

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 323**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/686 (2008.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.08.2013 PCT/EP2013/067087**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.02.2014 WO14027066**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2013 E 13748353 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018 EP 2885432**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para la detección de virus 1 y 2 del herpes simple**

30 Prioridad:

17.08.2012 US 201213588943

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

17.10.2018

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)

Grenzacherstrasse 124

4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

WU, XIAONING y

YOUNG, KAREN

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 686 323 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y procedimientos para la detección de virus 1 y 2 del herpes simple

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo del diagnóstico de virus y, más particularmente, a la detección del virus 1 y/o 2 del herpes simple.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los virus 1 y 2 del herpes simple (VHS-1 y VHS-2), también conocidos como virus 1 y 2 del herpes humano (VHH-1 y 2), son virus de ADN bicatenario con envoltura y pertenecen a la familia del virus del herpes, Herpesviridae. En general, el virus VHS infecta a los seres humanos en la piel o las membranas mucosas de la boca (VHS-1) y genitales (VHS-2). El virus VHS puede establecer infecciones latentes de por vida después de las infecciones primarias, y reactivarse a partir de la latencia para nuevos brotes. Las infecciones por VHS en general implican la erupción de pequeñas ampollas en la piel o las membranas mucosas, después lo cual el virus permanece en estado latente dentro de las células nerviosas que abastecen el área infectada. El virus se somete a ciclos de reactivación en los que el virus viaja a través de las fibras nerviosas de regreso a la piel y de esa manera causa erupciones de ampollas en la misma área de la piel que la infección anterior. También hay casos que no implican la formación de ampollas.

El VHS es el agente causante de una variedad de trastornos, que incluyen ceguera y encefalitis. Si no se trata, la tasa de mortalidad por esta última enfermedad es tan alta como de un 70 %, en comparación con únicamente un 19 % entre aquellos que reciben tratamiento. Aproximadamente un 38 % de los pacientes tratados se recuperan por completo, lo que subraya la importancia de diagnosticar la infección por VHS en una etapa temprana. El VHS-1 causa principalmente encefalitis en adultos, mientras que el VHS-2 con mayor frecuencia causa encefalitis del recién nacido, estando asociado este último con infecciones genitales maternas.

Además, el VHS-2 es una de las enfermedades de transmisión sexual más comunes en la sociedad. La tasa de mortalidad de la encefalitis relacionada con el VHS es más alta que la de todos los otros tipos de encefalitis, que es de 1 a 4 por millón al año. La gran variedad de sus síntomas puede incluir fiebre, cefaleas, convulsiones, un nivel alterado de conciencia y cambios de personalidad.

Tradicionalmente, se cree que el VHS-1 causa infección bucal, mientras que el VHS-2 causa infección genital. Sin embargo, el VHS-1 es una causa más frecuente de herpes genital primario y, a menudo, coinfecta con el VHS-2 en muchos países desarrollados. Como resultado, se vuelve muy importante tener un ensayo de PCR que pueda detectar y discriminar ambos virus simultáneamente. Este nuevo ensayo de VHS está diseñado para lograr eso en un único tubo de reacción.

El diagnóstico de infecciones por VHS-1 y/o VHS-2 (VHS-1/2) se realiza comúnmente usando cultivo celular en muestras clínicas apropiadas, lo que consume mucho tiempo y requiere mucho trabajo. Además, el diagnóstico serológico de infecciones por VHS-1/2 carece de suficiente sensibilidad y especificidad. Por tanto, existe una necesidad en la técnica de un procedimiento rápido y fiable para detectar específicamente ambos tipos de VHS de una manera sensible.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas. En las mismas se divulgan procedimientos para la detección rápida de la presencia o ausencia de ácidos nucleicos VHS-1 y/o VHS-2 en una muestra biológica o no biológica, por ejemplo, detección combinada de ácidos nucleicos de VHS-1 y/o VHS-2 por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real en un único tubo de ensayo. Los modos de realización incluyen procedimientos de detección de la presencia o ausencia de ácidos nucleicos de VHS-1 y/o VHS-2 que comprenden realizar al menos una etapa de ciclado, que puede incluir una etapa de amplificación y una etapa de hibridación. Además, los modos de realización incluyen cebadores oligonucleotídicos, sondas oligonucleotídicas y kits que están diseñados para la detección de infecciones del VHS-1 o VHS-2 individual, o coinfecciones de VHS-1 y VHS-2 en un único tubo. Los procedimientos de detección están diseñados para abordar los genes de la ADN polimerasa B vírica de VHS-1 (VHS-1 Pol) y la timidina cinasa C del VHS-1 (VHS-1 TK) y también abordan los genes de la timidina cinasa C del VHS-2 (VHS-2 TK) y la glucoproteína B del VHS-2 (VHS-2 gB) simultáneamente, lo que permite detectar y diferenciar infecciones por VHS-1 y/o VHS-2 en una única prueba.

En un modo de realización, se proporciona un procedimiento de detección de la presencia o ausencia de un ácido nucleico de VHS-1 y/o VHS-2 en una muestra, que incluye realizar una etapa de amplificación que incluye poner en contacto la muestra con una pluralidad de conjuntos de cebadores oligonucleotídicos de VHS-1 y VHS-2 para producir uno o más productos de amplificación si hay algún ácido nucleico de VHS-1 y/o VHS-2 presente en la muestra; realizar una etapa de hibridación que incluye poner en contacto el uno o más productos de amplificación

con una pluralidad de sondas oligonucleotídicas de VHS-1 y VHS-2 detectables; y detectar la presencia o ausencia del uno o más productos de amplificación, en el que la presencia del uno o más productos de amplificación es indicativa de la presencia del ácido nucleico de VHS-1 y/o VHS-2 en la muestra y en el que la ausencia del uno o más productos de amplificación es indicativo de la ausencia del ácido nucleico de VHS-1 y/o VHS-2 en la muestra; en el que la pluralidad de conjuntos de cebadores oligonucleotídicos de VHS-1 y VHS-2 incluye conjuntos de cebadores oligonucleotídicos de VHS-1 que amplifican una diana génica VHS-1 Pol y VHS-1 TK, y conjuntos de cebadores oligonucleotídicos de VHS-2 que amplifican una diana génica VHS-2 TK y VHS-2 gB, y en el que dicha pluralidad de sondas oligonucleotídicas de VHS-1 y VHS-2 detectables incluyen al menos dos sondas oligonucleotídicas de VHS-1 específicas para un producto de amplificación de VHS-1 Pol y TK VHS-1, y al menos dos sondas de oligonucleótidos de VHS-2 específicas para un producto de amplificación de VHS-2 TK y VHS-2 gB.

En un modo de realización, el conjunto de cebadores oligonucleotídicos para la amplificación de la diana génica VHS-1 Pol incluye al menos dos oligonucleótidos que tienen secuencias de ácido nucleico que comprenden las SEQ ID NO: 1 y 2 o un complemento de las mismas; el conjunto de cebadores oligonucleotídicos para la amplificación de la diana génica VHS-1 TK incluye al menos dos oligonucleótidos que tienen secuencias de ácido nucleico que comprenden las SEQ ID NO: 4 y 5 o un complemento de las mismas; el conjunto de cebadores oligonucleotídicos para la amplificación de la diana génica VHS-2 TK incluye al menos dos oligonucleótidos que tienen secuencias de ácido nucleico que comprenden las SEQ ID NO: 7 y 8 o un complemento de las mismas; y el conjunto de cebadores oligonucleotídicos para la amplificación de la diana génica VHS-2 gB incluye al menos dos oligonucleótidos que tienen secuencias de ácido nucleico que comprenden las SEQ ID NO: 10 y 11 o un complemento de las mismas. Además, la sonda oligonucleotídica de VHS-1 detectable para la detección del producto de amplificación de VHS-1 Pol tiene una secuencia de ácido nucleico que incluye la SEQ ID NO: 3 o un complemento de la misma; la sonda oligonucleotídica de VHS-1 detectable para la detección del producto de amplificación de VHS-1 TK tiene una secuencia de ácido nucleico que incluye la SEQ ID NO: 6 o un complemento de la misma; la sonda oligonucleotídica de VHS-2 detectable para la detección del producto de amplificación VHS-2 TK tiene una secuencia de ácido nucleico que incluye la SEQ ID NO: 9 o un complemento de la misma; la sonda oligonucleotídica de VHS-2 detectable para la detección del producto de amplificación VHS-2 gB tiene una secuencia de ácido nucleico que incluye la SEQ ID NO: 12 o un complemento de la misma. En otro modo de realización del procedimiento, cada una de la pluralidad de sondas oligonucleotídicas de VHS-1 y VHS-2 detectables está marcada con un resto fluorescente donador y un resto fluorescente aceptador correspondiente, en el que la etapa de detección comprende detectar la presencia o ausencia de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) entre el resto fluorescente donador y el resto fluorescente aceptador de una o más de las sondas oligonucleotídicas de VHS-1 y/o VHS-2, en el que la presencia o ausencia de fluorescencia es indicativa de la presencia o ausencia de ácido nucleico de VHS-1 y/o VHS-2 en la muestra. La presente divulgación proporciona un oligonucleótido que comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico seleccionada de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12, o un complemento de las mismas, cuyo oligonucleótido tiene 100 o menos nucleótidos. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un oligonucleótido que incluye un ácido nucleico que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %, etc.) con una de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12, o un complemento de las mismas, cuyo oligonucleótido tiene 100 o menos nucleótidos. En general, estos oligonucleótidos pueden ser ácidos nucleicos cebadores, ácidos nucleicos sonda o similares en estos modos de realización. En algunos de estos modos de realización, los oligonucleótidos tienen 40 o menos nucleótidos (por ejemplo, 35 o menos nucleótidos, 30 o menos nucleótidos, etc.). En algunos modos de realización, los oligonucleótidos comprenden al menos un nucleótido modificado, por ejemplo, para alterar la estabilidad de hibridación de ácido nucleico con respecto a nucleótidos no modificados. Opcionalmente, los oligonucleótidos comprenden al menos uno o más marcadores detectables. En determinados modos de realización, los oligonucleótidos comprenden al menos un resto marcador y/o al menos un resto extintor. En algunos modos de realización, los oligonucleótidos incluyen al menos una variación modificada conservativamente. Las "variaciones modificadas conservativamente" o, simplemente, las "variaciones conservativas" de una secuencia particular de ácido nucleico se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas o, cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Un experto reconocerá que las sustituciones, eliminaciones o adiciones individuales que alteran, añaden o eliminan un aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos (típicamente menos de un 5 %, más típicamente menos de un 4 %, 2 % o 1 %) en una secuencia codificada son "variaciones modificadas conservativamente" en las que las alteraciones dan como resultado la eliminación de un aminoácido, la adición de un aminoácido o la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. La divulgación proporciona una composición que comprende un conjunto de cebadores oligonucleotídicos adecuados para producir uno o más productos de amplificación de una diana génica de ADN polimerasa B del VHS-1 (VHS-1 Pol) y de timidina cinasa C del VHS-1 (VHS-1 TK) que comprende o que consiste en una secuencia de ácido nucleico seleccionada de las SEQ ID NO: 1, 2, 4 y 5, o un complemento de las mismas, cuyos cebadores oligonucleotídicos tienen 100 o menos nucleótidos. En la presente divulgación se proporciona una composición que comprende un conjunto de cebadores oligonucleotídicos adecuados para producir uno o más productos de amplificación de una diana génica de timidina cinasa C del VHS-2 (VHS-2 TK) y de la glucoproteína B del VHS-2 (VHS-2 gB) que comprende o que consiste en una secuencia de ácido nucleico seleccionada de las SEQ ID NO: 7, 8, 10 y 11, o un complemento de las mismas, cuyos cebadores oligonucleotídicos tienen 100 o menos nucleótidos. En

determinados modos de realización, la composición comprende un conjunto de cebadores oligonucleotídicos que comprenden o consisten en una secuencia de ácido nucleico seleccionada de las SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 y 11, o un complemento de las mismas, cuyos cebadores oligonucleotídicos tienen 100 o menos nucleótidos. En la presente divulgación, se proporciona una composición que comprende un conjunto de sondas oligonucleotídicas detectables adecuadas para la detección de un producto de amplificación de ADN polimerasa del VHS-1 (VHS-1 Pol) y de timidina cinasa C del de VHS-1 (VHS-1 TK) que tiene una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 3 y 6 o un complemento de las mismas, cuyas sondas oligonucleotídicas tienen 100 o menos nucleótidos. En otro modo de realización más, se proporciona una composición que comprende un conjunto de sondas oligonucleotídicas detectables adecuadas para la detección de un producto de amplificación de timidina cinasa C del VHS-2 (VHS-2 TK) y de la glucoproteína B del VHS-2 (VHS-2 gB) que tiene una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 9 y 12 o un complemento de las mismas, cuyas sondas oligonucleotídicas tienen 100 o menos nucleótidos. En determinados modos de realización, la composición comprende un conjunto de sondas oligonucleotídicas que comprenden o que consisten en una secuencia de ácido nucleico seleccionada de las SEQ ID NO: 3, 6, 9 y 12, o un complemento de las mismas, cuyas sondas oligonucleotídicas tienen 100 o menos nucleótidos.

En un aspecto, la amplificación puede emplear una enzima polimerasa que tiene actividad exonucleasa 5' a 3'. Por tanto, los restos fluorescentes primero y segundo pueden estar en no más de 5 nucleótidos entre sí a lo largo de la longitud de la sonda oligonucleotídica. En otro aspecto, las sondas oligonucleotídicas de VHS-1 y VHS-1 incluyen una secuencia de ácido nucleico que permite la formación de estructura secundaria. Dicha formación de estructura secundaria en general da como resultado la proximidad espacial entre el primer y el segundo resto fluorescente. En algunos modos de realización de este procedimiento, el segundo resto fluorescente en la sonda oligonucleotídica puede ser un extintor.

En otro aspecto más, la divulgación proporciona procedimientos de detección de la presencia o ausencia de VHS-1 y/o VHS-2 en una muestra biológica de un individuo. Dichos procedimientos en general incluyen realizar al menos una etapa de ciclado, que incluye una etapa de amplificación y una etapa de unión al tinte. Típicamente, la etapa de amplificación incluye poner en contacto la muestra con una pluralidad de pares de cebadores de VHS-1/2 para producir uno o más productos de amplificación de VHS-1/2 si está presente una molécula de ácido nucleico de VHS-1 y/o VHS-2 en la muestra y la etapa de unión al tinte incluye poner en contacto el producto de amplificación de VHS-1/2 con un tinte de unión a ADN bicatenario. Dichos procedimientos también incluyen detectar la presencia o ausencia de unión del tinte de unión a ADN bicatenario en el producto de amplificación, en el que la presencia de unión es indicativa de la presencia de VHS-1/2 en la muestra, y en el que la ausencia de unión es indicativa de la ausencia de VHS-1/2 en la muestra. Un tinte de unión a ADN bicatenario representativo es el bromuro de etidio. Además, dichos procedimientos también pueden incluir determinar la temperatura de fusión entre el producto de amplificación de VHS-1/2 y el tinte de unión a ADN bicatenario, en el que la temperatura de fusión confirma la presencia o ausencia de VHS-1 y/o VHS-2.

En un modo de realización adicional, se proporciona un kit para detectar la presencia o ausencia de uno o más ácidos nucleicos de VHS-1 y/o VHS-2. El kit puede incluir una pluralidad de conjuntos de cebadores oligonucleotídicos de VHS-1 y VHS-2 específicos para la amplificación de una diana génica VHS-1 Pol y VHS-1 TK, y una diana génica VHS-2 TK y VHS-2 gB; y una pluralidad de sondas oligonucleotídicas de VHS-1 y VHS-2 detectables específicas para la detección de un producto de amplificación de VHS-1 Pol y VHS-1 TK, y un producto de amplificación de VHS-2 TK y VHS-2 gB.

En determinados modos de realización, el kit incluye un conjunto de cebadores para la amplificación de la diana génica VHS-1 Pol que comprende al menos dos oligonucleótidos que tienen secuencias de ácido nucleico que comprenden las SEQ ID NO: 1 y 2 o un complemento de las mismas; un conjunto de cebadores para la amplificación de la diana génica VHS-1 TK que comprende al menos dos oligonucleótidos que tienen secuencias de ácido nucleico que comprenden las SEQ ID NO: 4 y 5 o un complemento de las mismas; un conjunto de cebadores para la amplificación de la diana génica VHS-2 TK que comprende al menos dos oligonucleótidos que tienen secuencias de ácido nucleico que comprenden las SEQ ID NO: 7 y 8 o un complemento de las mismas; un conjunto de cebadores para la amplificación de la diana génica VHS-2 gB que comprende al menos dos oligonucleótidos que tienen secuencias de ácido nucleico que comprenden las SEQ ID NO: 10 y 11 o un complemento de las mismas; y una sonda oligonucleotídica de VHS-1 detectable para la detección del producto de amplificación de VHS-1 Pol que tiene una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 3 o un complemento de la misma; una sonda oligonucleotídica de VHS-1 detectable para la detección del producto de amplificación de VHS-1 TK que tiene una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 6 o un complemento de la misma; una sonda oligonucleotídica de VHS-2 detectable para la detección del producto de amplificación de VHS-2 TK que tiene una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 9 o un complemento de la misma; una sonda oligonucleotídica de VHS-2 detectable para la detección del producto de amplificación de VHS-2 gB que tiene una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 12 o un complemento de la misma.

En un aspecto, el kit puede incluir sondas oligonucleotídicas ya marcadas con restos fluorescentes donadores y aceptadores correspondientes, o puede incluir restos de fluoróforo para marcar las sondas. En determinados

aspectos, el resto fluorescente aceptador es un extintor. El kit también puede incluir trifosfatos de nucleósidos, ácido nucleico polimerasa y tampones necesarios para la función del ácido nucleico polimerasa. El kit también puede incluir un prospecto e instrucciones para usar los cebadores oligonucleotídicos, las sondas oligonucleotídicas y los restos de fluoróforo para detectar la presencia o ausencia de ácidos nucleicos de VHS-1 y/o VHS-2 en una muestra.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen a continuación procedimientos y materiales adecuados. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Los detalles de uno o más modos de realización de la divulgación se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción a continuación. Otras características, objetivos y ventajas de la invención que se define en las reivindicaciones adjuntas serán evidentes a partir de los dibujos y la descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1A muestra curvas de crecimiento de PCR de experimentos que usan cebadores que funcionan bien en la región VHS-1 TK-C. La figura 1B muestra curvas de crecimiento de PCR de experimentos que usan cebadores que funcionan bien en la región VHS-2 TK-C.

La figura 2 muestra la electroforesis en gel de los productos de PCR para la región VHS TK-C.

La figura 3A muestra curvas de crecimiento de PCR de experimentos usando cebadores para la región VHS-1 TK-B. La figura 3B muestra curvas de crecimiento de PCR de experimentos usando cebadores para la región VHS-2 TK-B.

La figura 4 muestra la electroforesis en gel de los productos de PCR para la región VHS TK-B.

La figura 5 muestra curvas de crecimiento de tres ensayos de VHS-1, Pol-B, TK-A y TK-C a 10 pv (partículas de virus) por PCR.

La figura 6 muestra curvas de crecimiento de tres ensayos de VHS-2, gB3, Pol-B y TK-C a 10 pv (partículas de virus) por PCR.

La figura 7 muestra la sensibilidad analítica del ensayo de tres ensayos independientes de VHS-1 (Pol-B, TK-A y TK-C) mediante análisis de sondeo.

La figura 8 muestra la sensibilidad analítica del ensayo de tres ensayos independientes de VHS-2 (gB3, Pol-B y TK-C) mediante análisis de sondeo.

Las figuras 9A y 9B muestran una competencia de dianas con cebadores de PCR comunes en presencia de ambas dianas.

Las figuras 10A y 10B muestran una competencia de dianas con cebadores de PCR comunes individuales en presencia de ambas dianas.

Las figuras 11A y 11B muestran una competencia de dianas con cebadores de PCR específicos de tipo en presencia de ambas dianas.

Las figuras 12A y 12B muestran un análisis de reactividad cruzada del ensayo de VHS-1/2 de doble diana con plásmidos de VHS-1.

Las figuras 13A y 13B muestran un análisis de reactividad cruzada del ensayo de VHS-1/2 de doble diana con plásmidos de VHS-2.

La figura 14 muestra una tabla de reactividad cruzada del ensayo de VHS-1/2 con otros virus del herpes estrechamente relacionados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El diagnóstico de infecciones por VHS-1 y/o VHS-2 mediante amplificación de ácidos nucleicos proporciona un procedimiento para detectar infecciones víricas de forma rápida y precisa. En el presente documento, se describe un ensayo en tiempo real para detectar VHS-1/2 en una muestra. Se proporcionan cebadores y sondas para

detectar VHS-1/2, así como artículos de fabricación o kits que contienen dichos cebadores y sondas. La mayor sensibilidad de la PCR en tiempo real para la detección de VHS-1/2 en comparación con otros procedimientos, así como las características mejoradas de la PCR en tiempo real, incluyendo la contención de la muestra y la detección en tiempo real del producto amplificado, hacen factible la implementación de esta tecnología para el diagnóstico de rutina de infecciones por VHS-1/2 en el laboratorio clínico.

Los procedimientos pueden incluir realizar al menos una etapa de ciclado que incluye amplificar una o más partes de una diana génica de molécula de ácido nucleico de VHS-1 Pol y VHS-1 TK, y una o más partes de una diana génica de molécula de ácido nucleico de VHS-2 TK y VHS-2 gB a partir de una muestra usando una pluralidad de pares de cebadores, que incluyen cebadores de VHS-1 Pol V, cebadores de VHS-1 TK, cebadores de VHS-2 TK y cebadores de VHS-2 gB. "Cebadores de VHS-1 Pol", "cebador de VHS-1 TK", "cebador de VHS-2 TK" y "cebador de VHS-2 gB", como se usan en el presente documento, se refieren a cebadores oligonucleótidos que se aparean específicamente con secuencias de ácido nucleico que codifican VHS-1 Pol, VHS-1 TK, VHS-2 TK y VHS-2 gB, respectivamente, e inician la síntesis a partir de las mismas en condiciones apropiadas. Cada uno de los cebadores de VHS-1 y VHS-2 analizados se aparean con una diana en o adyacente a la molécula de ácido nucleico diana de VHS-1 Pol, VHS-1 TK, VHS-2 TK y VHS-2 gB de modo que al menos una parte de cada producto de amplificación contiene una secuencia de ácido nucleico correspondiente a la diana respectiva. El uno o más productos de amplificación de VHS-1 Pol, VHS-1 TK, VHS-2 TK y VHS-2 gB se producen siempre que uno o más ácidos nucleicos de VHS-1 Pol, VHS-1 TK, VHS-2 TK y VHS-2 gB estén presentes en la muestra, por tanto, la presencia de uno o más productos de amplificación de VHS-1 Pol, VHS-1 TK, VHS-2 TK y VHS-2 gB es indicativa de la presencia de ácidos nucleicos de VHS-1 y/o VHS-2 en la muestra. El producto de amplificación debe contener las secuencias de ácido nucleico que son complementarias de una o más sondas detectables para VHS-1 Pol, VHS-1 TK, VHS-2 TK y VHS-2 gB. Cada etapa de ciclado incluye una etapa de amplificación, una etapa de hibridación y una etapa de detección, en la que la muestra se pone en contacto con una o más sondas detectables para VHS-1 Pol, VHS-1 TK, VHS-2 TK y VHS-2 gB para la detección de la presencia o ausencia de VHS-1 y/o VHS-2 en la muestra. Los modos de realización de los procedimientos de detección de VHS-1/2 pueden detectar y discriminar ambos tipos de virus VHS-1 y VHS-2 en un único tubo de PCR y, además, pueden utilizar un enfoque de doble diana para la detección de dianas. Este enfoque de doble diana proporciona determinadas ventajas. Por ejemplo, se pueden dar mutaciones desconocidas en el cebador de VHS-1/2 y en los sitios de unión de la sonda, de modo que el rendimiento del ensayo de detección de VHS-1/2 podría verse potencialmente comprometido. Para minimizar dicho riesgo en los modos de realización de la presente divulgación, se seleccionan dos regiones génicas diferentes para que sean las dianas de PCR para cada uno de los tipos de virus VHS-1 y VHS-2, es decir, VHS-1 Pol y VHS-1 TK para VHS-1 y VHS-2 TK y VHS-2 gB para VHS-2. Debido a que la probabilidad de que se den mutaciones desconocidas en sitios de unión de cebador y sonda en dos regiones génicas diferentes al mismo tiempo es bastante baja, el rendimiento del ensayo de los procedimientos de detección de VHS-1/2 de doble diana reivindicados en el presente documento tiene menos probabilidades de verse afectado negativamente por mutaciones desconocidas.

Los procedimientos descritos en el presente documento pueden detectar simultáneamente tanto VHS-1 como VHS-2 y discriminarlos en una única reacción de PCR. Los procedimientos pueden hacer uso de cebadores y sondas específicos de tipo de virus que pueden evitar la competencia de dianas cuando coexisten tanto VHS-1 como VHS-2 en una única muestra, pero tienen diferentes concentraciones víricas. Los cebadores y las sondas usados para la detección de VHS-1/2 no tienen reactividad cruzada, no solamente entre los tipos de virus VHS-1 y VHS-2, sino también con otros virus de herpes estrechamente relacionados. Además, el enfoque de doble diana usado en los modos de realización de los presentes procedimientos de detección de VHS-1/2 puede minimizar el posible impacto negativo en el rendimiento del ensayo debido a mutaciones desconocidas en los sitios de unión del cebador y la sonda.

Como se usa en el presente documento, el término "amplificar" se refiere al procedimiento de síntesis de moléculas de ácido nucleico que son complementarias de una o ambas hebras de una molécula de ácido nucleico molde (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico de VHS-1 ADN Pol, VHS-1 TK, VHS-2 TK y VHS-2 gB). La amplificación de una molécula de ácido nucleico incluye típicamente desnaturalizar el ácido nucleico molde, aparear cebadores con el ácido nucleico molde a una temperatura que está por debajo de las temperaturas de fusión de los cebadores, y alargar enzimáticamente a partir de los cebadores para generar un producto de amplificación. La amplificación requiere típicamente la presencia de trifosfatos de desoxirribonucleósidos, una enzima ADN polimerasa (por ejemplo, Taq Platinum®) y un tampón apropiado y/o cofactores para la actividad óptima de la enzima polimerasa (por ejemplo, MgCl₂ y/o KCl).

El término "cebador" se usa en el presente documento como se conoce por los expertos en la técnica y se refiere a compuestos oligoméricos, principalmente a oligonucleótidos, pero también a oligonucleótidos modificados que pueden "cebar" la síntesis de ADN mediante una ADN polimerasa dependiente de molde, es decir, el extremo 3', por ejemplo, del oligonucleótido proporciona un grupo 3'-OH libre al que se pueden unir "nucleótidos" adicionales mediante una ADN polimerasa dependiente de molde que establece un enlace fosfodiéster 3' a 5' por la que se usan trifosfatos de desoxinucleósidos y por la que se libera pirofosfato. Por lo tanto, no hay ninguna diferencia fundamental entre un "cebador", un "oligonucleótido" o una "sonda" de acuerdo con la divulgación, excepto posiblemente por la función prevista. El término "hibridación" se refiere al apareamiento de una o más sondas con

un producto de amplificación. Las condiciones de hibridación incluyen típicamente una temperatura que está por debajo de la temperatura de fusión de las sondas, pero que evita la hibridación inespecífica de las sondas.

5 La expresión "actividad exonucleasa en dirección 5' a 3'" se refiere a una actividad de una polimerasa de ácido nucleico, típicamente asociada a la síntesis de la hebra de ácido nucleico, por la que los nucleótidos se eliminan del extremo 5' de la hebra de ácido nucleico.

10 La expresión "polimerasa termoestable" se refiere a una enzima polimerasa que es termoestable, es decir, la enzima cataliza la formación de productos de extensión de cebador complementarios de un molde y no se desnaturaliza irreversiblemente cuando se somete a las temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para efectuar la desnaturalización de ácidos nucleicos molde bicatenarios. En general, la síntesis se inicia en el extremo 3' de cada cebador y continúa en la dirección 5' a 3' a lo largo de la cadena del molde. Se han aislado polimerasas termoestables de *Thermus flavus*, *T. ruber*, *T. thermophilus*, *T. aquaticus*, *T. lacteus*, *T. rubens*, *Bacillus stearothermophilus* y *Methanothermus fervidus*. Sin embargo, las polimerasas que no son termoestables también se pueden emplear en ensayos de PCR siempre que se reponga la enzima.

15 La expresión "complemento del mismo" se refiere a un ácido nucleico que tiene la misma longitud y es exactamente complementario de un ácido nucleico dado.

20 El término "extensión" o "alargamiento", cuando se usa con respecto a ácidos nucleicos, se refiere a cuando se incorporan nucleótidos adicionales (u otras moléculas análogas) en los ácidos nucleicos. Por ejemplo, un ácido nucleico se extiende opcionalmente por un biocatalizador que incorpora nucleótidos, tal como una polimerasa que añade típicamente nucleótidos en el extremo terminal 3' de un ácido nucleico.

25 Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácido nucleico, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para la correspondencia máxima, por ejemplo, medida usando uno de los algoritmos de comparación de secuencias disponibles para los expertos o mediante inspección visual. Los algoritmos ilustrativos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los programas BLAST, que se describen, por ejemplo, en Altschul et al. (1990) "Basic local alignment search tool" J. Mol. Biol. 215:403-410, Gish et al. (1993) "Identification of protein coding regions by database similarity search" Nature Genet. 3:266-272, Madden et al. (1996) "Applications of network BLAST server" Meth. Enzymol. 266:131-141, Altschul et al. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs" Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, y Zhang et al. (1997) "PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation" Genome Res. 7:649-656.

30 Un "nucleótido modificado", en el contexto de un oligonucleótido, se refiere a una alteración en la que al menos un nucleótido de la secuencia oligonucleotídica se reemplaza por un nucleótido diferente que proporciona una propiedad deseada al oligonucleótido. Los nucleótidos modificados ejemplares que se pueden sustituir en los oligonucleótidos descritos en el presente documento incluyen, por ejemplo, una C5-metil-dC, una C5-etil-dC, una C5-metil-dU, una C5-etil-dU, una 2,6-diaminopurina, una C5-propinil-dC, una C5-propinil-dU, una C7-propinil-dA, una C7-propinil-dG, una C5-propargilamino-dC, una C5-propargilamino-dU, una C7-propargilamino-dA, una C7-propargilamino-dG, una 7-desaza-2-desoxixantósina, un análogo de pirazolopirimidina, una pseudo-dU, un nitropirrol, un nitroindol, 2'-O-metilribo-U, 2'-O-metilribo-C, una N4-etil-dC, una N6-metil-dA y similares. Muchos otros nucleótidos modificados que se pueden sustituir en los oligonucleótidos de la divulgación se mencionan en el presente documento o se conocen de otro modo en la técnica. En determinados modos de realización, las sustituciones de nucleótidos modificados modifican las temperaturas de fusión (T_m) de los oligonucleótidos con relación a las temperaturas de fusión de los oligonucleótidos no modificados correspondientes. Para ilustrar adicionalmente, determinadas sustituciones de nucleótidos modificados pueden reducir la amplificación de ácido nucleico inespecífica (por ejemplo, minimizar la formación de dímeros de cebadores o similares), aumentar el rendimiento de un amplicón diana deseado, y/o similares en algunos modos de realización de la invención. Los ejemplos de estos tipos de modificaciones de ácido nucleico se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 6.001.611.

55 **Ácidos nucleicos y oligonucleótidos de VHS-1 y VHS-2**

La divulgación proporciona procedimientos para detectar VHS-1 y/o VHS-2 amplificando, por ejemplo, una parte de una o más secuencias de ácido nucleico de VHS-1 Pol y VHS-1 TK, y secuencias de ácido nucleico de VHS-2 TK y VHS-2 gB. Las secuencias de ácido nucleico de VHS-1 y/o VHS-2 están disponibles (véanse, por ejemplo, los números de acceso en GenBank M10792 para VHS-1 Pol; J02224 para VHS-1 TK; HQ123137 para VHS-2 TK; y HM011358 para VHS-2 gB). Específicamente, los cebadores y sondas para amplificar y detectar dianas de molécula de ácido nucleico de VHS-1 Pol y VHS-1 TK, y dianas de molécula de ácido nucleico de VHS-2 TK y VHS-2 gB se proporcionan por los modos de realización de la presente divulgación. Para la detección de VHS-1 y/o VHS-2, se proporcionan cebadores y sondas para amplificar las secuencias de ácido nucleico de VHS-1 Pol y VHS-1 TK, y las moléculas de ácido nucleico de VHS-2 TK y VHS-2 gB. Los ácidos nucleicos de VHS-1/2 distintos de los ejemplificados en el presente documento también se pueden usar para detectar VHS-1/2 en una muestra.

Por ejemplo, los expertos en la técnica pueden evaluar la especificidad y/o sensibilidad de variantes funcionales usando procedimientos de rutina. Las variantes funcionales representativas pueden incluir, por ejemplo, una o más eliminaciones, inserciones y/o sustituciones en los ácidos nucleicos de VHS-1/2 divulgados en el presente documento. Más específicamente, los modos de realización de los oligonucleótidos de la presente divulgación incluyen, cada uno, un ácido nucleico con una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12, una variante sustancialmente idéntica de la misma en la que la variante tiene al menos, por ejemplo, un 80 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12, o un complemento de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 y la variante.

TABLA I: Cebadores y sonda de la ADN polimerasa de VHS-1

SEQ ID NO		SECUENCIA
1	Cebador directo (F11)	5'- GACAACCTCTGCCCGGCCATCAA -3'
2	Cebador inverso (R8)	5'-TCGCTGGATGTCCCGAAGGCCA -3'
3	Sonda	5'-CGGAACAACACGCTAGCCCAGCCGCGGGCC -3'

TABLA II: Cebadores y sonda de la timidina cinasa de VHS-1

SEQ ID NO		SECUENCIA
4	Cebador directo (F6)	5'- CGTCTTTATCCTGGATTACGACCAATC -3'
5	Cebador inverso (R5)	5'- GGTCGCAGATCGTCGGTATGGA -3'
6	Sonda	5'-CTGCAACTTACCTCCGGGATGGTCCAGACC -3'

TABLA III: Cebadores y sonda de la timidina cinasa de VHS-2

SEQ ID NO		SECUENCIA
7	Cebador directo (F5)	5'- TCCTTCCGATGCATCTATTTGTCC -3'
8	Cebador inverso (R6)	5'-ATGGACCCGGCGTTGTGA -3'
9	Sonda	5'-TTGCGCCTCACCGCCGGGATGATCCCAAC -3'

TABLA IV: Cebadores y sonda de la glucoproteína B de VHS-2

SEQ ID NO		SECUENCIA
10	Cebador directo (F7)	5'- CGCTACGTCCTGCAACTGCAAC -3'
11	Cebador inverso (R7)	5'- GGCCGACACCAAAGCCATATATCGGA -3'
12	Sonda	5'- TCCGCTCACCAACCAAGGAAGTCAAGACTTCCGACCC -3'

En un modo de realización de la divulgación, los cuatro conjuntos de cebadores y sondas de VHS-1 y/o VHS-2 descritos anteriormente se usan para proporcionar la detección de VHS-1 y/o VHS-2 en una muestra biológica sospechosa de contener VHS-1/2. Los conjuntos de cebadores y sondas pueden comprender o consistir en cebadores y sondas específicos para las secuencias de ácido nucleico de VHS-1 Pol y VHS-1 TK, y también las secuencias de ácido nucleico de VHS-2 TK y VHS-2 gB, que comprenden o consisten en las secuencias de ácido nucleico de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12. En otro modo de realización de la divulgación, los cebadores y sondas para las dianas de VHS-1 y VHS-1 comprenden o consisten en una variante funcionalmente activa de cualquiera de los cebadores de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12.

Una variante funcionalmente activa de cualquiera de los cebadores y/o sondas de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 se puede identificar usando los cebadores y/o sondas en el procedimiento divulgado. Una variante funcionalmente activa de un cebador y/o sonda de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 pertenece a un cebador que proporciona una especificidad y sensibilidad similares o mayores en el procedimiento o kit divulgado en comparación con la secuencia respectiva de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12.

La variante puede variar, por ejemplo, de la secuencia de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 en una o más adiciones, eliminaciones o sustituciones de nucleótidos, tal como una o más adiciones, eliminaciones o sustituciones de nucleótidos en el extremo 5' y/o en el extremo 3' de la secuencia respectiva de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12. Como se detalla anteriormente, un cebador (y/o sonda) se puede modificar químicamente, es decir, un cebador y/o una sonda pueden comprender un compuesto nucleotídico o no nucleotídico modificado. Una sonda (o un cebador) es entonces un oligonucleótido modificado. Los "nucleótidos

modificados" (o "análogos nucleotídicos") difieren de un "nucleótido" natural en alguna modificación, pero consisten todavía en una base o un compuesto de tipo base, un azúcar pentofuranosilo o un compuesto de tipo azúcar pentofuranosilo, una parte de fosfato o una parte de tipo fosfato, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, un "marcador" se puede unir a la parte de base de un "nucleótido", por lo que se obtiene un "nucleótido modificado".

5 Una base natural en un "nucleótido" también se puede remplazar por, por ejemplo, una 7-desazapurina, por lo que también se obtiene un "nucleótido modificado". Las expresiones "nucleótido modificado" o "análogo nucleotídico" se usan indistintamente en la presente solicitud. Un "nucleósido modificado" (o "análogo nucleosídico") difiere de un nucleósido natural en alguna modificación de la manera señalada anteriormente para un "nucleótido modificado" (o un "análogo nucleotídico").

10 Los oligonucleótidos que incluyen oligonucleótidos modificados y análogos oligonucleotídicos que amplifican una molécula de ácido nucleico que codifica las secuencias de ácido nucleico de VHS-1 Pol y VHS-1 TK, y las secuencias de ácido nucleico de VHS-2 TK y VHS-2 gB, por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican partes alternativas de VHS-1 Pol y VHS-1 TK, VHS-2 TK y VHS-2 gB se pueden diseñar usando, por ejemplo, un programa de ordenador tal como OLIGO (Molecular Biology Insights Inc., Cascade, Colorado). Las características importantes cuando se diseñan oligonucleótidos que se van a usar como cebadores de amplificación incluyen, pero no se limitan a, un producto de amplificación de tamaño apropiado para facilitar la detección (por ejemplo, mediante electroforesis), temperaturas de fusión similares para los miembros de un par de cebadores, y la longitud de cada cebador (es decir, los cebadores deben ser lo suficientemente largos para aparear con especificidad de

15 de secuencia y para iniciar la síntesis, pero no tan largos que se reduzca la fidelidad durante la síntesis de oligonucleótidos). Típicamente, los cebadores oligonucleotídicos tienen una longitud de 8 a 50 nucleótidos (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 o 50 nucleótidos de longitud).

20 Además de un conjunto de cebadores, los procedimientos de la divulgación pueden usar una o más sondas para detectar la presencia o ausencia de VHS-1 y/o VHS-2. El término "sonda" se refiere a ácidos nucleicos (ADN o ARN) producidos sintéticamente o biológicamente, que por diseño o selección contienen secuencias de nucleótidos específicas que les permiten hibridar en rigurosidades predeterminadas definidas específicamente (es decir, preferentemente) con "ácidos nucleicos diana", en el presente caso con un ácido nucleico (diana) de VHS-1 y/o VHS-2. Una "sonda" se puede denominar "sonda de detección", que significa que detecta el ácido nucleico diana.

25 En la presente divulgación, las sondas de VHS-1 y/o VHS-2 descritas se pueden marcar con al menos un marcador fluorescente. En un modo de realización, las sondas de VHS-1 y/o VHS-2 se pueden marcar con un resto fluorescente donador, por ejemplo, un tinte fluorescente y un resto fluorescente aceptador correspondiente, por ejemplo, un extintor.

30 En un modo de realización, las sondas comprenden o consisten en un resto fluorescente y las secuencias de ácido nucleico comprenden o consisten en las SEQ ID NO: 3, 6, 9 y 12 (mostradas sin el marcador).

35 El diseño de oligonucleótidos a usar como sondas de hibridación se puede realizar de manera similar al diseño de cebadores. Los modos de realización de la presente divulgación pueden usar una única sonda o un par de sondas para la detección del producto de amplificación. Dependiendo del modo de realización, el uso de la sonda o sondas puede comprender al menos un marcador y/o al menos un resto extintor. Al igual que con los cebadores, las sondas normalmente tienen temperaturas de fusión similares, y la longitud de cada sonda debe ser suficiente para que se dé la hibridación específica de secuencia, pero no tan larga como para que se reduzca la fidelidad durante la

40 síntesis. Las sondas oligonucleotídicas en general tienen de 15 a 30 (por ejemplo, 16, 18, 20, 21, 22, 23, 24 o 25) nucleótidos de longitud.

45 Las construcciones de la presente divulgación pueden incluir vectores que contienen, cada uno, una de una molécula de ácido nucleico de VHS-1 Pol, VHS-1 TK, VHS-2 TK y VHS-2 gB (por ejemplo, las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12). Las construcciones divulgadas se pueden usar, por ejemplo, como moléculas de ácido nucleico molde de control. Los vectores adecuados para su uso en la presente divulgación están comercialmente disponibles y/o se producen por procedimientos de la tecnología de ácidos nucleicos recombinantes de rutina en la técnica. Las moléculas de ácido nucleico de VHS-1 y/o VHS-2 se puede obtener, por ejemplo, mediante síntesis química, clonación directa a partir de VHS-1 y VHS-2, o mediante amplificación por PCR.

50 Las construcciones adecuadas para su uso en los procedimientos divulgados incluyen típicamente, además de las moléculas de ácido nucleico VHS-1 y/o VHS-2 (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que contiene una o más secuencias de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12), secuencias que codifican un marcador de selección (por ejemplo, un gen de resistencia a antibiótico) para seleccionar constructos y/o transformantes deseados, y un origen de replicación. La elección de los sistemas de vectores habitualmente depende de varios factores, que incluyen, pero sin limitación, la elección de las células huésped, la eficacia de la replicación, la capacidad de selección, la capacidad de inducción y la facilidad de recuperación. Los constructos divulgados que contienen moléculas de ácido nucleico de VHS-1 y/o VHS-2 se pueden propagar en una célula huésped. Como se usa en el presente documento, la expresión célula huésped pretende incluir procariontas y eucariotas tales como células de levaduras, de plantas y de animales. Los huéspedes procariontas pueden incluir *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis*. Los huéspedes eucariotas incluyen levaduras tales como *S.*

cerevisiae, *S. pombe*, *Pichia pastoris*, células de mamífero tales como células COS o células de ovario de hámster chino (CHO), células de insecto y células de plantas tales como *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum*. Se puede introducir un constructo de la divulgación en una célula huésped usando cualquiera de las técnicas comúnmente conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la precipitación con fosfato de calcio, la electroporación, el choque térmico, la lipofección, la microinyección y la transferencia de ácidos nucleicos mediada por virus son procedimientos comunes para introducir ácidos nucleicos en células huésped. Además, se puede administrar ADN desnudo directamente a las células (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.580.859 y 5.589.466).

10 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las patentes de los EE. UU. n.º 4.683.202, 4.683.195, 4.800.159 y 4.965.188 divulgan técnicas de PCR convencionales. La PCR emplea típicamente dos cebadores oligonucleotídicos que se unen a un molde de ácido nucleico seleccionado (por ejemplo, ADN o ARN). Los cebadores útiles en los modos de realización de la presente divulgación incluyen oligonucleótidos que pueden actuar como un punto de iniciación de la síntesis de ácido nucleico dentro de las secuencias de ácido nucleico de VHS-1/2 descritas (por ejemplo, las SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 y 11). Un cebador se puede purificar a partir de un hidrolizado de restricción mediante procedimientos convencionales, o se puede producir sintéticamente. El cebador es preferentemente monocatenario para una máxima eficacia en la amplificación, pero el cebador puede ser bicatenario. Los cebadores bicatenarios se desnaturalizan primero, es decir, se tratan para separar las hebras. Un procedimiento para desnaturalizar ácidos nucleicos bicatenarios es mediante calentamiento.

Si el ácido nucleico molde es bicatenario, es necesario separar las dos hebras antes de que se pueda usar como molde en la PCR. La separación de hebras se puede conseguir mediante cualquier procedimiento de desnaturalización adecuado incluyendo medios físicos, químicos o enzimáticos. Un procedimiento para separar las hebras de ácido nucleico implica calentar el ácido nucleico hasta que se desnaturaliza predominantemente (por ejemplo, se desnaturaliza más de un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 %). Las condiciones de calentamiento necesarias para desnaturalizar el ácido nucleico molde dependerán, por ejemplo, de la concentración de sal de tampón y de la longitud y composición de nucleótidos de los ácidos nucleicos que se van a desnaturalizar, pero típicamente varían de aproximadamente 90 °C a aproximadamente 105 °C durante un tiempo que depende de características de la reacción tales como la temperatura y la longitud del ácido nucleico. La desnaturalización se realiza típicamente durante aproximadamente 30 s a 4 min (por ejemplo, de 1 min a 2 min 30 s, o 1,5 min).

Si el ácido nucleico molde bicatenario se desnaturaliza mediante calor, la mezcla de reacción se deja enfriar hasta una temperatura que promueva el apareamiento de cada cebador con su secuencia diana en las moléculas de ácido nucleico de VHS-1/2 descritas. La temperatura para el apareamiento es normalmente de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 65 °C (por ejemplo, de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 60 °C; de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 50 °C). Los tiempos de apareamiento pueden ser de aproximadamente 10 s a aproximadamente 1 min (por ejemplo, de aproximadamente 20 s a aproximadamente 50 s; de aproximadamente 30 s a aproximadamente 40 s). La mezcla de reacción se ajusta entonces a una temperatura a la que se promueve u optimiza la actividad de la polimerasa, es decir, una temperatura suficiente para que se dé la extensión del cebador apareado para generar productos complementarios del ácido nucleico molde. La temperatura debe ser suficiente para sintetizar un producto de extensión a partir de cada cebador que se aparea con un molde de ácido nucleico, pero no debe ser tan alta como para desnaturalizar un producto de extensión de su molde complementario (por ejemplo, la temperatura para extensión varía en general de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 80 °C (por ejemplo, de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C; aproximadamente 60 °C). Los tiempos de extensión pueden ser de aproximadamente 10 s a aproximadamente 5 min (por ejemplo, de aproximadamente 30 s a aproximadamente 4 min; de aproximadamente 1 min a aproximadamente 3 min; de aproximadamente 1 min 30 s a aproximadamente 2 min).

Los ensayos de PCR pueden emplear ácido nucleico VHS-1/2 tal como ARN o ADN (ADNc). El ácido nucleico molde no tiene que estar purificado; puede ser una fracción menor de una mezcla compleja, tal como ácido nucleico de VHS-1/2 contenido en células humanas. Las moléculas de ácido nucleico de VHS-1/2 se pueden extraer de una muestra biológica mediante técnicas de rutina tales como las descritas en *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications* (Persing et al. (eds), 1993, American Society for Microbiology, Washington D.C.). Los ácidos nucleicos se pueden obtener a partir de muchísimas fuentes, tales como plásmidos, o fuentes naturales que incluyen bacterias, levaduras, virus, orgánulos u organismos superiores tales como plantas o animales.

Los cebadores oligonucleotídicos (por ejemplo, las SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10 y 11) se combinan con reactivos de PCR en condiciones de reacción que inducen la extensión del cebador. Por ejemplo, las reacciones de extensión de cadena típicamente incluyen KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), MgCl₂ 15 mM, gelatina al 0,001 % (p/v), 0,5-1,0 µg de ADN molde desnaturalizado, 50 pmoles de cada cebador oligonucleotídico, 2,5 U de polimerasa Taq y DMSO al 10 %. Las reacciones contienen normalmente de 150 a 320 µM de cada uno de dATP, dCTP, dTTP, dGTP, o uno o más análogos de los mismos.

Las hebras recién sintetizadas forman una molécula bicatenaria que se puede usar en las sucesivas etapas de la reacción. Las etapas de separación, apareamiento y alargamiento de la hebra se pueden repetir con tanta frecuencia como sea necesario para producir la cantidad deseada de productos de amplificación correspondientes a las moléculas de ácido nucleico diana de VHS-1/2. Los factores limitantes en la reacción son las cantidades de cebadores, de enzima termoestable y de trifosfatos de nucleósidos presentes en la reacción. Las etapas de ciclado (es decir, desnaturalización, apareamiento y extensión) se repiten preferentemente al menos una vez. Para el uso en la detección, el número de etapas de ciclado dependerá, por ejemplo, de la naturaleza de la muestra. Si la muestra es una mezcla compleja de ácidos nucleicos, se requerirán más etapas de ciclado para amplificar la secuencia diana suficientemente para la detección. En general, las etapas de ciclado se repiten al menos aproximadamente 20 veces, pero se pueden repetir hasta 40, 60 o incluso 100 veces.

Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET)

La tecnología FRET (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 4.996.143, 5.565.322, 5.849.489 y 6.162.603) se basa en el concepto de que cuando un resto fluorescente donador y un resto fluorescente aceptador correspondiente están situados a una determinada distancia entre sí, tiene lugar la transferencia de energía entre los dos restos fluorescentes, que se pueden visualizar o detectar y/o cuantificar de otro modo. El donador transfiere típicamente la energía al aceptador cuando se excita el donador mediante radiación de luz con una longitud de onda adecuada. El aceptador reemite típicamente la energía transferida en forma de radiación de luz con una longitud de onda diferente.

En un ejemplo, una sonda oligonucleotídica puede contener un resto fluorescente donador y un extintor correspondiente, que disipa la energía transferida en una forma distinta de la luz. Cuando la sonda está intacta, la transferencia de energía se da típicamente entre los dos restos fluorescentes, de manera que la emisión fluorescente desde el resto fluorescente donador se extingue. Durante una etapa de extensión de una reacción en cadena de la polimerasa, se escinde una sonda unida a un producto de amplificación mediante la actividad exonucleasa en dirección 5' a 3' de, por ejemplo, una polimerasa Taq de manera que la emisión fluorescente del resto fluorescente donador ya no se extingue. Las sondas a modo de ejemplo para este fin se describen, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 5.210.015, 5.994.056 y 6.171.785. Los pares de donador-aceptador usados comúnmente incluyen el par FAM-TAMRA. Los extintores usados comúnmente son DABCYL y TAMRA. Los extintores oscuros usados comúnmente incluyen BlackHole Quencher™ (BHQ), (Biosearch Technologies, Inc., Novato, Cal.), Iowa Black™ (Integrated DNA Tech., Inc., Coralville, Iowa), BlackBerry™ Quencher 650 (BBQ-650) (Berry & Assoc., Dexter, Mich.).

En otro ejemplo, dos sondas oligonucleotídicas, que contienen, cada una, un resto fluorescente, pueden hibridar con un producto de amplificación en posiciones particulares determinadas por la complementariedad de las sondas oligonucleotídicas con la secuencia de ácido nucleico diana de VHS-1/2. Tras la hibridación de las sondas oligonucleotídicas con el ácido nucleico del producto de amplificación en las posiciones apropiadas, se genera una señal de FRET.

Las temperaturas de hibridación pueden variar de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 65 °C durante de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 1 minuto.

El análisis fluorescente se puede llevar a cabo usando, por ejemplo, un sistema de microscopio epifluorescente de recuento de fotones (que contiene el espejo dicróico apropiado y filtros para controlar la emisión fluorescente en el intervalo particular), un sistema fotomultiplicador de recuento de fotones o un fluorímetro. La excitación para iniciar la transferencia de energía se puede llevar a cabo con un láser de iones de argón, una lámpara de arco de mercurio (Hg) de alta intensidad, una fuente de luz de fibra óptica u otra fuente de luz de alta intensidad filtrada apropiadamente para la excitación en el intervalo deseado.

Como se usa en el presente documento con respecto a los restos fluorescentes donadores y aceptadores correspondientes, "correspondiente" se refiere a un resto fluorescente aceptador que tiene un espectro de emisión que se superpone al espectro de excitación del resto fluorescente donador. El máximo de longitud de onda del espectro de emisión del resto fluorescente aceptador debe ser al menos 100 nm mayor que el máximo de longitud de onda del espectro de excitación del resto fluorescente donador. En consecuencia, se puede producir una transferencia de energía no radiativa eficaz entre ellos.

Los restos fluorescentes donadores y aceptadores correspondientes se eligen en general para (a) transferencia de energía de Forster de alta eficacia; (b) un gran desplazamiento de Stokes final (>100 nm); (c) desplazamiento de la emisión lo más lejos posible hacia la parte roja del espectro visible (>600 nm); y (d) desplazamiento de la emisión a una longitud de onda más alta que la emisión fluorescente de agua Raman producida por excitación en la longitud de onda de excitación del donador. Por ejemplo, se puede elegir un resto fluorescente donador que tenga su máximo de excitación cerca de una línea de láser (por ejemplo, Helio-Cadmio 442 nm o Argón 488 nm), un alto coeficiente de extinción, un alto rendimiento cuántico y una buena superposición de su emisión fluorescente con el espectro de excitación del resto fluorescente aceptador correspondiente. Se puede elegir un resto fluorescente aceptador correspondiente que tenga un alto coeficiente de extinción, un alto rendimiento cuántico, una buena

superposición de su excitación con la emisión del resto fluorescente donador, y emisión en la parte roja del espectro visible (>600 nm).

Los restos fluorescentes donadores representativos que se pueden usar con diversos restos fluorescentes aceptadores en la tecnología FRET incluyen fluoresceína, amarillo Lucifer, B-ficoeritrina, isotiocianato de 9-acridina, amarillo Lucifer VS, ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico, 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina, 1-pirenobutirato de succinimidilo y derivados del ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico. Los restos fluorescentes aceptadores representativos, dependiendo del resto fluorescente donador usado, incluyen rojo LC 640, rojo LC 705, Cy5, Cy5.5, cloruro de sulfonilo de lisamina rodamina B, isotiocianato de tetrametilrodamina, isotiocianato de rodamina x, isotiocianato de eritrosina, fluoresceína, pentaacetato de dietilentriamina u otros quelatos de iones de lantánido (por ejemplo, europio o terbio). Se pueden obtener restos fluorescentes donadores y aceptadores, por ejemplo, de Molecular Probes (Junction City, Oreg.) o Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.).

Los restos fluorescentes donadores y aceptadores se pueden unir al oligonucleótido sonda apropiado a través de una sección conectora. La longitud de cada sección conectora es importante, ya que las secciones conectoras afectarán a la distancia entre los restos fluorescentes donadores y aceptadores. La longitud de una sección conectora para el propósito de la presente divulgación es la distancia en Angstroms (Å) desde la base nucleotídica al resto fluorescente. En general, una sección conectora tiene de aproximadamente 10 Å a aproximadamente 25 Å. La sección conectora puede ser del tipo descrito en el documento WO 84/03285. El documento WO 84/03285 también divulga procedimientos para unir secciones conectoras a una base nucleotídica particular, y también para unir restos fluorescentes a una sección conectora. Un resto fluorescente aceptador, tal como un éster de NHS de rojo LC 640, se puede combinar con C6-fosforamiditas (disponibles de ABI (Foster City, Calif.) o Glen Research (Sterling, Va.)) para producir, por ejemplo, rojo LC 640-fosforamidita. Los conectores usados con frecuencia para acoplar un resto fluorescente donador, tal como fluoresceína, a un oligonucleótido incluyen conectores de tiourea (derivados de FITC, por ejemplo, fluoresceína-CPG de Glen Research o ChemGene (Ashland, Mass.)), conectores de amida (derivados de éster de NHS de fluoresceína, tal como fluoresceína-CPG de BioGenex (San Ramon, Calif.)) o 3'-amino-CPG que requieren el acoplamiento de un éster de NHS de fluoresceína después de la síntesis de los oligonucleótidos.

Detección de virus 1 y/o 2 del herpes simple

La presente divulgación proporciona procedimientos para detectar la presencia o ausencia de VHS-1 y/o VHS-2 en una muestra biológica o no biológica. Los procedimientos proporcionados por la divulgación evitan problemas de contaminación de la muestra, negativos falsos y positivos falsos. Los procedimientos incluyen realizar al menos una etapa de ciclado que incluye amplificar una parte de moléculas de ácido nucleico diana de VHS-1 y/o VHS-2 de una muestra usando una pluralidad de pares de cebadores de VHS-1 Pol, VHS-1 TK, VHS-2 TK y VHS-2 gB, y una etapa de detección de FRET. Se realizan múltiples etapas de ciclado, preferentemente en un termociclador. Los procedimientos de la divulgación se pueden realizar usando los cebadores y sondas de VHS-1 y VHS-2 para detectar la presencia de VHS-1 y/o VHS-2, y la detección de VHS-1 y/o VHS-2 indica la presencia de VHS-1 y/o VHS-2 en la muestra.

Como se describe en el presente documento, los productos de amplificación se pueden detectar usando sondas de hibridación marcadas que aprovechan la tecnología FRET. Un formato FRET utiliza la tecnología TaqMan® para detectar la presencia o ausencia de un producto de amplificación y, por tanto, la presencia o ausencia de VHS-1 y/o VHS-2. La tecnología TaqMan® utiliza una sonda de hibridación monocatenaria marcada con dos restos fluorescentes. Cuando se excita un primer resto fluorescente con luz de una longitud de onda adecuada, la energía absorbida se transfiere a un segundo resto fluorescente de acuerdo con los principios de FRET. El segundo resto fluorescente es, en general, una molécula extintora. Durante la etapa de apareamiento de la reacción de PCR, la sonda de hibridación marcada se une al ADN diana (es decir, el producto de amplificación) y se degrada mediante la actividad exonucleasa en dirección 5' a 3' de la polimerasa Taq durante la fase de alargamiento posterior. Como resultado, el resto fluorescente excitado y el resto extintor se separan espacialmente entre sí. Como consecuencia, tras la excitación del primer resto fluorescente en ausencia del extintor, se puede detectar la emisión de fluorescencia del primer resto fluorescente. A modo de ejemplo, un sistema de detección de secuencias ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) usa la tecnología TaqMan®, y es adecuado para realizar los procedimientos descritos en el presente documento para detectar la presencia o ausencia de VHS-1 y/o VHS-2 en la muestra.

Las balizas moleculares conjuntamente con FRET también se pueden usar para detectar la presencia de un producto de amplificación usando los procedimientos de PCR en tiempo real de la divulgación. La tecnología de baliza molecular usa una sonda de hibridación marcada con un primer resto fluorescente y un segundo resto fluorescente. El segundo resto fluorescente es, en general, un extintor, y los marcadores fluorescentes están situados típicamente en cada extremo de la sonda. La tecnología de baliza molecular usa un oligonucleótido sonda que tiene secuencias que permiten la formación de estructura secundaria (por ejemplo, una horquilla). Como resultado de la formación de estructura secundaria dentro de la sonda, ambos restos fluorescentes están en proximidad espacial cuando la sonda está en solución. Después de la hibridación con los ácidos nucleicos diana (es decir, productos de amplificación), la estructura secundaria de la sonda se altera y los restos fluorescentes se

separan unos de otros de manera que, después de la excitación con luz de una longitud de onda adecuada, se puede detectar la emisión del primer resto fluorescente.

Otro formato común de la tecnología FRET utiliza dos sondas de hibridación. Cada sonda se puede marcar con un resto fluorescente diferente y, en general, se diseñan para hibridar en estrecha proximidad entre sí en una molécula de ADN diana (por ejemplo, un producto de amplificación). Un resto fluorescente donador, por ejemplo, fluoresceína, se excita a 470 nm mediante la fuente de luz del instrumento LightCycler®. Durante FRET, la fluoresceína transfiere su energía a un resto fluorescente aceptador tal como Red 640 de LightCycler® (rojo LC 640) o Red 705 de LightCycler® (rojo LC 705). El resto fluorescente aceptador emite entonces luz de una longitud de onda más larga, que se detecta por el sistema de detección óptica del instrumento LightCycler®. La FRET eficaz puede tener lugar únicamente cuando los restos fluorescentes están en proximidad local directa y cuando el espectro de emisión del resto fluorescente donador se superpone con el espectro de absorción del resto fluorescente aceptador. La intensidad de la señal emitida se puede correlacionar con el número de moléculas de ADN diana originales (por ejemplo, el número de genomas de VHS-1/2). Si se da la amplificación de ácido nucleico diana de VHS-1/2 y se produce un producto de amplificación, la etapa de hibridación da como resultado una señal detectable basada en FRET entre los miembros del par de sondas.

En general, la presencia de FRET indica la presencia de VHS-1 y/o VHS-2 en la muestra, y la ausencia de FRET indica la ausencia de VHS-1 y/o VHS-2 en la muestra. Sin embargo, la recogida inadecuada de muestras, los retrasos en el transporte, las condiciones de transporte inapropiadas o el uso de determinados hisopos de recogida (alginato de calcio o varilla de aluminio) son todas condiciones que pueden afectar al éxito y/o la exactitud del resultado de la prueba. Usando los procedimientos divulgados en el presente documento, la detección de FRET en, por ejemplo, 45 etapas de ciclado es indicativa de una infección por VHS-1 y/o VHS-2.

Las muestras biológicas representativas que se pueden usar en la práctica de los procedimientos divulgados incluyen, pero no se limitan a hisopos dérmicos, hisopos nasales, hisopos de heridas, hemocultivos, piel e infecciones de tejidos blandos. Los procedimientos de recogida y almacenamiento de muestras biológicas se conocen por los expertos en la técnica. Las muestras biológicas se pueden procesar (por ejemplo, mediante procedimientos y/o kits de extracción de ácido nucleico conocidos en la técnica) para liberar el ácido nucleico de VHS-1/2 o, en algunos casos, la muestra biológica se puede poner en contacto directamente con los componentes de reacción de PCR y los oligonucleótidos apropiados.

El análisis de la curva de fusión es una etapa adicional que se puede incluir en un perfil de ciclado. El análisis de la curva de fusión se basa en el hecho de que el ADN se funde a una temperatura característica llamada temperatura de fusión (T_m), que se define como la temperatura a la que la mitad de las dobles hebras de ADN se han separado en hebras individuales. La temperatura de fusión de un ADN depende principalmente de su composición de nucleótidos. Por tanto, las moléculas de ADN ricas en nucleótidos G y C tienen una T_m mayor que las que tienen una abundancia de nucleótidos A y T. Al detectar la temperatura a la que se pierde la señal, se puede determinar la temperatura de fusión de las sondas. De forma similar, detectando la temperatura a la que se genera la señal, se puede determinar la temperatura de apareamiento de las sondas. La temperatura o temperaturas de fusión de las sondas de VHS-1 y VHS-2 de los productos de amplificación de VHS-1 y/o VHS-2 pueden confirmar la presencia o ausencia de VHS-1 y/o VHS-2 en la muestra.

Dentro de cada serie de procesamiento del termociclador, se ciclan también muestras de control. Las muestras de control positivo pueden amplificar el molde de control de ácido nucleico de VHS-1/2 (distinto de los productos de amplificación descritos de genes diana) usando, por ejemplo, cebadores de control y sondas de control. Las muestras de control positivo también pueden amplificar, por ejemplo, una construcción plasmídica que contiene moléculas de ácido nucleico de VHS-1/2. Dicho control de plásmido se puede amplificar internamente (por ejemplo, dentro de la muestra) o en una muestra separada, procesada en paralelo con las muestras de los pacientes. Cada serie de procesamiento del termociclador también puede incluir un control negativo que, por ejemplo, carece de ADN molde de VHS-1/2. Dichos controles son indicadores del éxito o fracaso de la amplificación, hibridación y/o reacción de FRET. Por lo tanto, las reacciones de control pueden determinar fácilmente, por ejemplo, la capacidad de los cebadores de aparearse con especificidad de secuencia e iniciar el alargamiento, así como la capacidad de las sondas de hibridar con especificidad de secuencia y para que se dé FRET.

En un modo de realización, los procedimientos de la divulgación incluyen etapas para evitar la contaminación. Por ejemplo, se describe un procedimiento enzimático que utiliza uracil-ADN glucosilasa en las patentes de EE. UU. n.º 5.035.996, 5.683.896 y 5.945.313 para reducir o eliminar la contaminación entre una serie de procesamiento del termociclador y la siguiente.

Los procedimientos de PCR convencionales junto con la tecnología FRET se pueden usar para poner en práctica los procedimientos divulgados. En un modo de realización, se usa un instrumento LightCycler®. Las siguientes solicitudes de patente describen la PCR en tiempo real usada en la tecnología LightCycler®: WO 97/46707, WO 97/46714 y WO 97/46712.

El LightCycler® se puede manejar usando una estación de trabajo para PC y puede utilizar un sistema operativo Windows NT. Las señales de las muestras se obtienen a medida que la máquina sitúa los capilares secuencialmente sobre la unidad óptica. El programa informático puede exhibir las señales de fluorescencia en tiempo real inmediatamente después de cada medición. El tiempo de adquisición fluorescente es de 10-100 milisegundos (ms). Después de cada etapa de ciclado, se puede actualizar continuamente una exhibición cuantitativa de la fluorescencia frente al número de ciclo para todas las muestras. Los datos generados se pueden almacenar para un análisis posterior.

Como una alternativa a FRET, se puede detectar un producto de amplificación usando un tinte de unión a ADN bicatenario tal como un tinte fluorescente de unión a ADN (por ejemplo, verde SYBR® u oro SYBR® (Molecular Probes)). Tras la interacción con el ácido nucleico bicatenario, dichos tintes fluorescentes de unión a ADN emiten una señal fluorescente después de la excitación con luz a una longitud de onda adecuada. También se puede usar un tinte de unión a ADN bicatenario, tal como un tinte de intercalación de ácido nucleico. Cuando se usan tintes de unión a ADN bicatenario, habitualmente se realiza un análisis de curva de fusión para confirmar la presencia del producto de amplificación.

Se entiende que los modos de realización de la presente divulgación no están limitados por la configuración de uno o más instrumentos disponibles comercialmente.

Artículos de fabricación/kits

Los modos de realización de la presente divulgación proporcionan además artículos de fabricación o kits para detectar VHS-1 y/o VHS-2. Un artículo de fabricación puede incluir cebadores y sondas usados para detectar VHS-1 y/o VHS-2, junto con materiales de envasado adecuados. Los cebadores y sondas representativos para la detección de VHS-1 y/o VHS-2 pueden hibridar con moléculas de ácido nucleico diana de VHS-1 y/o VHS-2. Además, los kits también pueden incluir reactivos y materiales adecuadamente envasados necesarios para la inmovilización, hibridación y detección de ADN, tales como soportes sólidos, tampones, enzimas y patrones de ADN. Los procedimientos para diseñar cebadores y sondas se describen en el presente documento, y se proporcionan ejemplos representativos de cebadores y sondas que amplifican e hibridan con moléculas de ácido nucleico diana de VHS-1 y/o VHS-2.

Los artículos de fabricación de la divulgación también pueden incluir uno o más restos fluorescentes para marcar las sondas o, de forma alternativa, las sondas suministradas con el kit pueden estar marcadas. Por ejemplo, un artículo de fabricación puede incluir un resto fluorescente donador y/o uno aceptador para marcar las sondas de VHS-1 y/o VHS-2. Anteriormente se proporcionan ejemplos de restos fluorescentes donadores de FRET adecuados y restos fluorescentes aceptadores correspondientes.

Los artículos de fabricación también pueden contener un prospecto o ficha técnica que contiene instrucciones para usar los cebadores y sondas de VHS-1 y/o VHS-2 para detectar VHS-1 y/o VHS-2 en una muestra. Los artículos de fabricación pueden incluir adicionalmente reactivos para llevar a cabo los procedimientos divulgados en el presente documento (por ejemplo, tampones, enzimas polimerasas, cofactores o agentes para prevenir la contaminación). Dichos reactivos pueden ser específicos para uno de los instrumentos disponibles comercialmente descritos en el presente documento.

Los modos de realización de la presente divulgación se describirán con más detalle en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Se proporcionan los siguientes ejemplos y figuras para ayudar al entendimiento de la presente divulgación, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLO I

Determinación de regiones diana de PCR de VHS y diseño de cebadores y sondas de VHS

El VHS-1 se secuenció por completo en 1988 (McGeoch et al., J. Gen. Virol. 1988 Jul; 69 (Pt 7): 1531-74) y el VHS-2 se secuenció en 1998 (Dolan, et al., J Virol. 1998 Mar; 72 (3): 2010-21). Los dos virus del herpes más cercanos comparten la misma estructura genómica y el número de genes. El VHS-1 tiene un contenido de G+C de un 68,3 %, mientras que el VHS-2 tiene un contenido de G+C de un 70,4 %, ligeramente superior. Sin embargo, sus regiones no codificantes (R_L y R_S; ~72-80 %) tienen porcentajes mucho más altos de contenido de G+C que en las regiones codificantes (U_L y U_S; ~64-69 %). Las secuencias homólogas entre los dos tipos de virus varían entre las regiones. Por ejemplo, las regiones R_L y R_S tienen secuencias más diversas, mientras que las regiones U_L y U_S comparten secuencias de alta homología (83 %).

Hay una serie de criterios para la selección de regiones diana de PCR. En primer lugar, es ideal tener un contenido equilibrado de G+C (~50 %) en regiones diana, de manera que sean fácilmente accesibles para unirse a los

cebadores de PCR, así como para la amplificación, particularmente cuando las condiciones de termociclado de PCR se fijan a temperaturas relativamente bajas. En segundo lugar, es preferente disponer de un número relativamente grande de secuencias diana publicadas en dominios públicos para lograr la máxima inclusividad del ensayo. En tercer lugar, dependiendo de los requisitos del ensayo, se deben seleccionar regiones de alta homología cuando se requiere un ensayo para cubrir diferentes genotipos o cepas, mientras que las regiones de baja homología se deben usar cuando se requiere un ensayo para discriminar diferentes genotipos o cepas.

El nuevo ensayo de PCR de VHS requiere la amplificación de los tipos de VHS-1 y VHS-2 y su distinción en una única reacción de PCR. Por lo tanto, los genes o regiones abordados por PCR deben tener un bajo porcentaje de contenido de G+C, lo que no es fácil de encontrar debido al alto porcentaje de contenido de G+C en los genomas de VHS-1/2. Además, la homología de secuencia entre tipos de virus en los genes o regiones diana debe ser baja, lo que permite el diseño de cebadores y sondas específicos de tipo sin reactividad cruzada. Desafortunadamente, aunque algunos de los genes o regiones en los genomas de VHS tienen un bajo porcentaje de contenido de G+C, siempre comparten secuencias de alta homología entre los dos tipos de virus. Por lo tanto, se debe considerar un equilibrio cuidadoso entre los dos requisitos al seleccionar las dianas de PCR del VHS. Basándose en esas consideraciones, se seleccionan tres genes de VHS como genes diana de PCR, glucoproteína B (gB, UL27), ADN polimerasa (Pol, UL30) y timidina cinasa (TK, UL23). Esos genes se encuentran en la región UL.

Aunque los tres genes diana tienen porcentajes relativamente bajos de contenido de G+C, el contenido de G+C no está distribuido uniformemente en sus secuencias. Por lo tanto, debido a las altas homologías de secuencia entre los dos tipos de virus, se examinaron cuidadosamente las secuencias génicas completas para ambos tipos de virus VHS para las regiones diana potenciales de PCR. Además, se evitaron las regiones con tramos de G o C debido a la posible reactividad cruzada del cebador y la dificultad técnica para la síntesis de oligonucleótidos.

Las estructuras secundarias pueden afectar a la eficacia de la amplificación. Por lo tanto, la posible formación de estructura secundaria de todas las regiones seleccionadas se simuló usando un programa de modelado de PCR (Visual OMPTM, DNA Software, Inc., 334 East Washington Street, Ann Arbor, Michigan 48104) en las condiciones de PCR propuestas. Algunas regiones, tales como gB5, Pol-C, TK-A y TK-B, tienen estructuras de horquilla extensas, que pueden ocultar las posibles dificultades para la amplificación.

Después de la selección de las regiones diana potenciales de PCR en los tres genes de VHS, se diseñaron cuidadosamente los cebadores y sondas de PCR. Hay dos enfoques diferentes para diseñar cebadores y sondas para amplificar ambos tipos de VHS y distinguirlos en una única reacción de PCR. Una es diseñar cebadores y sondas de PCR totalmente independientes y específicos para cada tipo de virus VHS. La ventaja de este enfoque es que la amplificación por PCR y la detección son muy específicas para cada tipo. Sin embargo, necesita muchos más cebadores en la reacción de PCR, lo que es particularmente cierto para un ensayo de PCR de diana doble. Otro enfoque es diseñar cebadores comunes para amplificar ambos tipos de virus, pero tener sondas específicas de tipo de virus para detectar y distinguir ambos tipos de virus. Este enfoque requiere menos cebadores de PCR, pero puede causar problemas de competencia. Cuando se diseñaron los cebadores y sondas de VHS, se usaron ambos enfoques.

Se diseñó y evaluó un total de más de 160 cebadores y sondas. Para el enfoque específico del tipo de virus, siempre que fue posible, los cebadores y las sondas se diseñaron en las ubicaciones en las que estaban presentes la mayoría de las faltas de coincidencia entre los tipos de virus, mientras que para el enfoque de cebador común, los cebadores se colocaron en secuencias homólogas entre los dos tipos de virus y las sondas se colocaron en secuencias heterólogas. Para maximizar la capacidad de discriminar entre VHS-1 y VHS-2, las faltas de coincidencia en los cebadores se colocaron cerca de los extremos 3', mientras que las faltas de coincidencia en las sondas se colocaron entre tintes indicadores y extintores. El diseño de un nuevo cebador y sonda se realizó mediante un procedimiento manual para maximizar el número de faltas de coincidencia en cebadores y sondas entre los tipos de virus. Para mejorar la especificidad de amplificación, se añadió un grupo alquilo tal como un resto t-butil-bencilo a uno o más nucleótidos (normalmente nucleótido A o C en o cerca del extremo 3' de los cebadores). Para facilitar la identificación de VHS-1 y VHS-2, las sondas específicas de virus se marcan con diferentes tintes indicadores fluorescentes (FAM para VHS-1 y HEX para VHS-2) junto con el tinte extintor no fluorescente BHQ-2 o RDQ-2.

EJEMPLO II

Selección de cebadores y sondas de VHS

Se diseñaron múltiples cebadores y sondas en cada región y todos ellos se cribaron y evaluaron en un sistema limpio usando ADN genómico de longitud completa extraído de virus VHS cultivados e inactivados por calor. Además, se usó un ensayo de VHS previo como control. Los criterios para seleccionar cebadores y sondas incluyen valores de Ct tempranos, aumentos de fluorescencia elevados y productos de amplificación por PCR específicos sin amplificaciones inespecíficas. Las figuras 1A y 1B presentan un ejemplo de selección de cebadores que funcionaban bien en la región VHS TK-C, mientras que las figuras 3A y 3B presentan un ejemplo de selección de cebadores que no funcionaban bien en una región VHS TK-B no satisfactoria.

Como se muestra en la figura 1A, para la región VHS-1 TK-C, la combinación de cebadores F6-R5 (F6: SEQ ID NO: 4; R5: SEQ ID NO: 5) funcionó mejor que la combinación de cebadores F6-R6 (F6: SEQ ID NO: 4; R6: SEQ ID NO: 13) y el control. Como se muestra en la figura 1B, para VHS-2, la combinación F5-R6 (F5: SEQ ID NO: 7; R6: SEQ ID NO: 8) funcionó mejor que la combinación F6-R6 (F6: SEQ ID NO: 14; R6: SEQ ID NO: 8). La figura 2 muestra la electroforesis en gel de productos de PCR para la región VHS TK-C. Las flechas indican los productos de amplificación con los tamaños correctos. F6-R5 (F6: SEQ ID NO: 4; R5: SEQ ID NO: 5) para VHS-1 y F5-R6 (F5: SEQ ID NO: 7; R6: SEQ ID NO: 8) para VHS-2 para las combinaciones de cebadores produjeron productos claros y de tamaño correcto, mientras que otras combinaciones de cebadores mostraron múltiples productos inespecíficos.

Se realizaron experimentos adicionales usando cebadores para la región VHS-1 TK-B mostrada en la figura 3A. La figura 3B muestra experimentos de curvas de crecimiento de PCR usando cebadores para la región VHS-2 TK-B. Para la región VHS-1 TK-B (figura 3A) y VHS-2 (figura 3B), ninguna de las combinaciones de cebadores funcionó mejor que el control (para VHS-1, F7: SEQ ID NO: 15; R3: SEQ ID NO: 16; R4: SEQ ID NO: 17. Para VHS-2, F4: SEQ ID NO: 18; R3: SEQ ID NO: 19; R4: SEQ ID NO: 20). La figura 4 muestra la electroforesis en gel de los productos de PCR para la región VHS TK-B. Las flechas indican los productos de amplificación con los tamaños correctos. Para VHS-1, aunque algunas combinaciones de cebadores (F7-R3 (F7: SEQ ID NO: 15; R3: SEQ ID NO: 16) y F7-R4 (F7: SEQ ID NO: 15; R4: SEQ ID NO: 17)) dieron productos de amplificación únicos claros, sus curvas de crecimiento no fueron satisfactorias. Para VHS-2, había múltiples productos inespecíficos además de los productos del tamaño correcto.

Todas las combinaciones de cebadores y sondas en 8 regiones se evaluaron a fondo como se ilustra anteriormente. Se seleccionó una combinación de cebadores y sondas en tres regiones para cada tipo de virus VHS-1 y VHS-2 para una evaluación adicional del rendimiento del ensayo y su comparación, tal como la sensibilidad analítica del ensayo. Luego, las dos mejores combinaciones para cada tipo de virus (Pol-B y TK-C para VHS-1; gB3 y TK-C para VHS-2) finalmente se eligieron para un ensayo de VHS de diana doble. La figura 5 muestra las curvas de crecimiento para VHS-1 Pol-B, F11: SEQ ID NO: 1; R8: SEQ ID NO: 2; para VHS-1 TK-A, F2: SEQ ID NO: 21; R1: SEQ ID NO: 22; y para VHS-1 TK-C, F6: SEQ ID NO: 4; R5: SEQ ID NO: 5). La figura 6 muestra las curvas de crecimiento para VHS-2 TK-C, F5: SEQ ID NO: 7; R6: SEQ ID NO: 8; para VHS-2 Pol-B, F9: SEQ ID NO: 23; R6: SEQ ID NO: 24; y para VHS-2 gB3, F7: SEQ ID NO: 10; R7: SEQ ID NO: 11.

Se realizaron experimentos separados para el análisis de la sensibilidad analítica. La figura 7 muestra los resultados de tres ensayos independientes de VHS-1 (Pol-B, TK-A y TK-C). Prob. indica la probabilidad y pv/PCR indica el límite de detección por PCR, mientras que I95_conc y u95_conc se refieren al límite de confianza inferior del 95 % y el límite de confianza superior del 95 %, respectivamente. La figura 8 muestra los resultados de tres ensayos independientes de VHS-2 (gB3, Pol-B y TK-C). Prob. indica la probabilidad y pv/PCR indica el límite de detección por PCR, mientras que I95_conc y u95_conc se refieren al límite de confianza inferior del 95 % y el límite de confianza superior del 95 %, respectivamente.

La selección final de las 4 regiones para VHS-1 y VHS-2 fue muy coherente con el análisis de esas regiones *in silico*. Por ejemplo, entre las 8 regiones, las 4 regiones seleccionadas finales tienen los porcentajes más bajos de contenido de G+C y menos estructuras secundarias de horquilla larga que otras regiones, lo que las hace muy accesibles a un perfil térmico de PCR fijo.

EJEMPLO III

Competencia de dianas

Como se menciona anteriormente, se pueden usar dos enfoques diferentes para diseñar cebadores y sondas de VHS para detectar y discriminar los virus VHS-1 y VHS-2. Los cebadores comunes de PCR para amplificar ambos dianas víricas se diseñaron en primer lugar en la región VHS Pol-B. La discriminación de los tipos de virus se logró mediante sondas específicas del tipo de virus. Sin embargo, durante la evaluación del cebador, se descubrió que cuando ambas dianas víricas están presentes en una única reacción de PCR, la diana con un número de copias inferior puede competir con la diana con un número de copias más alto. Aunque la causa de este fenómeno no está clara, se especula que los cebadores de PCR comunes pueden causar estas amplificaciones de diana desequilibradas. Las figuras 9A y 9B ilustran el fenómeno (para VHS-1 y VHS-2 Pol-B, F4: SEQ ID NO: 25; R5: SEQ ID NO: 26). Cuando se usaron cebadores comunes y estaban presentes ambos tipos de virus VHS en una reacción de PCR, la diana con un número de copias inferior (10 partículas de virus por PCR) compitió con otro diana con un número de copias más alto (1000 partículas de virus por PCR). Cuando uno de los dos cebadores comunes, en este caso el cebador inverso, se reemplazó por cebadores específicos del tipo de virus, la competencia de dianas todavía existía, pero con menos intensidad (figuras 10A y 10B) (para VHS-1 Pol-B, F4: SEQ ID NO: 27; R8: SEQ ID NO: 2. Para VHS-2 Pol-B, F4: SEQ ID NO: 27; R6: SEQ ID NO: 28). Cuando ambos cebadores comunes se reemplazaron completamente por cebadores específicos del tipo de virus en la misma región, no se observó competencia de dianas a diferencias de concentración de diana de hasta 10.000 veces en esas reacciones

(figuras 11A y 11B) (para VHS-1 Pol-B, F12: SEQ ID NO: 29; R8: SEQ ID NO: 2. Para VHS-2 Pol-B, F9: SEQ ID NO: 23; R6: SEQ ID NO: 24).

La detección y discriminación tanto del VHS-1 como del VHS-2 en una única reacción de PCR sin competencia de dianas ofrecen un rendimiento superior del ensayo frente a otros ensayos de PCR de VHS que se han presentado o se encuentran en el mercado hasta el momento. No solamente usa un tubo de reacción y una única muestra, sino que también es sensible y específico para el tipo de virus. Como resultado, todos los cebadores de amplificación de diana de VHS y las sondas de detección se diseñaron y seleccionaron para que fueran específicos del tipo de virus.

EJEMPLO IV

Reactividad cruzada

Diseñar cebadores y sondas específicos del tipo de virus para maximizar su especificidad planteó dificultades debidas al alto grado de homologías de secuencia entre VHS-1 y VHS-2. Se han llevado a cabo experimentos para examinar la posible reactividad cruzada de los cebadores y las sondas. En esos experimentos, los cebadores y las sondas se expusieron a las altas concentraciones de plásmidos que contienen las regiones diana de los tipos de virus opuestos. Como se muestra en la figura 12A y 12B, dos plásmidos (cortados por Hind III) que contienen las regiones VHS-1 Pol-B y VHS-1 TK-C, respectivamente (pHSV-1 Pol-B-2 y pHSV-1 TK-C), se amplificaron mediante el ensayo de diana doble de VHS recién diseñado. Como se esperaba, se observaron señales positivas únicamente en el canal FAM (figura 12A) y no en el canal HEX (figura 12B). De forma similar, dos plásmidos de VHS-2 (cortados por Hind III) que contienen las regiones VHS-2 gB3 y VHS-2 TK-C, respectivamente (pHSV-2 gB3 y pHSV-2 TK-C), se amplificaron mediante el ensayo de diana doble de VHS recién diseñado. Como se esperaba, se observaron señales positivas únicamente en el canal HEX (figura 13B) y no en el canal FAM (figura 13A).

Además de la posible reactividad cruzada entre los tipos de virus VHS-1 y VHS-2, el ensayo de VHS-1/2 de diana doble recién diseñado también se expuso a altas concentraciones de otros virus de herpes estrechamente relacionados de la misma familia. Como se muestra en la figura 14, el nuevo ensayo de VHS-1/2 no tiene reactividad cruzada con otros virus de herpes estrechamente relacionados.

Aunque la divulgación precedente se ha descrito con algún detalle con fines de claridad y comprensión, será evidente para un experto en la técnica, a partir de una lectura de la presente divulgación, que se pueden realizar diversos cambios en forma y detalle. Por ejemplo, todas las técnicas y aparatos descritos anteriormente se pueden usar en diversas combinaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG

5 <120> COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE VIRUS 1 Y 2 DEL HERPES SIMPLE

<130> 31007 WO-HS

10 <150> 13/588.943
<151> 17/08/2012

<160> 29

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 23
<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

25 <400> 1
gacaactfct gcccgccat caa 23

<210> 2
<211> 22
<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

35 <400> 2
tcgctgatg tcccgaaggc ca 22

<210> 3
<211> 30
<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

45 <400> 3
cggaacaaca cgctagcca gccgcgggcc 30

50 <210> 4
<211> 27
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Oligonucleótido

<400> 4
cgctttatc ctggattacg accaatc 27

60 <210> 5
<211> 22
<212> ADN

65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido

 <400> 5
 5 ggtcgcagat cgtcggatg ga 22

 <210> 6
 <211> 30
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido

 <400> 6
 15 ctgcaacta cctccgggat ggtccagacc 30

 <210> 7
 <211> 24
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido

 <400> 7
 25 tccttcgat gcatctattt gtcc 24

 <210> 8
 <211> 19
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido

 <400> 8
 35 atggacccgg cggttgtga 19

 <210> 9
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido

 <400> 9
 50 ttgctcctca cgcgggat gatccaac 29

 <210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido

 <400> 10
 60 cgctacgtcc tgcaactgca ac 22

 <210> 11
 <211> 26
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido

5 <400> 11
 ggccgacacc aaagccatat atcgga 26

<210> 12
 <211> 36
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido

15 <400> 12
 tccgctcacc accaaggaac tcaagacttc cgaccc 36

<210> 13
 <211> 22
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido

25 <400> 13
 ggtatggagc ctggggtggt ga 22

<210> 14
 <211> 19
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 14
 ccgctcgggtg tcgagacgc 19

40 <210> 15
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 15
 50 ggaggattgg ggacagcttt c 21

<210> 16
 <211> 25
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 16
 60 cccaggcaaa cacgttatac aggtc 25

<210> 17
 <211> 21
 65 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 5 <400> 17
 aaggcccagg caaacacgtt a 21
 <210> 18
 10 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Oligonucleótido
 <400> 18
 cccgaccccg aggacggc 18
 <210> 19
 20 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Oligonucleótido
 <400> 19
 ccaggcaaaa atgtgtaca agtcc 25
 30 <210> 20
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 20
 40 gggaacgcgg aacaggca 19
 <210> 21
 <211> 19
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 21
 50 gaccaggctg cgcgttctc 19
 <210> 22
 <211> 21
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 60 <400> 22
 cggacttccg tggcttctg c 21
 <210> 23
 65 <211> 21

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido

 <400> 23
 ctttgcccc gcgatcagga a 21

 10 <210> 24
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido

 <400> 24
 tcgctcgagg ttccgaacgc c 21
 20
 <210> 25
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Oligonucleótido

 <400> 25
 30 gtcaccttcg gctgtacc 19

 <210> 26
 <211> 24
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido

 <400> 26
 40 gtcgcccga cagttaaact cgac 24

 <210> 27
 <211> 19
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido
 50
 <400> 27
 gtcaccttcg gctgtacc 19

 <210> 28
 55 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> Oligonucleótido

 <400> 28
 tcgctcgagg ttccgaacgc c 21

 65 <210> 29

ES 2 686 323 T3

<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Oligonucleótido

<400> 29
gcgacaactt ctgccggcc a 21

10

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para detectar la presencia o ausencia de un ácido nucleico de VHS-1 y/o VHS-2 en una muestra, comprendiendo el procedimiento:
- realizar una etapa de amplificación que comprende poner en contacto la muestra con una pluralidad de conjuntos de cebadores oligonucleotídicos específicos de VHS-1 y cebadores oligonucleotídicos específicos de VHS-2 para producir uno o más productos de amplificación si está presente algún ácido nucleico VHS-1 y/o VHS-2 en la muestra;
 - realizar una etapa de hibridación que comprende poner en contacto dichos uno o más productos de amplificación con una pluralidad de sondas oligonucleotídicas VHS-1 y VHS-2 detectables; y
 - detectar la presencia o ausencia de dichos uno o más productos de amplificación, en el que la presencia de dichos uno o más productos de amplificación es indicativa de la presencia del ácido nucleico de VHS-1 y/o VHS-2 en la muestra y en el que la ausencia de dichos uno o más productos de amplificación es indicativa de la ausencia del ácido nucleico de VHS-1 y/o VHS-2 en la muestra;
- en el que dicha pluralidad de conjuntos de cebadores oligonucleotídicos específicos de VHS-1 y cebadores oligonucleotídicos específicos de VHS-2 comprende:
- al menos dos conjuntos de cebadores oligonucleotídicos específicos de VHS-1 que amplifican específicamente una diana génica de ADN polimerasa de VHS-1 (VHS-1 Pol) y de timidina cinasa C de VHS-1 (VHS-1 TK); y
 - al menos dos conjuntos de cebadores oligonucleotídicos específicos de VHS-2 que amplifican específicamente una diana génica de timidina cinasa C de VHS-2 (VHS-2 TK) y de glucoproteína B de VHS-2 (VHS-2 gB); y
- en el que dicha pluralidad de sondas oligonucleotídicas VHS-1 y VHS-2 detectables comprende:
- al menos dos sondas oligonucleotídicas de VHS-1 específicas para un producto de amplificación de VHS-1 Pol y VHS-1 TK; y
 - al menos dos sondas oligonucleotídicas de VHS-2 específicas para un producto de amplificación de VHS-2 TK y VHS-2 gB,
- y en el que:
- el conjunto de cebadores específicos de VHS-1 para la amplificación de la diana génica VHS-1 Pol comprende al menos dos oligonucleótidos que tienen secuencias de ácido nucleico que comprenden las SEQ ID NO: 1 y 2 o un complemento de las mismas;
 - el conjunto de cebadores específicos de VHS-1 para la amplificación de la diana génica VHS-1 TK comprende al menos dos oligonucleótidos que tienen secuencias de ácido nucleico que comprenden las SEQ ID NO: 4 y 5 o un complemento de las mismas;
 - el conjunto de cebadores específicos de VHS-2 para la amplificación de la diana génica VHS-2 TK comprende al menos dos oligonucleótidos que tienen secuencias de ácido nucleico que comprenden las SEQ ID NO: 7 y 8 o un complemento de las mismas;
 - el conjunto de cebadores específicos de VHS-2 para la amplificación de la diana génica VHS-2 gB comprende al menos dos oligonucleótidos que tienen secuencias de ácido nucleico que comprenden las SEQ ID NO: 10 y 11 o un complemento de las mismas;
 - la sonda oligonucleotídica de VHS-1 detectable para la detección del producto de amplificación de VHS-1 Pol tiene una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 3 o un complemento de la misma;
 - la sonda oligonucleotídica de VHS-1 detectable para la detección del producto de amplificación de VHS-1 TK tiene una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 6 o un complemento de la misma;

- la sonda oligonucleotídica de VHS-2 detectable para la detección del producto de amplificación de VHS-2 TK tiene una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 9 o un complemento de la misma; y
- 5 - la sonda oligonucleotídica de VHS-2 detectable para la detección del producto de amplificación de VHS-2 gB tiene una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 12 o un complemento de la misma.
- 10 **2.** El procedimiento de la reivindicación 1, en el que cada una de la pluralidad de sondas oligonucleotídicas de VHS-1 y VHS-2 detectables está marcada con un resto fluorescente donador y un resto fluorescente aceptador correspondiente, y en el que la etapa de detección comprende detectar la presencia o ausencia de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) entre el resto fluorescente donador y el resto fluorescente aceptador de una o más de las sondas oligonucleotídicas de VHS-1 y/o VHS-2, en el que la presencia o ausencia de fluorescencia es indicativa de la presencia o ausencia de ácido nucleico de VHS-1 y/o VHS-2 en la muestra.
- 15 **3.** El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la etapa de amplificación emplea una enzima polimerasa que tiene actividad exonucleasa en dirección 5' a 3'.
- 20 **4.** El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, en el que dichos restos fluorescentes donadores y aceptadores están en no más de 5 nucleótidos entre sí en dicha sonda oligonucleotídica.
- 25 **5.** El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las sondas oligonucleotídicas de VHS-1 y/o VHS-2 comprenden una secuencia de ácido nucleico que permite la formación de estructuras secundarias, en el que la formación de estructura secundaria da como resultado la proximidad espacial entre el resto fluorescente donador y el aceptador.
- 30 **6.** El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que dicho resto fluorescente aceptador es un extintor.
- 35 **7.** Un kit para detectar la presencia o ausencia de un ácido nucleico de VHS-1 y/o VHS-2, que comprende:
 - una pluralidad de conjuntos de cebadores oligonucleotídicos específicos de VHS-1 y cebadores oligonucleotídicos específicos de VHS-2 para la amplificación específica de una diana génica de VHS-1 Pol y VHS-1 TK, y una diana génica de VHS-2 TK y VHS-2 gB; y
 - una pluralidad de sondas oligonucleotídicas de VHS-1 y VHS-2 detectables específicas para la detección de un producto de amplificación de VHS-1 Pol y VHS-1 TK, y un producto de amplificación de VHS-2 TK y VHS-2 gB y,
- 40 en el que el conjunto de cebadores específicos de VHS-1 para la amplificación de la diana génica VHS-1 Pol comprende al menos dos oligonucleótidos que tienen secuencias de ácido nucleico que comprenden las SEQ ID NO: 1 y 2 o un complemento de las mismas; el conjunto de cebadores específicos de VHS-1 para la amplificación de la diana génica VHS-1 TK comprende al menos dos oligonucleótidos que tienen secuencias de ácido nucleico que comprenden las SEQ ID NO: 4 y 5 o un complemento de las mismas; el conjunto de cebadores específicos de VHS-2 para la amplificación de la diana génica VHS-2 TK comprende al menos dos oligonucleótidos que tienen secuencias de ácido nucleico que comprenden las SEQ ID NO: 7 y 8 o un complemento de las mismas; el conjunto de cebadores específicos de VHS-2 para la amplificación de la diana génica VHS-2 gB comprende al menos dos oligonucleótidos que tienen secuencias de ácido nucleico que comprenden las SEQ ID NO: 10 y 11 o un complemento de las mismas, y
- 50 en el que la sonda oligonucleotídica de VHS-1 detectable para la detección del producto de amplificación de VHS-1 Pol tiene una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 3 o un complemento de la misma; la sonda oligonucleotídica de VHS-1 detectable para la detección del producto de amplificación de VHS-1 TK tiene una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 6 o un complemento de la misma; la sonda oligonucleotídica de VHS-2 detectable para la detección del producto de amplificación VHS-2 TK tiene una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 9 o un complemento de la misma; la sonda oligonucleotídica de VHS-2 detectable para la detección del producto de amplificación VHS-2 gB tiene una secuencia de ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 12 o un complemento de la misma.
- 55 **8.** El kit de la reivindicación 7, en el que cada sonda oligonucleotídica de dicha pluralidad de sondas oligonucleotídicas VHS-1 y VHS-2 detectables comprende un resto fluorescente donador y un resto fluorescente aceptador correspondiente.
- 60 **9.** El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, que comprende además trifosfatos de nucleósidos, ácido nucleico polimerasa y tampones necesarios para la función del ácido nucleico polimerasa.
- 65

- 10.** Una composición que comprende conjuntos de cebadores oligonucleotídicos, teniendo dichos cebadores oligonucleotídicos 100 o menos nucleótidos y comprendiendo
- 5 - una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2, 4 y 5, o un complemento de las mismas; y
- una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 8, 10 y 11, o un complemento de las mismas.
- 10 **11.** La composición de la reivindicación 10, que comprende además sondas oligonucleotídicas marcadas de forma detectable que tienen 100 o menos nucleótidos y que comprenden una secuencia de ácido nucleico que tiene las SEQ ID NO: 3 y 6, o un complemento de las mismas; y las SEQ ID NO: 9 y 12, o un complemento de las mismas.
- 15 **12.** La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, en la que los oligonucleótidos tienen 40 o menos nucleótidos.

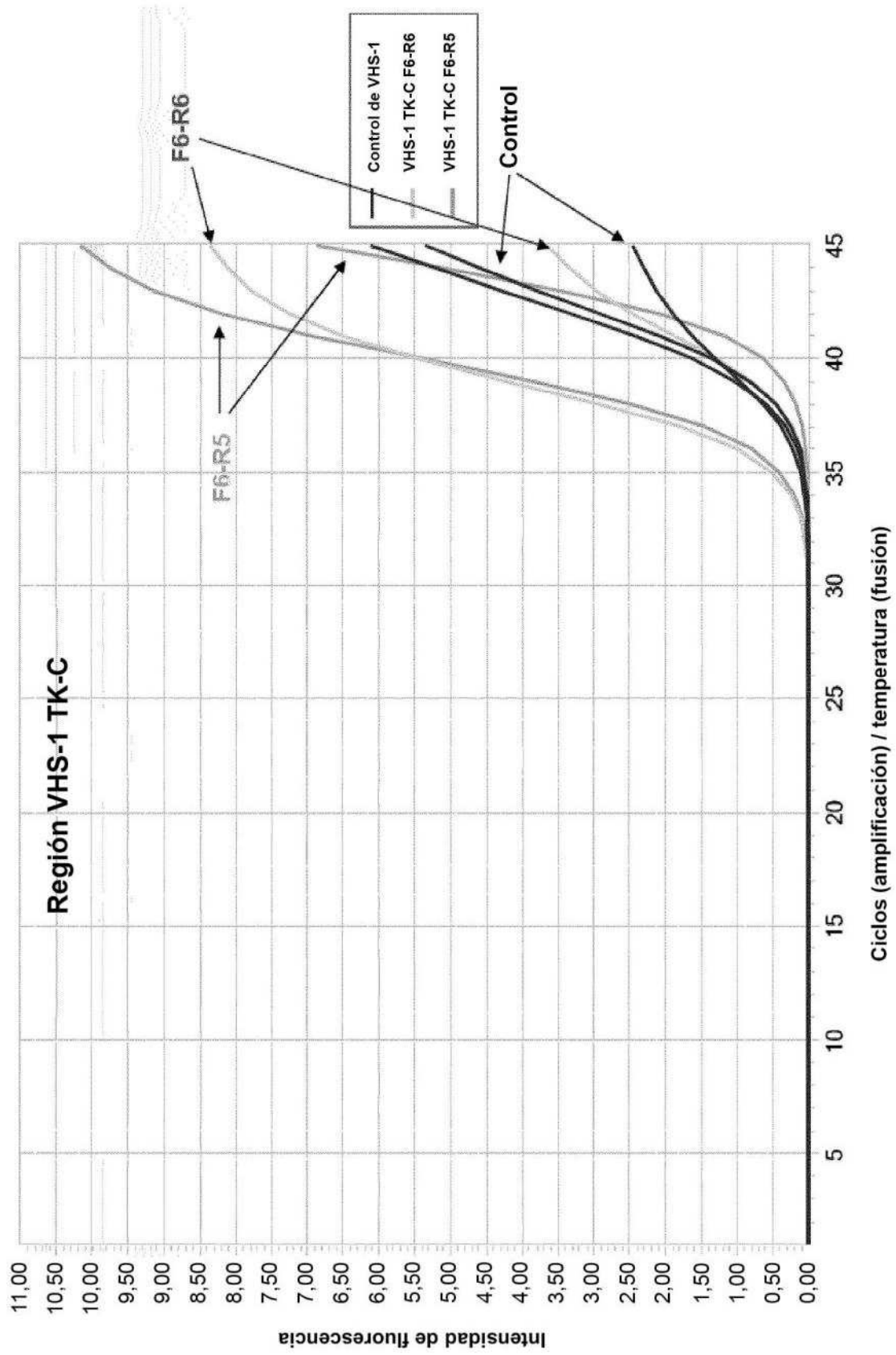


FIGURA 1A

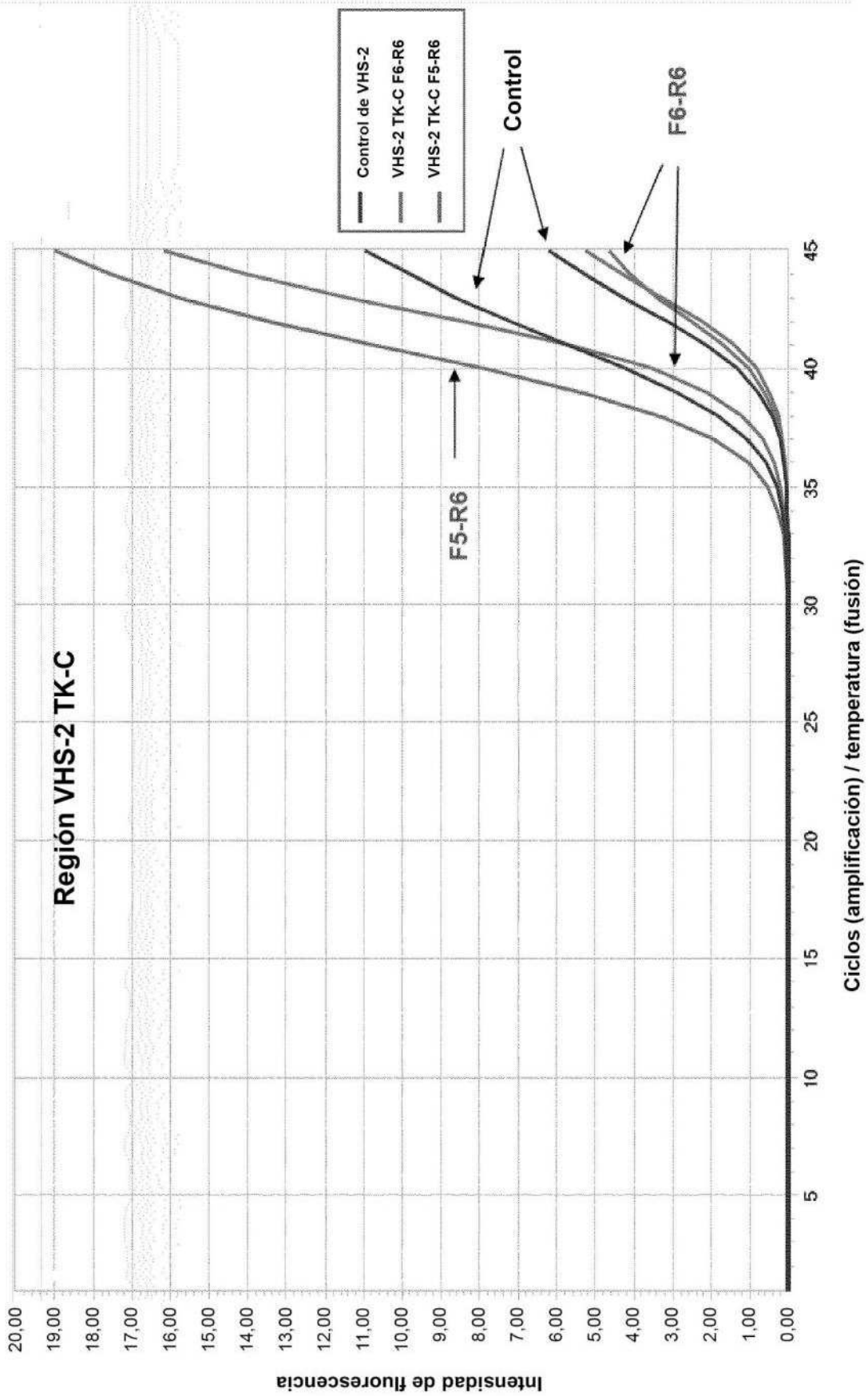


FIGURA 1B

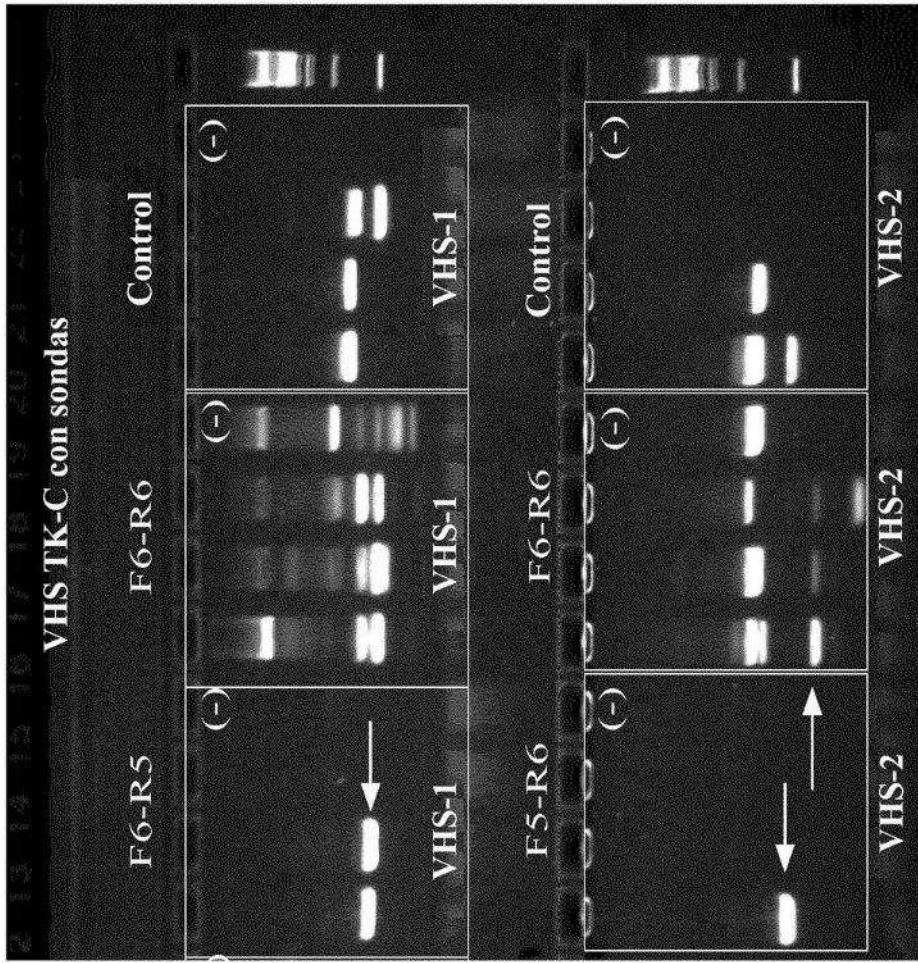


FIGURA 2

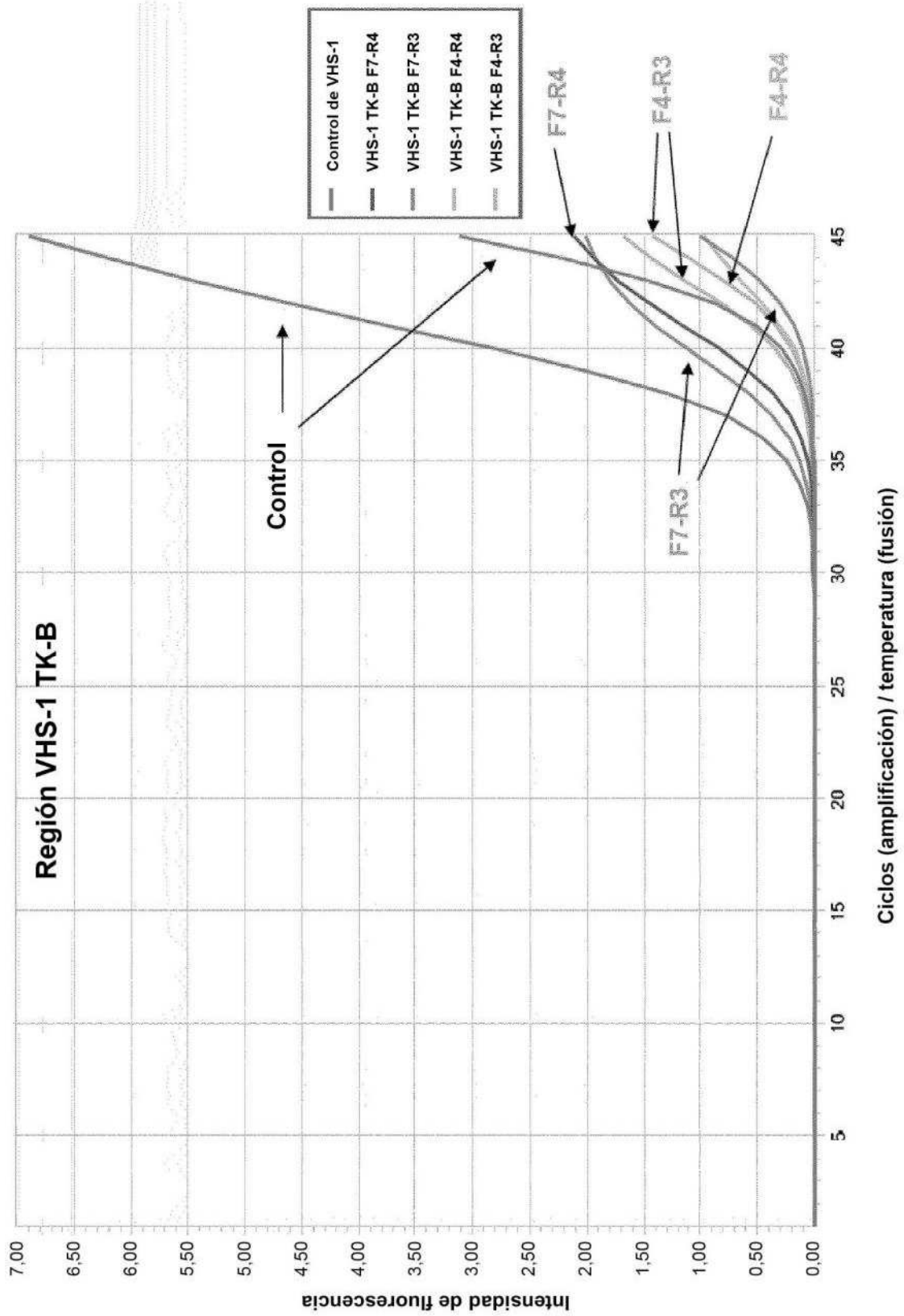


FIGURA 3A

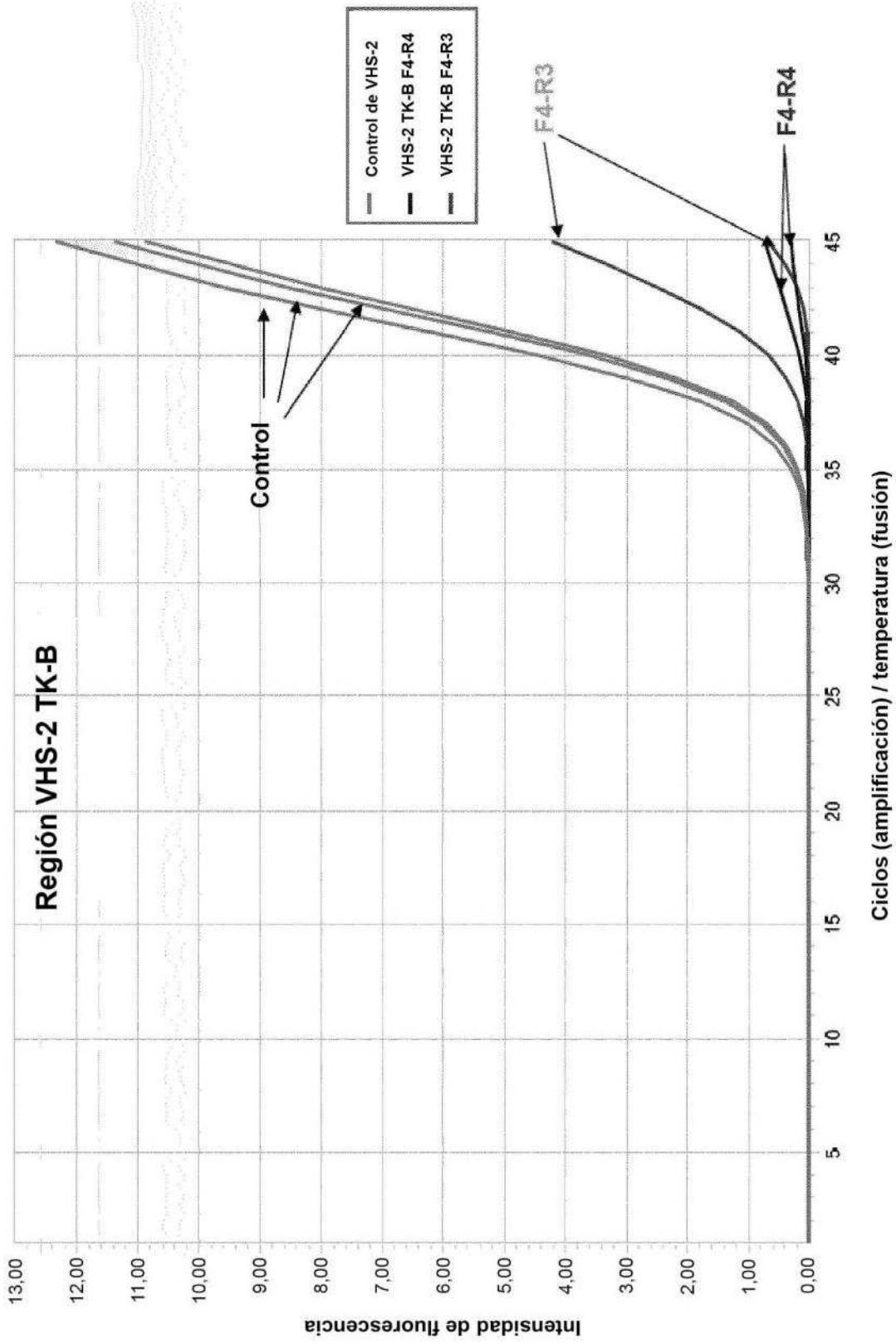


FIGURA 3B

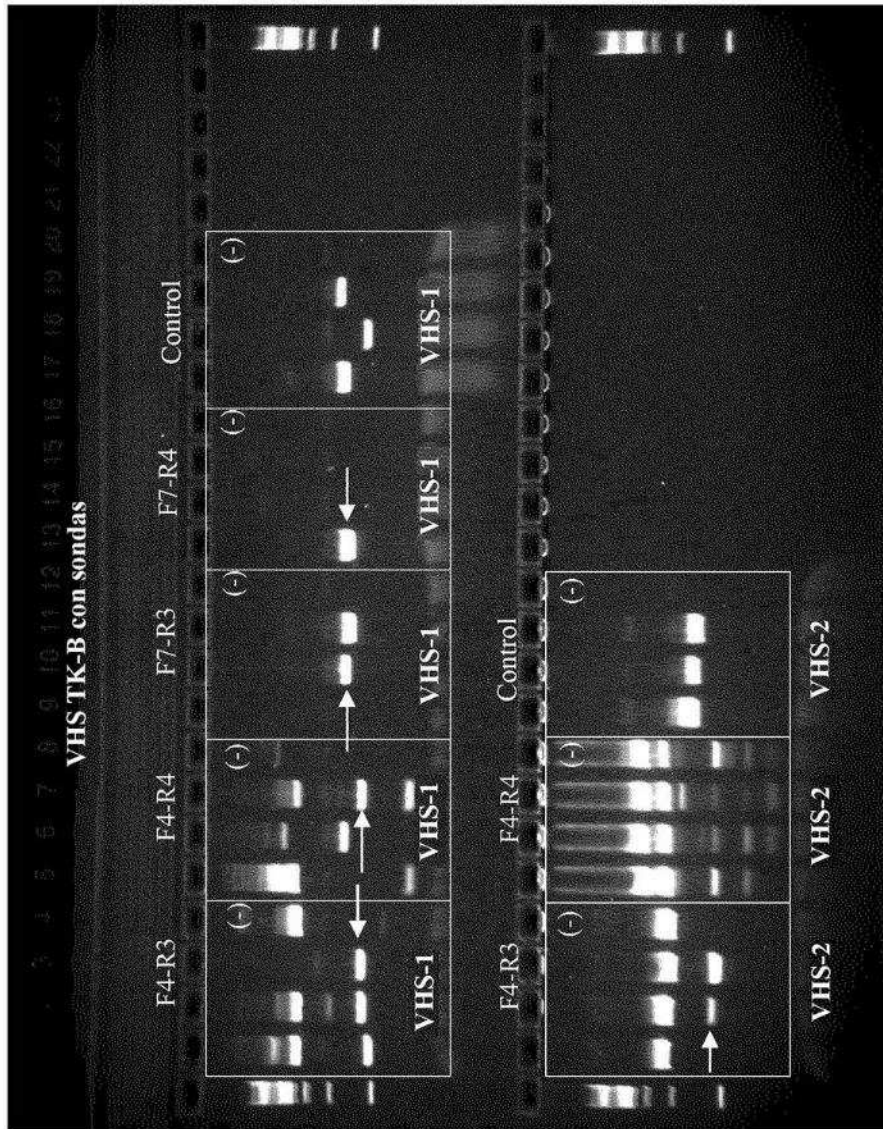


FIGURA 4

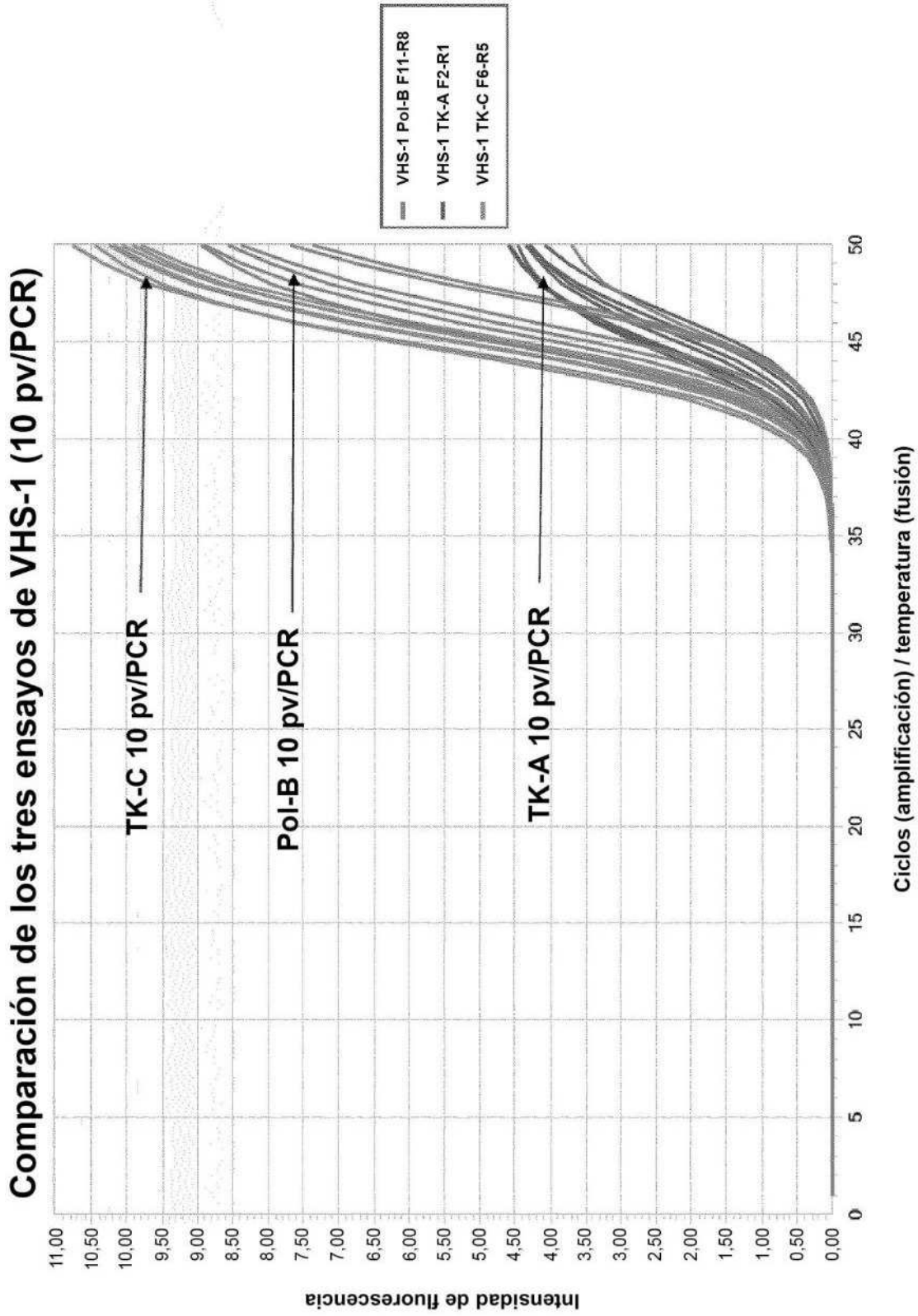


FIGURA 5

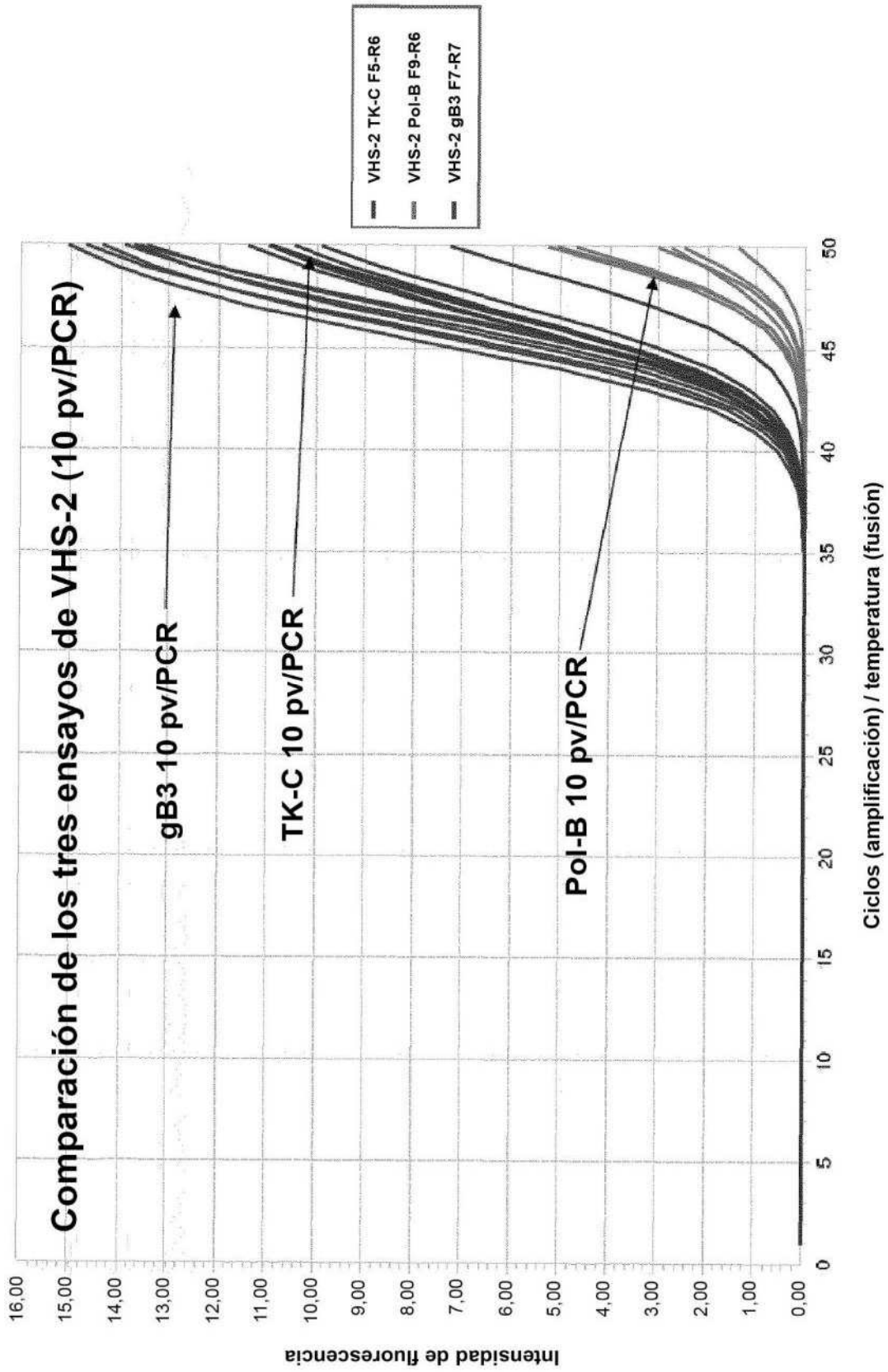


FIGURA 6

VHS-1				
TK-A				
	Prob.	pv/PCR	l95_conc	u95_conc
	0,95	27,82	.	.
Pol-B				
	Prob.	pv/PCR	l95_conc	u95_conc
	0,95	11,00	6,25	38,15
TK-C				
	Prob.	pv/PCR	l95_conc	u95_conc
	0,95	7,17	4,88	14,72

FIGURA 7

VHS-2					
gB3					
	Prob.	pv/PCR	l95_conc	u95_conc	
	0,95	3,62	2,75	6,97	
Pol-B					
	Prob.	pv/PCR	l95_conc	u95_conc	
	0,95	7,80	4,63	24,60	
TK-C					
	Prob.	pv/PCR	l95_conc	u95_conc	
	0,95	5,01	3,23	12,71	

FIGURA 8

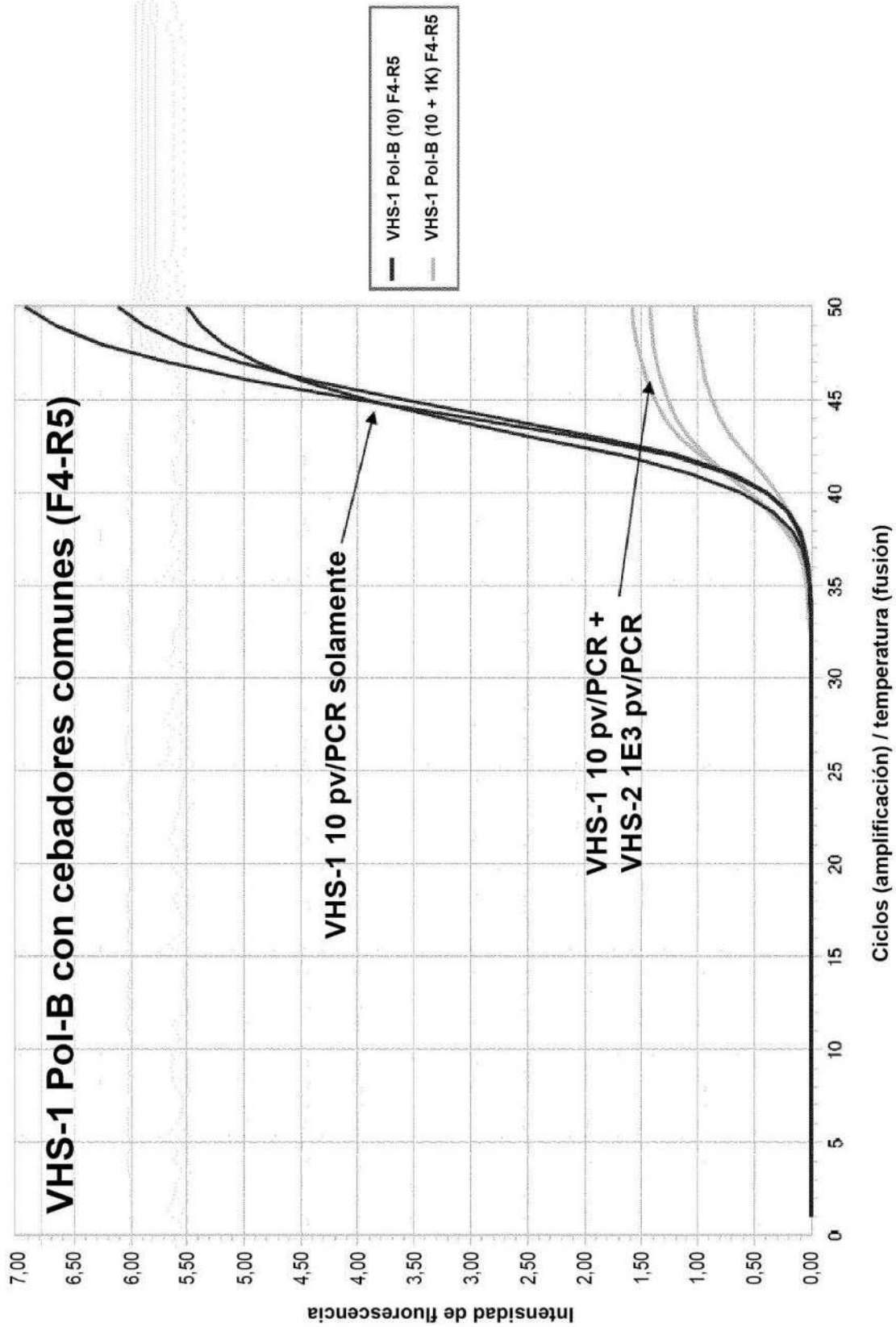


FIGURA 9A

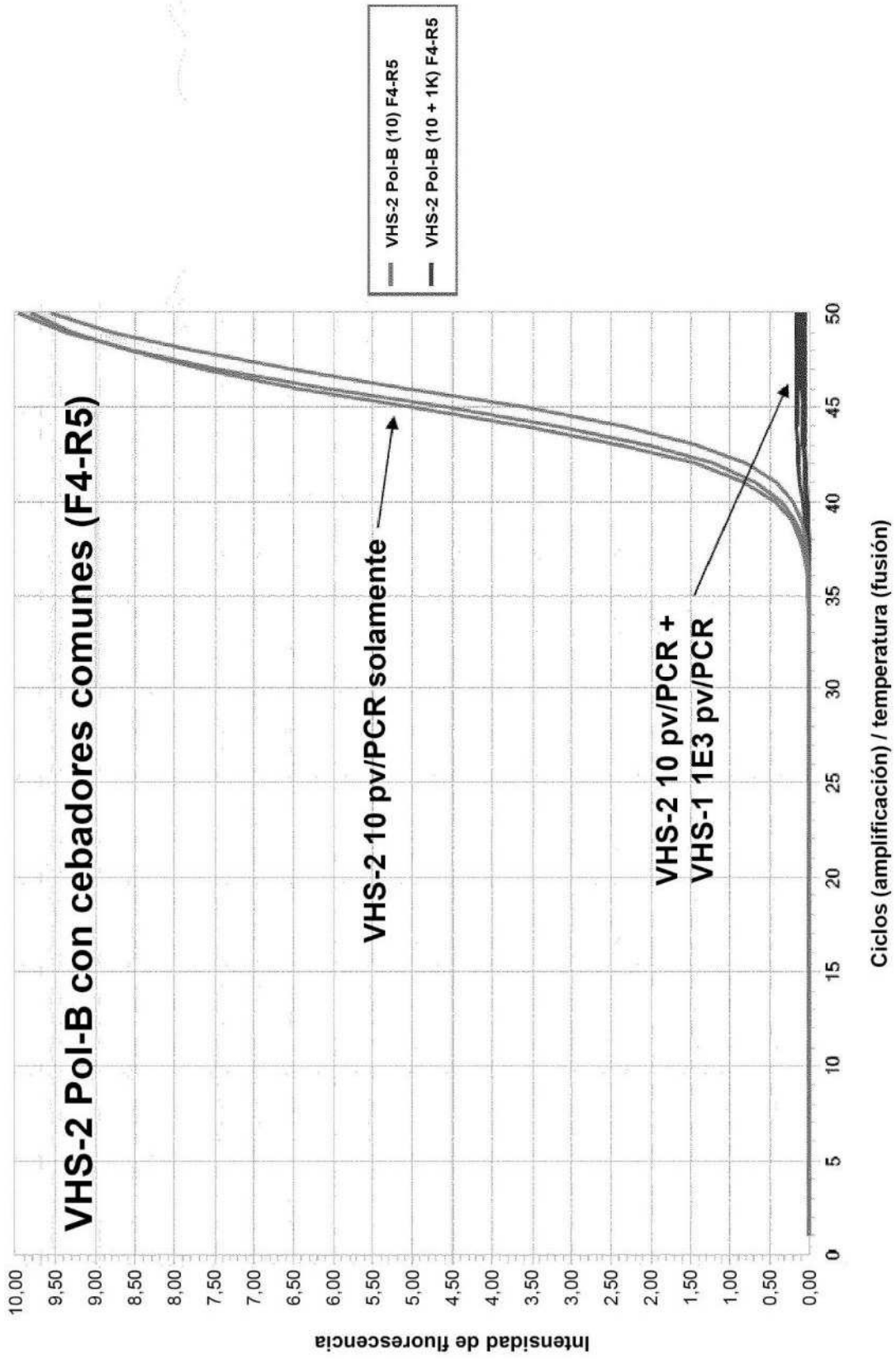


FIGURA 9B

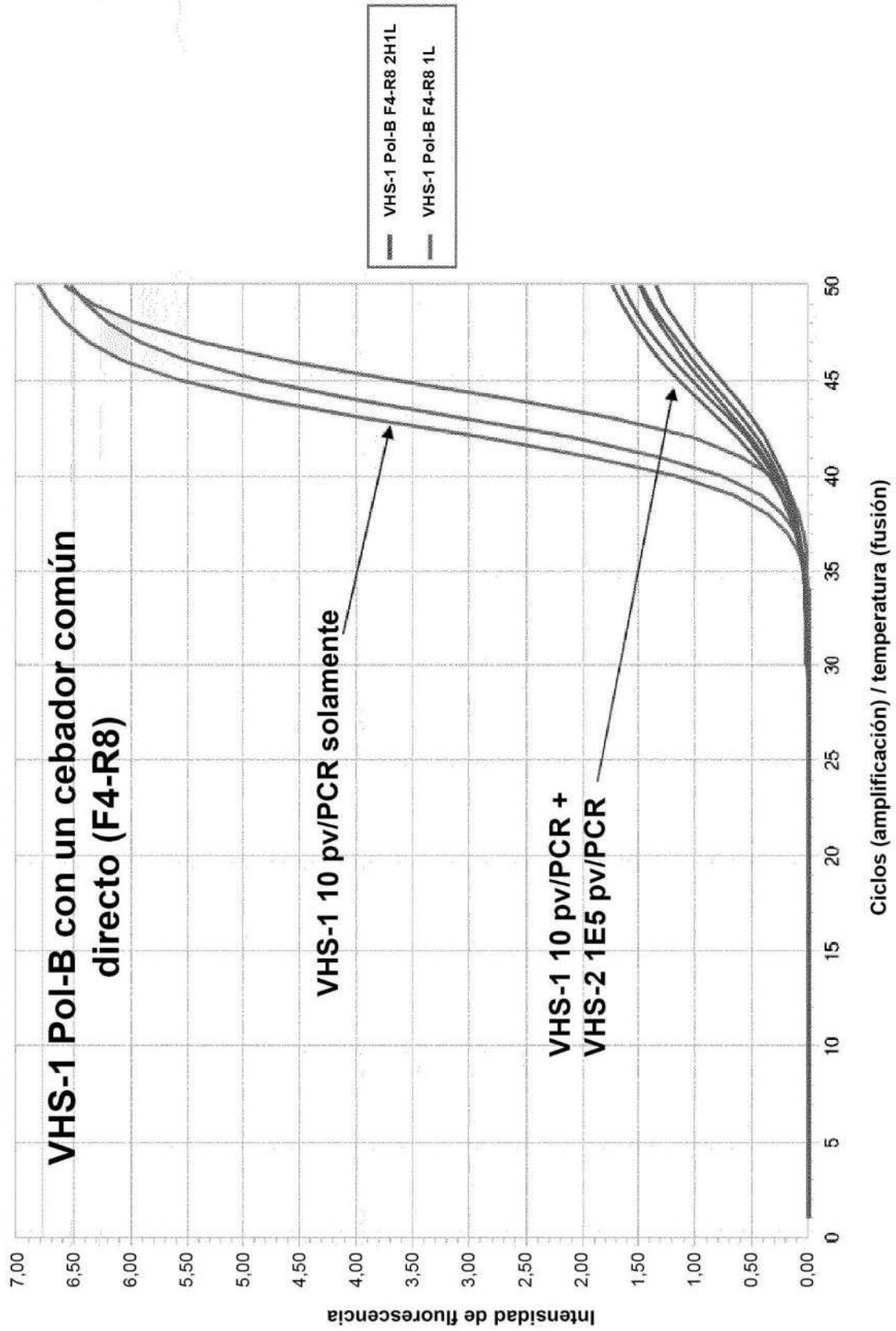


FIGURA 10A

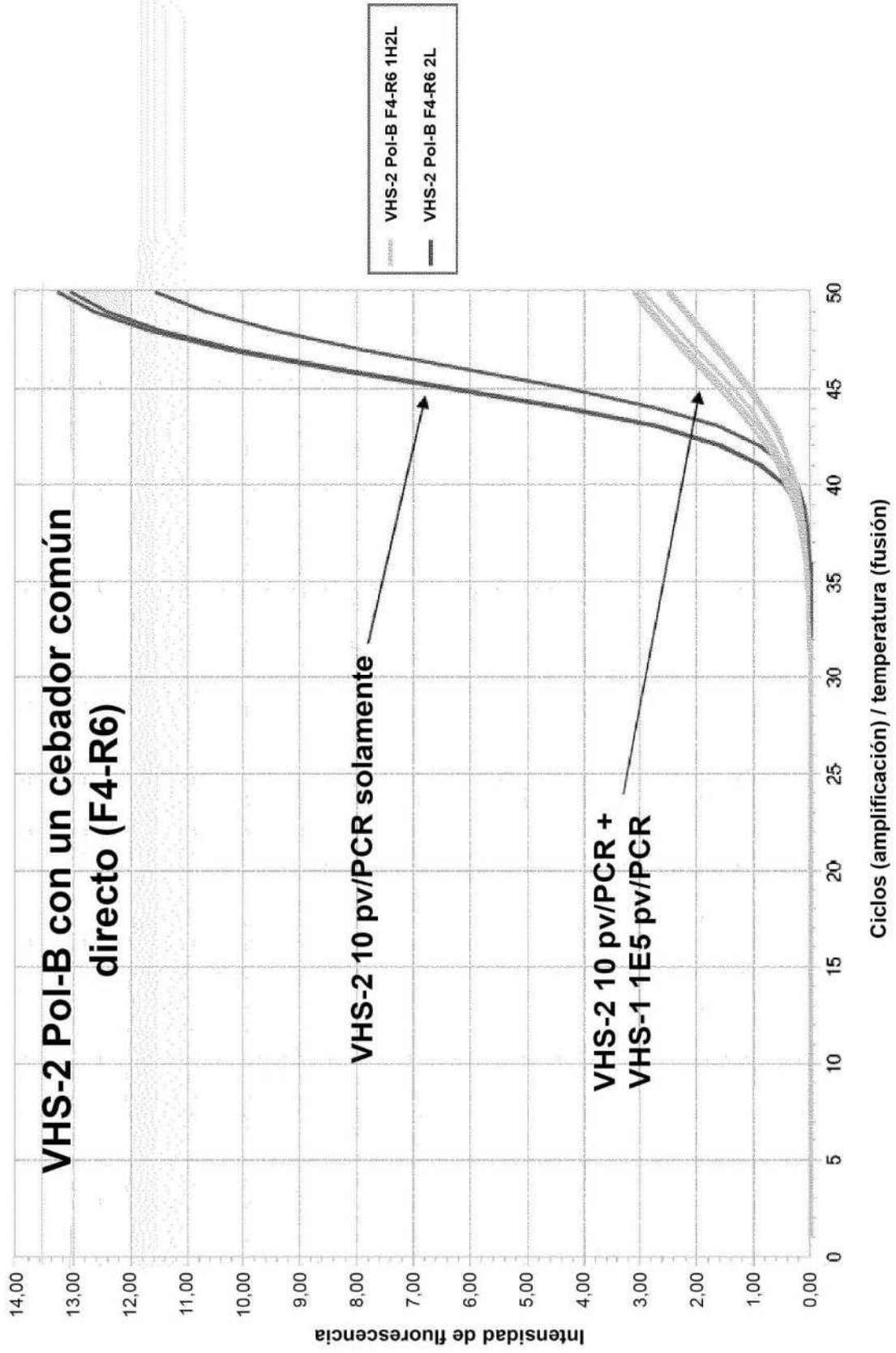


FIGURA 10B

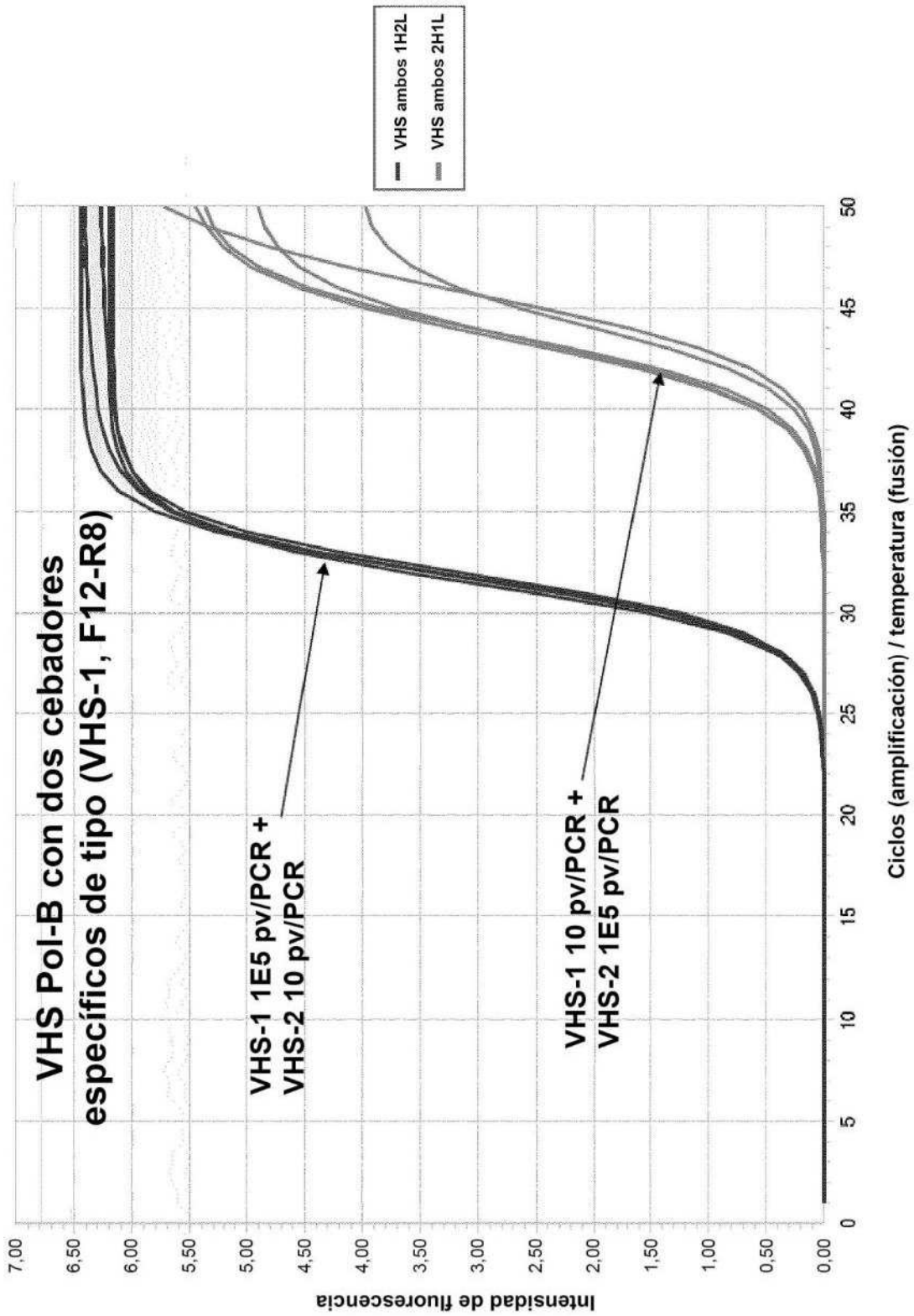


FIGURA 11A

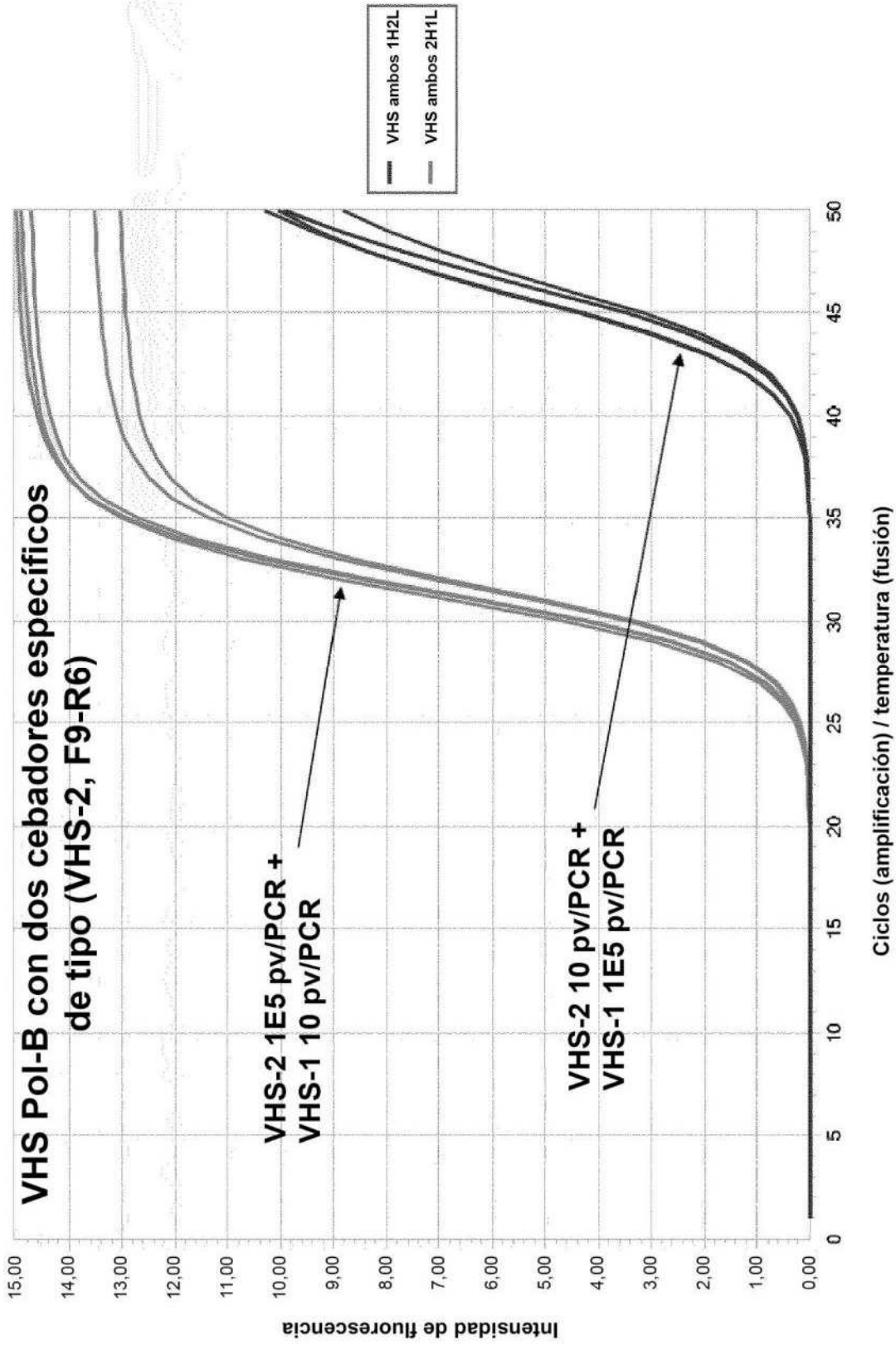


FIGURA 11B

Nuevos ensayos de VHS de doble diana con plásmidos de VHS-1 (canal FAM)

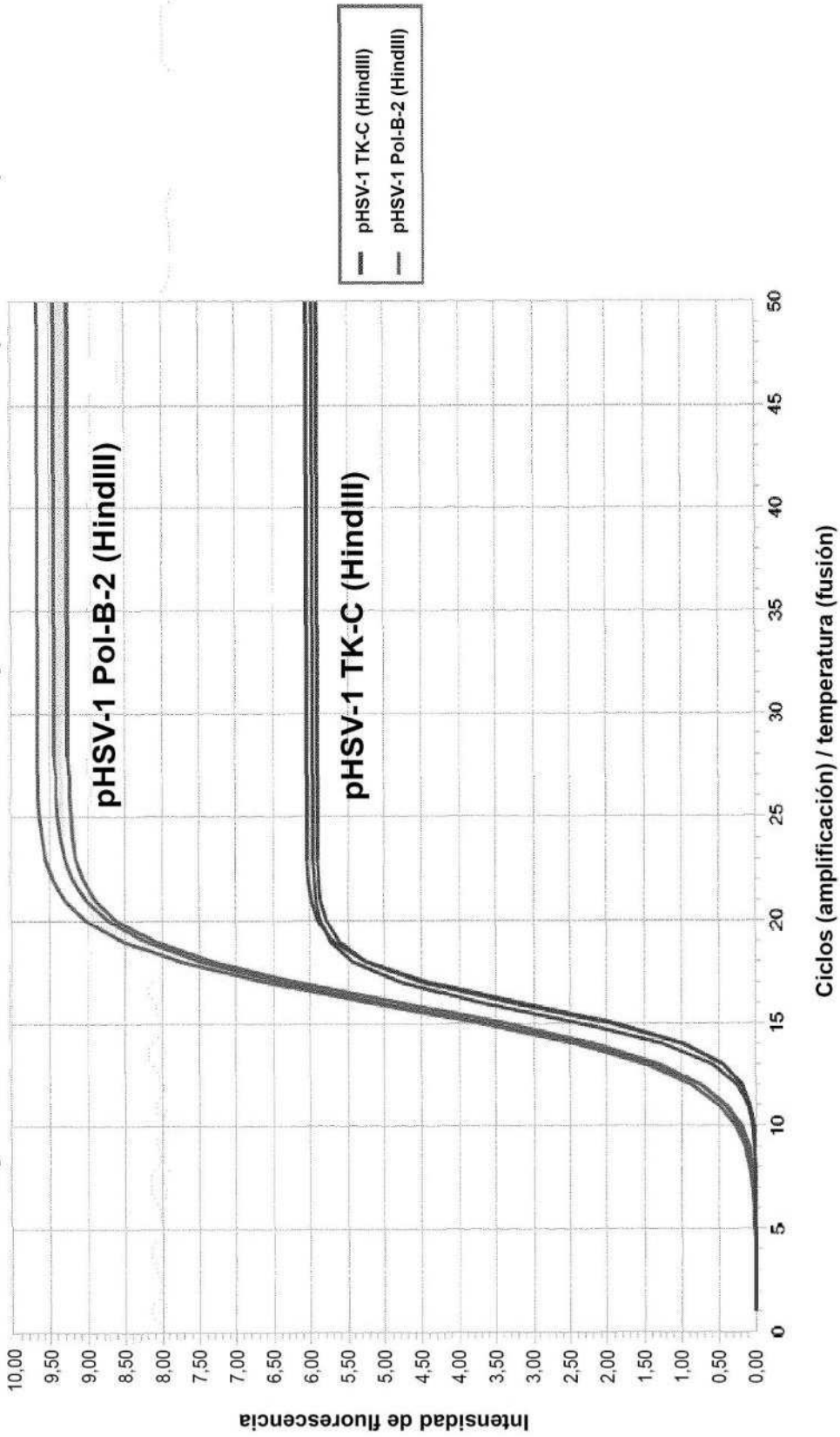


FIGURA 12A

Nuevos ensayos de VHS de doble diana con plásmidos de VHS-1 (canal HEX)

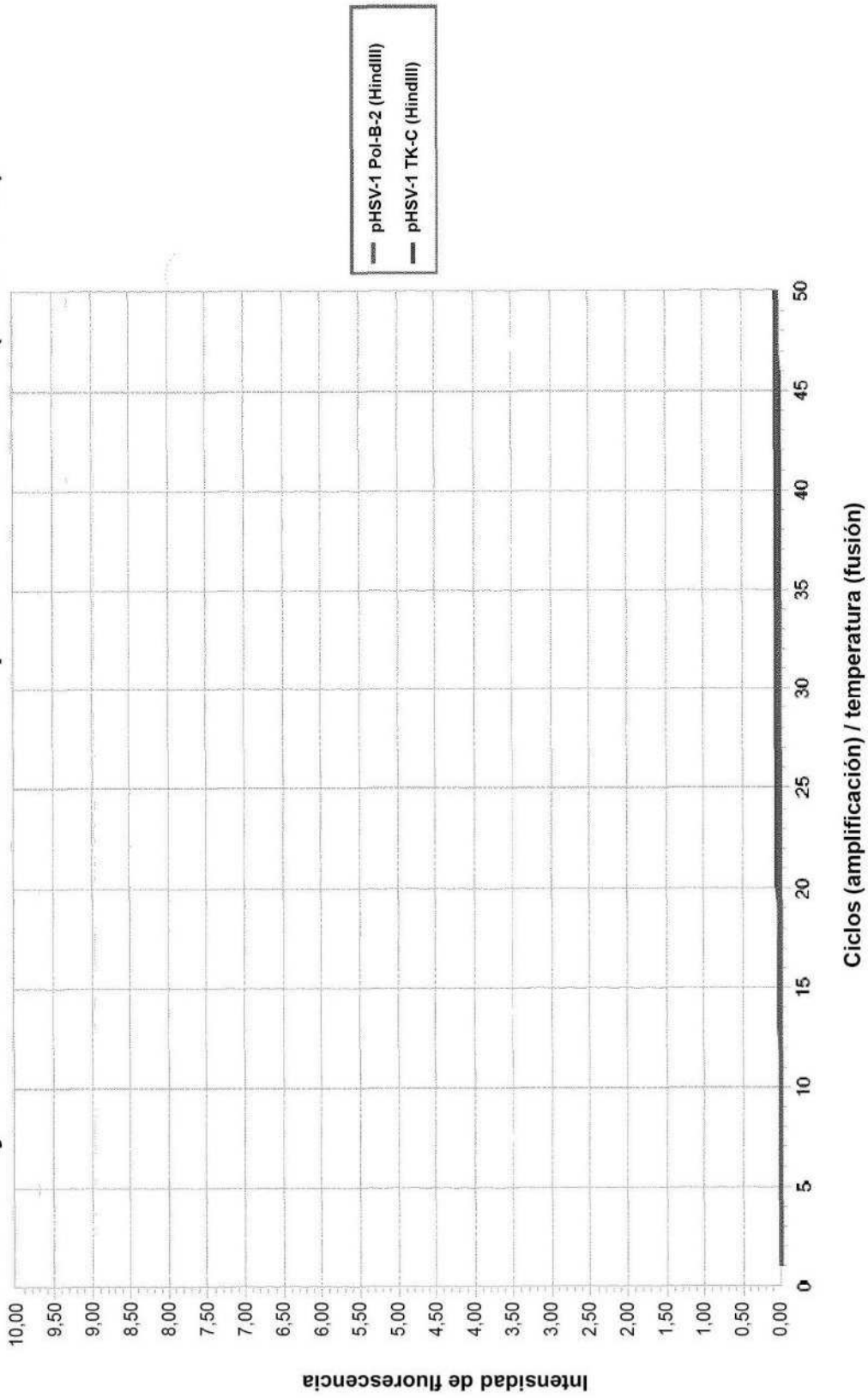


FIGURA 12B

Nuevos ensayos de VHS de doble diana con plásmidos de VHS-2 (canal FAM)

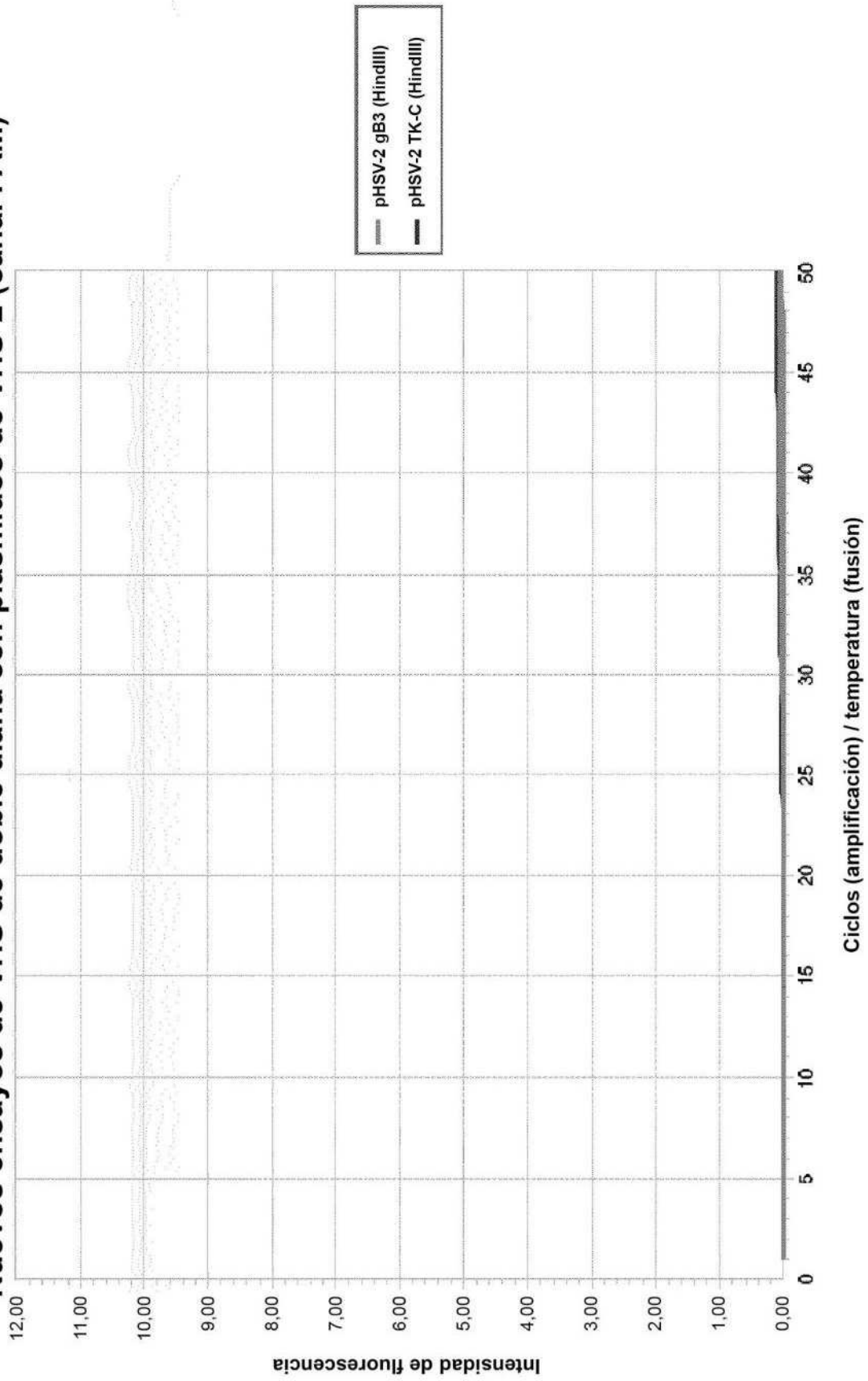


FIGURA 13A

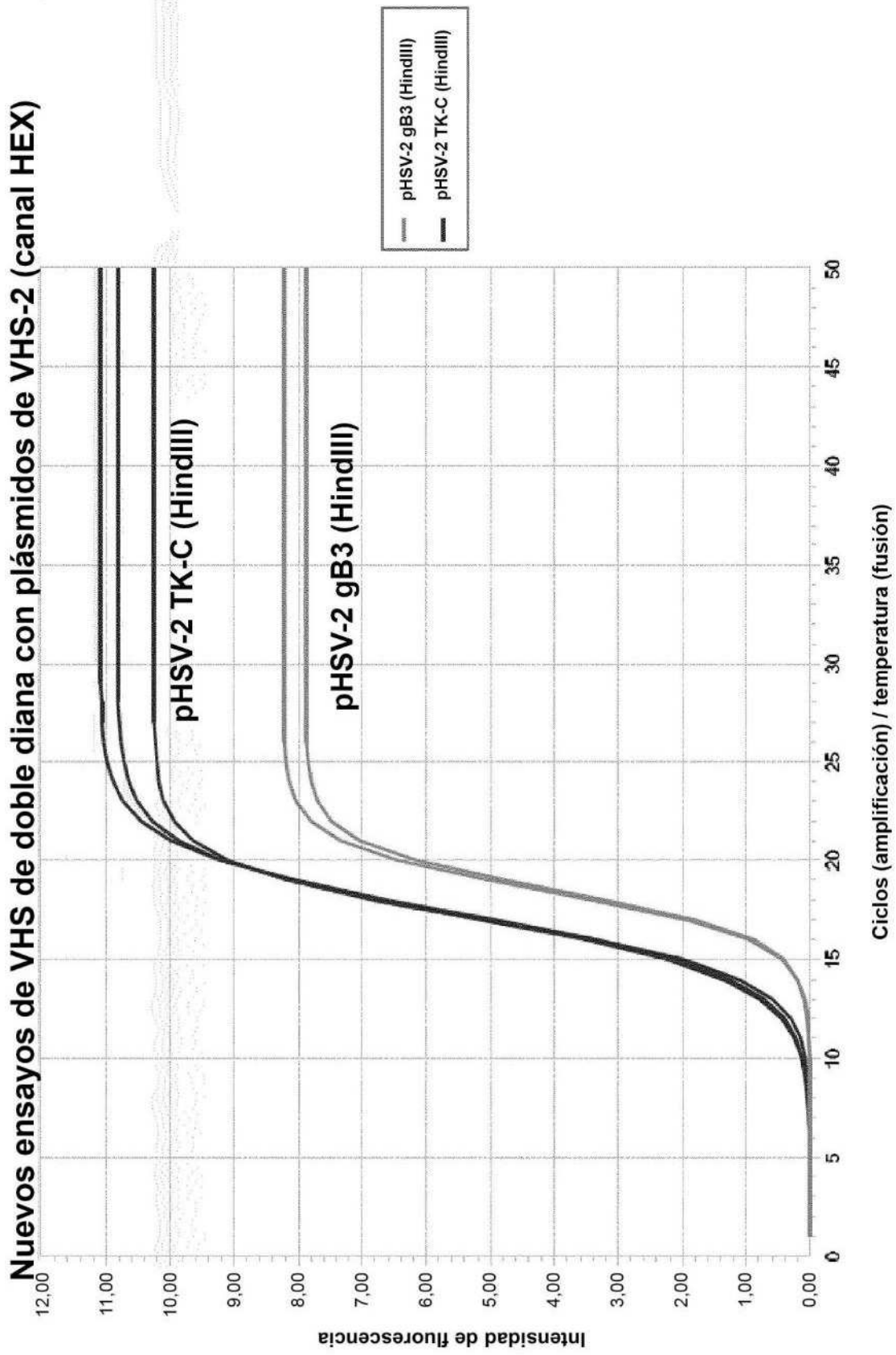


FIGURA 13B

Nombre del virus	Forma	Concentración de prueba	Valor Ct		
			VHS-1	VHS-2	CI
Citomegalovirus (VHH-5)	ADN vírico	9,6E+06 c/ml	NaN	NaN	39,8
VHH-6B (Roseolovirus)	ADN vírico	1,4E+06 DICT50/ml	NaN	NaN	38,9
VHH-7 (Roseolovirus)	ADN vírico	1,1E+06 DICT50/ml	NaN	NaN	39,2
VHH-8 (Roseolovirus)	ADN vírico	4,2E+04 DICT50/ml	NaN	NaN	39,7
Virus de la varicela-zóster (cepa 275, línea celular MRC-5)	Partícula vírica	2,3E+07 c/ml	NaN	NaN	39
Virus de la varicela-zóster (cepa aislada D, línea celular CV-1)	Partícula vírica	2,5E+04 DICT50/ml	NaN	NaN	38,6

FIGURA 14