CGAGCCGGCAGAGGGGG

FIGURA 2B

CMV UL80_Merlin (1501) CGTCACGGGGCAGCGCGGACACAACAAACCCCGTAAAGAA**A**CCGGGGGGGGCTCGTCGTC**GTC**---CTCGGACGAAGACITGAGTTTCCCA**A**GGGGAGG
 CMV UL80_AD169 (1501) CGTCACGGGGCAGCGCGGACACAACAAACCCCGTAAAGAA**A**CCGGGGGGGGCTCGTCGTC**GTC**---CTCGGACGAAGACITGAGTTTCCCA**A**GGGGAGG
 CMV UL80_Towne (1501) CGTCACGGGGCAGCGCGGACACAACAAACCCCGTAAAGAA**G**CCGGGGGGGGCTCGTCGTC**GTC**---CTCGGACGAAGACITGAGTTTCCCA**A**GGGGAGG
 CMV UL80_Toledo (1501) CGTCACGGGGCAGCGG**T**GGACACAACAAACCCCGTAAAGAA**G**CCGGGGGGGGCTCGTCGTC**GTC**---CTCGGACGAAGACITGAGTTTCCCA**A**GGGGAGG
 CMV UL80_FIX (1501) CGTCACGGGGCAGCGG**T**GGACACAACAAACCCCGTAAAGAA**G**CCGGGGGGGGCTCGTCGTC**GTC**---CTCGGACGAAGACITGAGTTTCCCA**A**GGGGAGG
 CMV UL80_PH (1501) CGTCACGGGGCAGCGG**T**GGACACAACAAACCCCGTAAAGAA**G**CCGGGGGGGGCTCGTCGTC**GTC**---CTCGGACGAAGACITGAGTTTCCCA**A**GGGGAGG
 CMV UL80_TB40/E (1501) CGTCACGGGGCAGCGG**T**GGACACAACAAACCCCGTAAAGAA**G**CCGGGGGGGGCTCGTCGTC**GTC**---CTCGGACGAAGACITGAGTTTCCCA**A**GGGGAGG
 CMV UL80_TR (1501) CGTCACGGGGCAGCGG**T**GGACACAACAAACCCCGTAAAGAA**G**CCGGGGGGGGCTCGTCGTC**GTC**---CTCGGACGAAGACITGAGTTTCCCA**A**GGGGAGG

 CMV UL80_Merlin (1598) CCGAGCACGGCCGGG**A**CGAAAGCTCTAAAAGTCACTCAA**T**AGCGACGGTGAAGTGGCGGGCACGCGGGTTC~~CA~~AAITCAGCAGCAGCAACAACGGTTA
 CMV UL80_AD169 (1598) CCGAGCACGGCCGGG**A**CGAAAGCTCTAAAAGTCACTCAA**T**AGCGACGGTGAAGTGGCGGGCACGCGGGTTC~~CA~~AAITCAGCAGCAGCAACAACGGTTA
 CMV UL80_Towne (1595) CCGAGCACGGCCGGG**G**CGAAAGCTCTAAAAGTCACTCAA**T**AGCGACGGTGAAGTGGCGGGCACGCGGGTTC~~CA~~AAITCAGCAGCAGCAACAACGGTTA
 CMV UL80_Toledo (1601) CCGAGCACGGCCGGG**G**CGAAAGCTCTAAAAGTCACTCAA**T**AGCGACGGTGAAGTGGCGGGCACGCGGGTTC~~CA~~AAITCAGCAGCAGCAACAACGGTTA
 CMV UL80_FIX (1598) CCGAGCACGGCCGGG**G**CGAAAGCTCTAAAAGTCACTCAA**T**AGCGACGGTGAAGTGGCGGGCACGCGGGTTC~~CA~~AAITCAGCAGCAGCAACAACGGTTA
 CMV UL80_PH (1598) CCGAGCACGGCCGGG**G**CGAAAGCTCTAAAAGTCACTCAA**C**AGCGACGGTGAAGTGGCGGGCACGCGGGTTC~~CA~~AAITCAGCAGCAGCAACAACGGTTA
 CMV UL80_TB40/E (1598) CCGAGCACGGCCGGG**G**CGAAAGCTCTAAAAGTCACTCAA**T**AGCGACGGTGAAGTGGCGGGCACGCGGGTTC~~CA~~AAITCAGCAGCAGCAACAACGGTTA
 CMV UL80_TR (1598) CCGAGCACGGCCGGG**G**CGAAAGCTCTAAAAGTCACTCAA**T**AGCGACGGTGAAGTGGCGGGCACGCGGGTTC~~CA~~AAITCAGCAGCAGCAACAACGGTTA

 CMV UL80_Merlin (1698) CGATGAAC**T**CGGGATGCCATTACAGAGCTGAACCGGATCTGTTT**CC**GGGGGGCAGAGTCTACGTTACTTTCCGGGGCTCT**CC**CTTTCGGGGCTCT
 CMV UL80_AD169 (1698) CGATGAAC**T**CGGGATGCCATTACAGAGCTGAACCGGATCTGTTT**CG**GGGGGGCAGAGTCTACGTTACTTTCCGGGGCTCT**TC**CTTTCGGGGCTCT
 CMV UL80_Towne (1695) CGATGAAC**T**CGGGATGCCATTACAGAGCTGAACCGGATCTGTTT**CC**GGGGGGCAGAGTCTACGTTACTTTCCGGGGCTCT**CC**CGGTCGGGGCTCT
 CMV UL80_Toledo (1701) CGATGAAC**T**CGGGATGCCATTACAGAGCTGAACCGGATCTGTTT**CC**GGGGGGCAGAGTCTACGTTACTTTCCGGGGCTCT**CC**CGGTCGGGGCTCT
 CMV UL80_FIX (1698) CGATGAAC**T**CGGGATGCCATTACAGAGCTGAACCGGATCTGTTT**CG**GGGGGGCAGAGTCTACGTTACTTTCCGGGGCTCT**CC**CGGTCGGGGCTCT
 CMV UL80_PH (1698) CGATGAAC**T**CGGGATGCCATTACAGAGCTGAACCGGATCTGTTT**CC**GGGGGGCAGAGTCTACGTTACTTTCCGGGGCTCT**CC**CGGTCGGGGCTCT
 CMV UL80_TB40/E (1698) CGATGAAC**T**CGGGATGCCATTACAGAGCTGAACCGGATCTGTTT**CC**GGGGGGCAGAGTCTACGTTACTTTCCGGGGCTCT**CC**CGGTCGGGGCTCT
 CMV UL80_TR (1698) CGATGAAC**T**CGGGATGCCATTACAGAGCTGAACCGGATCTGTTT**CC**GGGGGGCAGAGTCTACGTTACTTTCCGGGGCTCT**CC**CGGTCGGGGCTCT

 CMV UL80_Merlin (1798) TCCTCCCA**A**ACTACTACTACCGTGTGTACTTCCACCC**A**GGAGCTGACGAG**T**GGCGGGAGGAGAAACAC**CC**ACGGCACTTCTAT**CC**GGAGGTGCCAAGGTAG
 CMV UL80_AD169 (1798) TCCTCCCA**A**ACTACTACTACCGTGTGTACTTCCACCC**GG**GGAGCTGACGAG**T**GGCGGGAGGAGAAACAC**CC**ACGGCACTTCTAT**CC**GGAGGTGCCAAGGTAG
 CMV UL80_Towne (1795) TCCTCCCA**CG**ACTACTACTACCGTGTGTACTTCCACCC**GG**GGAGCTGACGAG**CG**GGGGAGGAGAAACAC**CG**ACGGCACTTCTAT**CA**GGAGGTGCCAAGGTAG
 CMV UL80_Toledo (1801) TCCTCCCA**CG**ACTACTACTACCGTGTGTACTTCCACCC**GG**GGAGCTGACGAG**CG**GGGGAGGAGAAACAC**CG**ACGGCACTTCTAT**CA**GGAGGTGCCAAGGTAG
 CMV UL80_FIX (1798) TCCTCCCA**A**ACTACTACTACCGTGTGTACTTCCACCC**GG**GGAGCTGACGAG**T**GGCGGGAGGAGAAACAC**CC**ACGGCACTTCTAT**CC**GGAGGTGCCAAGGTAG
 CMV UL80_PH (1798) TCCTCCCA**CG**ACTACTACTACCGTGTGTACTTCCACCC**GG**GGAGCTGACGAG**CG**GGGGAGGAGAAACAC**CG**ACGGCACTTCTAT**CA**GGAGGTGCCAAGGTAG
 CMV UL80_TB40/E (1798) TCCTCCCA**A**ACTACTACTACCGTGTGTACTTCCACCC**GG**GGAGCTGACGAG**T**GGCGGGAGGAGAAACAC**CC**ACGGCACTTCTAT**CC**GGAGGTGCCAAGGTAG
 CMV UL80_TR (1798) TCCTCCCA**A**ACTACTACTACCGTGTGTACTTCCACCC**GG**GGAGCTGACGAG**CG**GGGGAGGAGAAACAC**CG**ACGGCACTTCTAT**CC**GGAGGTGCCAAGGTAG

 CMV UL80_Merlin (1898) CTGAGCGGCTCAGG**CC**GGCTGGTGAACGGCAGTTGCCGCTCGGTACCGCTCGGTTCGGTTCGAGGGGCAACGG**CC**GGGGCTCTCGACGGCAGGTTCTTTC
 CMV UL80_AD169 (1898) CTGAGCGGCTCAGG**CC**GGCTGGTGAACGGCAGTTGCCGCTCGGTACCGCTCGGTTCGGTTCGAGGGGCAACGG**CC**GGGGCTCTCGACGGCAGGTTCTTTC
 CMV UL80_Towne (1895) CTGAGCGGCTCAGG**CG**GG**T**GGTGAACGGCAGTTGCCGCTCGGTACCGCTCGGTTCGGTTCGAGGGGCAACGG**A**GGGGCTCTCGACGGGGGTTCTTTC
 CMV UL80_Toledo (1901) CTGAGCGGCTCAGG**CC**GGCTGGTGAACGGCAGTTGCCGCTCGGTACCGCTCGGTTCGGTTCGAGGGGCAACGG**A**GGGGCTCTCGACGGGGGTTCTTTC
 CMV UL80_FIX (1898) CTGAGCGGCTCAGG**T**GGCTGGTGAACGGCAGTTGCCGCTCGGTACCGCTCGGTTCGGTTCGAG**A**GGGGCAACGG**CC**GGGGCTCTCGACGG**A**GGGTTCTTTC
 CMV UL80_PH (1898) CTGAGCGGCTCAGG**CC**GGCTGGTGAACGGCAGTTGCCGCTCGGTACCGCTCGGTTCGGTTCGAGGGGCAACGG**A**GGGGCTCTCGACGGGGGTTCTTTC
 CMV UL80_TB40/E (1898) CTGAGCGGCTCAGG**CC**GGCTGGTGAACGGCAGTTGCCGCTCGGTACCGCTCGGTTCGGTTCGAGGGGCAACGG**CC**GGGGCTCTCGACGGCAGGTTCTTTC
 CMV UL80_TR (1898) CTGAGCGGCTCAGG**CC**GGCTGGTGAACGGCAGTTGCCGCTCGGTACCGCTCGGTTCGGTTCGAGGGGCAACGG**CC**GGGGCTCTCGA**T**GG**CA**AGGTTCTTTC

FIGURA 2D

CMV UL80_Merlin (1998) TTCTG**C**CGGGCTAGTGTCTGTTAGCGCGCGCTGCTGCT**CC**CAAGCGCGCGCAGCTTCCAGAGCGCGCGCCCAAGACATGGT**AG**ATCTGAATCGGCGGATT
 CMV UL80_AD169 (1998) TTCTGCGGGCTAGTGTCTGTTTAGCGCGCGCTGCTGCT**CC**CAAGCGCGCGCAGCTTCCAGAGCGCGCGCCCAAGACATGGT**AG**ATCTGAATCGGCGGATT
 CMV UL80_Towne (1995) TTCTGCGGGCTAGTGTCTGTTTAGCGCGCGCTGCTGCT**CC**CAAGCGCGCGCAGCTTCCAGAGCGCGCGCCCAAGACATGGT**GG**ATCTGAATCGGCGGATT
 CMV UL80_Toledo (2001) TTCTG**T**CGGGCTAGTGTCTGTTTAGCGCGCGCTGCTGCT**CC**CAAGCGCGCGCAGCTTCCAGAGCGCGCGCCCAAGACATGGT**CG**ATCTGAATCGGCGGATT
 CMV UL80_FIX (1998) TTCTGCGGGCTAGTGTCTGTTTAGCGCGCGCTGCTGCT**CC**CAAGCGCGCGCAGCTTCCAGAGCGCGCGCCCAAGACATGGT**AG**ATCTGAATCGGCGGATT
 CMV UL80_PH (1998) TTCTGCGGGCTAGTGTCTGTTTAGCGCGCGCTGCTGCT**CC**CAAGCGCGCGCAGCTTCCAGAGCGCGCGCCCAAGACATGGT**GG**ATCTGAATCGGCGGATT
 CMV UL80_TB40/E (1998) TTCTGCGGGCTAGTGTCTGTTTAGCGCGCGCTGCTGCT**CC**CAAGCGCGCGCAGCTTCCAGAGCGCGCGCCCAAGACATGGT**AG**ATCTGAATCGGCGGATT
 CMV UL80_TR (1998) TTCTGCGGGCTAGTGTCTGTTTAGCGCGCGCTGCTGCT**T**CAAGCGCGCGCAGCTTCCAGAGCGCGCGCCCAAGACATGGT**AG**ATCTGAATCGGCGGATT

 CMV UL80_Merlin (2098) TTTGTGGCTGCGCTCAATAAGCTCGAGTAA [SEQ ID NO: 69]
 CMV UL80_AD169 (2098) TTTGTGGCTGCGCTCAATAAGCTCGAGTAA [SEQ ID NO: 70]
 CMV UL80_Towne (2095) TTTGTGGCTGCGCTCAATAAGCTCGAGTAA [SEQ ID NO: 71]
 CMV UL80_Toledo (2101) TTTGTGGCTGCGCTCAATAAGCTCGAA**A**TAA [SEQ ID NO: 72]
 CMV UL80_FIX (2098) TTTGTGGCTGCGCTCAATAAGCTCGAGTAA [SEQ ID NO: 73]
 CMV UL80_PH (2098) TTTGTGGCTGCGCTCAATAAGCTCGAGTAA [SEQ ID NO: 74]
 CMV UL80_TB40/E (2098) TTTGTGGCTGCGCTCAATAAGCTCGAGTAA [SEQ ID NO: 75]
 CMV UL80_TR (2098) TTTGTGGCTGCGCTCAATAAGCTCGAGTAA [SEQ ID NO: 76]

FIGURA 2E