



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 354 020**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05715271 .2**

96 Fecha de presentación : **08.02.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1716257**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.11.2006**

54 Título: **Nuevos cebadores y sondas para la detección del parvovirus B19.**

30 Prioridad: **10.02.2004 EP 04002854**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.03.2011

73 Titular/es: **ROCHE DIAGNOSTICS GmbH**
Sandhofer Strasse 116
68305 Mannheim, DE
F. Hoffmann-La Roche AG.

72 Inventor/es: **Schorling, Stefan**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 354 020 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).

DESCRIPCION

NUEVOS CEBADORES Y SONDAS PARA LA DETECCIÓN DEL PARVOVIRUS
B19

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevos cebadores y sondas para la detección del parvovirus B19, así como a kits que contienen los mismos. Asimismo, la invención se refiere a métodos en los que pueden utilizarse los nuevos cebadores y sondas, en particular a métodos homogéneos de reacción en cadena de la polimerasa. Además, la invención se refiere a usos de los nuevos cebadores y sondas.

Antecedentes de la invención

La infección por el parvovirus B19 es una enfermedad infantil común que habitualmente sigue un curso leve en individuos inmunocompetentes, produciendo una erupción característica conocida como eritema infeccioso o enfermedad quinta (Anderson M.J. *et al.*, Lancet 1:1378, 1983). La infección puede verse complicada por artralgia severa o una crisis aplásica transitoria en individuos que sufren de enfermedad hemolítica crónica (J.R. *et al.*, Lancet 1:664-665, 1981). La anemia congénita y la vasculitis también han sido descritas (Cohen B., BMJ 311:1549-1552, 1995). Más recientemente, el virus se ha asociado a hepatitis y a miocarditis (Yoto Y. *et al.*, Lancet 347:868-9, 1996; Enders G. *et al.*, Clin. Infect. Dis. 26:355-358, 1998; Dux S. *et al.*, Dtsch Med. Wochenschr. 127:1584-1588, 2002). Tras la infección materna durante el embarazo, el virus puede ser transmitido al feto, causando hidrops, aborto espontáneo o muerte intrauterina (Enders E: Infections of the fetus and the neonate other than rubella. Topley & Wilson's

Microbiology and Microbial Infections. Editado por Collier L., London, Edward Arnold, 1998, páginas 873 a 915). Aparte de la transmisión por la vía respiratoria, la infección por el parvovirus B19 también puede producirse a través de sangre y productos sanguíneos contaminados (Brown K.E., Baillieres Best Pract.Res.Clin.Haematol. 13:245-259, 2000). Lo último ha sido reconocido por la U.S. Food and Drug Administration, resultando en una propuesta de que el ensayo de ácidos nucleicos (NAT) de parvovirus B19 se considere un ensayo realizado durante el proceso y no el cribado de donantes.

En el campo del diagnóstico molecular, la detección de ácidos nucleicos diana con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) desempeña un papel importante. El cribado rutinario de bancos de sangre para la presencia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o el virus de la hepatitis B (VHB) o C (VHC) es un ejemplo de la aplicación a gran escala del diagnóstico basado en la PCR. Los sistemas automatizados para el análisis basado en la PCR con frecuencia utiliza la detección en tiempo real de la amplificación de producto durante el procedimiento de la PCR. Resulta crucial para dichos métodos la utilización de oligonucleótidos modificados que portan grupos informadores o marcajes. La detección de productos de amplificación de ADN generados mediante un procedimiento de PCR pueden, por una parte, conseguirse en etapas de trabajo separadas. Éstas pueden implicar la caracterización de fragmentos amplificados con respecto a su movilidad electroforética y/o el análisis de productos de amplificación desnaturalizados

unidos a un soporte sólido utilizando una sonda de hibridación.

Por otra parte, la detección de productos de amplificación del ADN puede realizarse en un sistema de ensayo denominado "homogéneo". Un sistema de ensayo "homogéneo" comprende moléculas informadoras o marcajes que generan una señal mientras se amplifica la secuencia diana. Un ejemplo de un sistema de ensayo "homogéneo" es el sistema TaqMan[®], que se ha detallado en las patentes US n° 5.210.015, n° 5.804.375 y n° 5.487.972. Brevemente, el método se basa en una sonda doblemente marcada y la actividad exonucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa Taq. La sonda es complementaria a la secuencia diana que debe amplificarse mediante el procedimiento de PCR y se localiza entre los dos cebadores de PCR durante cada etapa de ciclo de polimerización. La sonda presenta dos marcajes fluorescentes unidos a la misma. Uno es un pigmento informador, tal como 6-carboxifluoresceína (FAM), el espectro de emisión de la cual se encuentra inhibido mediante transferencia energética debido a la proximidad especial de un segundo pigmento fluorescente, 6-carboxi-tetrametil-rodamina (TAMRA). Durante el curso de cada ciclo de amplificación, la ADN polimerasa Taq durante el procedimiento de alargamiento de una cadena de ADN cebada desplaza y degrada la sonda apareada, debiéndose esto último a la actividad exonucleasa 5' a 3' intrínseca de la polimerasa. El mecanismo también libera la sonda apareada de la actividad inhibidora de TAMRA. En consecuencia, la actividad fluorescente se incrementa a medida que se incrementa el corte de la sonda, lo que es proporcional a la

cantidad de producto de PCR formado. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la secuencia diana amplificada se mide mediante la detección de la intensidad de marcaje fluorescente liberado. Otro ejemplo de sistemas de ensayo

5 "homogéneos" se proporciona en los formatos utilizados en el instrumento LightCycler® (ver, por ejemplo, la patente US n° 6.174.670), algunos de ellos denominados en ocasiones formatos de "sonda kissing". Nuevamente, el principio se basa en dos pigmentos interactuantes que, sin embargo, se

10 caracterizan porque la longitud de onda de emisión de un pigmento donante excita un pigmento aceptor mediante transferencia energética por resonancia fluorescente. Recientemente se ha introducido el instrumento AmpliPrep COBAS® (Roche Diagnostics GmbH, D-68305 Mannheim, Alemania)

15 para expandir la automatización mediante el aislamiento de secuencias diana utilizando sondas de captura biotiniladas específicas de secuencia conjuntamente con partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina (Jungkind D., J. Clin. Virol. 20:1-6, 2001; Stelzl E. et al., J. Clin. Microbiol. 40:1447-1450, 2002).

20 Recientemente se ha unido una herramienta versátil adicional, el kit de aislamiento de ácidos nucleicos totales (TNAI) (Roche Diagnostics). Este reactivo de uso en laboratorio permite el aislamiento genérico, no específico de secuencia, de todos los ácidos

25 nucleicos presentes en plasma y suero en el instrumento AmpliPrep COBAS® basándose esencialmente en el método desarrollado por Boom R. et al., J. Clin. Microbiol. 28:495-503, 1990.

Los sistemas de ensayo para el parvovirus B19 se dan a

30 conocer en la publicación de patente japonesa no examinada

n° 147986/1995, o por Schorling S. *et al.*, J. Mol. Diagn. 6:37-41, 2004. Los cebadores para la detección del parvovirus B19 de la región VP1 o VP2 se dan a conocer en la patente US n° 6.274.307. La clonación de VP1 y de VP2 se dan a conocer en la patente JP n° 04088985. Se da a conocer una sonda para el parvovirus RA-1 en la patente EP n° 238 893, y las sondas para el parvovirus B19 en la patente WO n° 01/06019. El gen NS1 y sondas del mismo se dan a conocer en la patente EP n° 783 580. La detección basada en la PCR del parvovirus B19 se describe en la patente RU n° 2146372. Se describe una secuencia de ácidos nucleicos de un eritrovirus específico en la patente WO n° 99/28439. La patente WO n° 03/002753 describe un ensayo diagnóstico del parvovirus B19. La patente WO n° 02/00924 describe la fosfolipasa A2 parvovírica. Se describe un método para determinar grandes cantidades de parvovirus B19 en la patente US n° 6.183.999. El ensayo para detectar parvovirus B19 se da a conocer en la patente WO n° 01/14593. Se dan a conocer constructos de control de ADN en la patente WO n° 02/096925. Se describen partículas de tipo parvovirus en la patente WO n° 91/04330. La patente JP n° 11221099 describe la amplificación por PCR del parvovirus B19. Se da a conocer un método para tratar las infecciones por parvovirus B19 en la patente US n° 6.268.349. Se describen vehículos de administración génica autónomos del parvovirus B19 en la patente US n° 5.585.254 y en las patentes US correspondientes y en la patente WO n° 00/24917.

La secuencia del parvovirus B19 se describe en Shade R.O. *et al.*, J. Virol. 58:921-936, 1986, y el análisis del genoma se describe en Cotmore S.F. *et al.*, J. Virol. 60:548-

557, 1986, y en Ozawa K. *et al.*, J. Virol. 62:2508-2511, 1988. Se describe un método de detección del parvovirus B19 en Sato K. *et al.*, J. Clin. Microbiol. 38:1241-1243, 2000, Cubie H.A. *et al.*, Mol. Cell Probes 9:59-66, 1995; Jordan J.A. *et al.*, Mol. Diagn. 1:321-328, 1996; Vassias I. *et al.*, J. Virol. Meth. 44:329-338, 1993, y Carriere C. *et al.*, J. Virol. Methods 44:221-234, 1993, y Holloway B. *et al.*, Nucleic Acids Res. 21:3905-3906, 1993. La región VP1 se analiza en Dorsch S. *et al.*, J. Gen. Virol. 82:191-199, 10 2001, y en Takahashi N. *et al.*, FEBS Lett. 450:289-293, 1999. La región NS1 se analiza en Hicks K.E. *et al.*, Arch. Virol. 141:1319-1327, 1996. La variabilidad de las secuencias entre diferentes aislados de parvovirus B19 se describen en Hemauer A. *et al.*, J. Gen. Virol. 77:1781-1785, 15 1996; Umene K. y Nunoue T., J. Gen. Virol. 76:2645-2651, 1995; Erdman D.D. *et al.*, J. Gen. Virol. 77:2767-2774, 1996, y Astell *et al.*, J. Gen. Virol. 68:885-893, 1987, y Turton J. *et al.*, Epidemiol. Infect. 105:197-201, 1990.

La patente WO n° 99/28439 describe determinados 20 cebadores y sondas que resultan adecuados para la detección del eritrovirus V9 y B19. La patente US n° 6.395.472 da a conocer cebadores o sondas nucleicos oligómeros para la detección del virus TT. Schmidt *et al.* (Vox Sanguinis 81:228-235, 2001) dan a conocer la detección de parvovirus 25 B19 en agrupaciones de plasma y derivados de plasma

Descripción resumida de la invención

Debido a la importancia clínica del parvovirus B19, existe una necesidad de cebadores y sondas adicionales que puedan detectar el virus en muestras biológicas.

Por lo tanto, la invención proporciona un método para la detección de un ácido nucleico diana que comprende la secuencia de ácidos nucleicos del parvovirus B19 en una muestra que comprende las etapas siguientes:

5 (a) proporcionar una muestra que se sospecha que contiene el ácido nucleico diana,

(b) proporcionar una pareja de cebadores que comprende un primer y un segundo cebador, en la que el primer cebador consiste de la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID n° 15 y
10 en la que el segundo cebador consiste de la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID n° 17,

(c) amplificar el ácido nucleico diana,

(d) detectar el ácido nucleico diana amplificado de la etapa (c).

15 La invención proporciona además un método para la detección de un ácido nucleico diana que comprende la secuencia de ácidos nucleicos del parvovirus B19 en una muestra que comprende las etapas siguientes:

(a) proporcionar una muestra que se sospecha que
20 contiene el ácido nucleico diana,

(b) proporcionar una pareja de cebadores que comprende un primer y un segundo cebador,

(c) amplificar el ácido nucleico diana,

(d) poner en contacto la muestra con una sonda bajo
25 condiciones para la unión de la sonda al ácido nucleico diana,

(e) detectar el producto de unión entre el ácido nucleico diana y la sonda como indicación de la presencia del ácido nucleico diana,

30 caracterizado porque:

el primer cebador consiste de la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID n° 15, y en la que el segundo cebador consiste de la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID n° 17, y

la sonda consiste de por lo menos 12 nucleótidos contiguos de secuencia de ácidos nucleicos SEC ID n° 5 o una
5 secuencia complementaria de la misma.

Se da a conocer adicionalmente en la presente memoria un oligonucleótido en el que la secuencia de ácidos nucleicos del oligonucleótido se selecciona de entre las
10 secuencias de ácidos nucleicos SEC ID n° 12 a 15, de entre las secuencias de ácidos nucleicos 10 ó 11, o de una secuencia complementaria de las mismas, o de la secuencia complementaria de las secuencias de ácidos nucleicos 16 ó 17.

En otra realización de la invención, se proporciona una
15 pareja de cebadores que comprende un primer y un segundo cebador, en la que la secuencia de ácidos nucleicos del primer cebador es SEC ID n° 15, y en la que la secuencia de ácidos nucleicos del segundo cebador es SEC ID n° 17.

Los oligonucleótidos o la pareja de cebadores según al
20 invención pueden utilizarse en una reacción de hibridación con un ácido nucleico complementario. En otra realización de la invención, los oligonucleótidos o la pareja de cebadores según la invención pueden utilizarse como un cebador, sonda
25 o sonda de captura.

La invención proporciona además un kit que comprende una ADN polimerasa dependiente de molde, nucleótidos y una pareja de cebadores según la invención.

Descripción detallada de la invención

Las técnicas convencionales de la biología molecular y la química de los ácidos nucleicos, que se encuentran comprendidas dentro de los conocimientos del experto en la materia, se explican en la literatura (ver, por ejemplo, 5 Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; Gait M.J., editor, 1984; *Nucleic Acid Hybridization*, Hames B.D. y Higgins S.J., editores, 1984, y una serie, *Methods in Enzymology*, Academic Press, Inc., la 10 totalidad de los cuales se incorpora como referencia en la presente memoria. La totalidad de las patentes, solicitudes de patente y publicaciones mencionadas en la presente memoria, tanto anteriormente como posteriormente, se incorpora como referencia en la presente memoria.

15 Antes de que los ácidos nucleicos puedan analizarse en uno de los ensayos anteriormente indicados, deben aislarse o purificarse a partir de muestras biológicas que contienen mezclas complejas de los diferentes componentes. Con frecuencia, para las primeras etapas, se utilizan 20 procedimientos que permiten el enriquecimiento de los ácidos nucleicos. Para liberar el contenido de las células o de las partículas víricas, deben tratarse con enzimas o con compuestos químicos para disolver, degradar o desnaturalizar las paredes celulares de las partículas víricas. Este 25 procedimiento se denomina comúnmente lisis. La solución resultante que contiene dicho material lisado se denominado "lisado". Un problema que aparece con frecuencia durante la lisis es que otros enzimas degradan el componente de interés, por ejemplo desoxirribonucleasas o ribonucleasas 30 degradadores de los ácidos nucleicos, que entran en contacto

con el componente de interés durante la lisis. Estos enzimas degradadores también pueden encontrarse presentes en el exterior de las células o pueden haber sido espacialmente separados en diferentes compartimientos celulares antes de la lisis y ahora entran en contacto con el componentes de interés. Otros componentes liberados durante este procedimiento pueden ser, por ejemplo, endotoxinas pertenecientes a la familia de los lipopolisacáridos, que resultan tóxicos para las células y pueden provocar problemas para productos destinados a la utilización en la terapia humana o animal.

Existe una diversidad de medios para abordar el problema indicado anteriormente. Es común utilizar agentes caotrópicos tales como, por ejemplo, tiocianato de guanidío o detergentes aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos o no iónicos en el caso de que se pretenda que los ácidos nucleicos sean liberados. También resulta ventajoso utilizar proteasas que degradan rápidamente estos enzimas o proteínas no deseadas. Sin embargo, esto puede producir otro problema, debido a que dichas sustancias o enzimas pueden interferir con reactivos o componentes en etapas posteriores.

Los enzimas que pueden utilizarse ventajosamente en dichos procedimientos de lisis o de preparación de muestras indicados anteriormente son enzimas que cortan los enlaces amida en los sustratos proteína y que se clasifican como proteasas o (intercambiabilmente) peptidasas (ver Walsh, *Enzymatic Reaction Mechanisms*, W.H. Freeman and Company, San Francisco, capítulo 3, 1979). Las proteasas que han sido utilizadas en la técnica anterior son, por ejemplo, proteasas alcalinas (patente WO n° 98/04730) o proteasas

ácidas (patente US nº 5.386.024). La proteasa que es
 ampliamente utilizada en la técnica anterior para la
 preparación de muestras para el aislamiento de ácidos
 nucleicos es la proteinasa K de *Tritirachium album* (ver, por
 5 ejemplo, Sambrook J. *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory
 Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring
 Harbor, New York, 1989), que se encuentra activa a un pH
 aproximadamente neutro y pertenece a la familia de las
 proteasas conocida para el experto en la materia como
 10 subtilisinas.

En las siguientes etapas de la preparación de las
 muestras posteriores a la etapa de lisis, el componente de
 interés se enriquece adicionalmente. En el caso de que los
 componentes no proteicos de interés sean, por ejemplo,
 15 ácidos nucleicos, normalmente se extraen de las mezclas
 complejas de lisis antes de ser utilizadas en un ensayo
 basado en sondas.

Existen varios métodos para la extracción de los ácidos
 nucleicos:

20 - métodos dependientes de la secuencia o
 bioespecíficos, tales como, por ejemplo:

- cromatografía de afinidad
- hibridación con sondas inmovilizadas

- métodos independientes de la secuencia o físico-
 25 químicos, tales como, por ejemplo:

- la extracción líquido-líquido con, por ejemplo,
 fenol-cloroformo
- precipitación con, por ejemplo, etanol puro
- extracción con papel de filtro

- extracción con agentes formadores de micelas, tales como bromuro de cetil-trimetil-amonio
 - unión a pigmentos intercalantes inmovilizados, por ejemplo derivados acridina
- 5
- adsorción a gel de sílice o tierras diatomáceas
 - adsorción a partículas de vidrio magnéticas (MGP) o a partículas de organosilano bajo condiciones caotrópicas

Resulta particularmente interesante con fines de
10 extracción la adsorción de ácidos nucleicos a una superficie de vidrio, aunque resultan posibles otras superficies. Se han propuesto muchos procedimientos en los últimos años para aislar ácidos nucleicos de su ambiente natural a partir de la utilización de su comportamiento de unión a superficies
15 de vidrio. En el caso de que la diana sean ácidos nucleicos no modificados, resulta preferente una unión directa de los ácidos nucleicos a un material con una superficie de sílice debido a que, entre otros motivos, los ácidos nucleicos no deben ser modificados e incluso pueden unirse ácidos
20 nucleicos nativos. Estos procedimientos se describen en detalle en diversos documentos. En Vogelstein B. *et al.*, Proc. Natl. Acad. USA 76:615-9, 1979, por ejemplo, se propone un procedimiento para la unión de ácidos nucleicos de geles de agarosa en presencia de yoduro sódico a vidrio
25 flint molido. La purificación de plásmido de ADN a partir de bacterias sobre vidrio en polvo en presencia de perclorato sódico se describe en Marko M.A. *et al.*, Anal. Biochem. 121:382-387, 1982. En el documento DE n° A 37 34 442, se describe el aislamiento de ADN monocatenario de fago M13
30 sobre filtros de fibra de vidrio mediante la precipitación

de las partículas fágicas utilizando ácido acético y la lisis de las partículas fágicas con perclorato. Los ácidos nucleicos unidos a los filtros de fibra de vidrio se lavan y después se eluyen con un tampón Tris/EDTA que contiene metanol. Se describe un procedimiento similar para purificar el ADN de fagos lambda en Jakobi R. et al., Anal. Biochem. 175:196-201, 1988. El procedimiento implica la unión selectiva de ácidos nucleicos a superficies de vidrio en soluciones salinas caotrópicas y separar los ácidos nucleicos de contaminantes tales como agarosa, proteínas o residuos celulares. Para separar las partículas de vidrio de los contaminantes, las partículas pueden centrifugarse o pasarse líquidos a través de los filtros de fibra de vidrio. Sin embargo, ésta es una etapa limitante que impide la utilización del procedimiento para el procesamiento de grandes cantidades de muestras. La utilización de partículas magnéticas para inmovilizar ácidos nucleicos tras la precipitación mediante la adición de sal y etanol resulta más ventajosa y se describe en, por ejemplo, Alderton R.P. et al., S., Anal. Biochem. 201:166-169, 1992 y en la patente PCT GB n° 91/00212. En este procedimiento, los ácidos nucleicos se aglutinan conjuntamente con las partículas magnéticas. El aglutinado se separa del solvente original mediante la aplicación de un campo magnético y llevando a cabo una etapa de lavado. Tras una etapa de lavado, los ácidos nucleicos se disuelven en un tampón Tris. Este procedimiento presenta una desventaja, sin embargo, en el aspecto de que la precipitación no es selectiva para ácidos nucleicos. Por el contrario, también se aglutina una diversidad de sustancias sólidas y disueltas. Como

resultado, este procedimiento no puede utilizarse para eliminar cantidades significativas de cualquier inhibidor de reacciones enzimáticas específicas que pueden encontrarse presentes. También se encuentra disponible comercialmente
5 vidrio poroso magnético que contiene partículas magnéticas en una matriz vítrea porosa particular y que se encuentra recubierta por una capa que contiene estreptavidina. Este producto puede utilizarse para aislar materiales biológicos, por ejemplo proteínas o ácidos nucleicos, en el caso de que
10 se modifiquen en una compleja etapa de preparación de manera que se unan covalentemente a la biotina. Los adsorbentes magnetizables particulares han demostrado ser muy eficientes y adecuados para la preparación automática de muestras. Los pigmentos ferrimagnéticos y ferromagnéticos, así como los
15 superparamagnéticos, se utilizan con este fin. Los MGPs y métodos más preferentes utilizando partículas vítreas magnéticas son los descritos en la patente WO n° 01/37291, que se incorpora como referencia en la presente memoria.

Tras la purificación o aislamiento de los ácidos
20 nucleicos que incluyen el ácido nucleico diana, a partir de su entorno natural, puede detectarse el ácido nucleico diana. Por lo tanto, en una realización de la invención, se proporciona un método para la detección de un ácido nucleico diana que comprende la secuencia de ácidos nucleicos del
25 parvovirus B19 en una muestra, comprendiendo las etapas siguientes:

(a) proporcionar una muestra que se sospecha que contiene el ácido nucleico diana, (b) proporcionar una pareja de cebadores que comprende un primer y un segundo
30 cebador, en la que el primer cebador consiste de la

secuencia de ácidos nucleicos SEC ID n° 15, y en la que el segundo cebador consiste de la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID n° 17,

(c) amplificar el ácido nucleico diana,

5 (d) detectar el ácido nucleico diana amplificado de la etapa (c).

Preferentemente, el método no comprende la etapa de proporcionar la muestra que se sospecha que contiene el ácido nucleico diana. Por lo tanto, en una realización de la invención, se proporciona un método para la detección de un ácido nucleico diana que comprende la secuencia de ácidos nucleicos del parvovirus B19 en una muestra, comprendiendo las etapas siguientes:

(a) amplificar el ácido nucleico diana en una muestra que se sospecha que contiene el ácido nucleico diana en presencia de una pareja de cebadores que comprende un primer y un segundo cebador, en la que el primer cebador consiste de la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID n° 15, y en la que el segundo cebador consiste de por lo menos 12 nucleótidos contiguos de una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada de entre la secuencia complementaria de las secuencias de ácidos nucleicos SEC ID n° 17, y

(b) detectar el ácido nucleico diana amplificado de la etapa (a).

25 Tal como es conocido de la técnica, un "nucleósido" es una combinación de base-azúcar. La parte base del nucleósido normalmente es una base heterocíclica. Las dos clases más comunes de dicha base heterocíclica son las purinas y las pirimidinas.

Los "nucleótidos" son "nucleósidos" que además incluyen un grupo fosfato unido covalentemente a la parte azúcar del nucleósido. Para aquellos "nucleósidos" que incluyen un azúcar pentafuranosilo, el grupo fosfato puede unirse al grupo 2', 3' ó 5'-hidroxilo del azúcar. Un "nucleótido" es la "unidad monomérica" de un "oligonucleótido", más generalmente denominado en la presente memoria "compuesto oligomérico" o "polinucleótido", más generalmente denominado "compuesto polimérico". Otra expresión general para el mismo es ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN).

Según la invención, un "compuesto oligomérico" es un compuesto que consiste de "unidades monoméricas" que pueden ser "nucleótidos" solos o "compuestos no naturales" (ver posteriormente), más específicamente "nucleótidos modificados" (o "análogos de nucleótidos") o "compuestos no nucleótidos", solos o en combinaciones de los mismos. Los "oligonucleótidos" y "oligonucleótidos modificados" (o "análogos oligonucleótidos") son subgrupos de "compuestos oligoméricos" en el contexto de la invención.

En el contexto de la presente invención, el término "oligonucleótido" se refiere a "polinucleótidos" formados a partir de una pluralidad de "nucleótidos" a modo de la "unidad monomérica", es decir, un "oligonucleótido" pertenece a un subgrupo específico de un "compuesto oligomérico" o "compuesto polimérico" de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) con "unidades monoméricas". Se hace referencia comúnmente a los grupos fosfato como formadores del esqueleto internucleósido del

"oligonucleótido". El enlace normal del esqueleto de ARN o ADN es un enlace 3' a 5' fosfodiéster.

Los "oligonucleótidos" y "oligonucleótidos modificados" (ver posteriormente) según la invención pueden sintetizarse tal como se describe principalmente en la técnica y que resulta conocido para el experto en la materia. Los métodos para preparar compuestos oligoméricos de secuencias específicas son conocidos de la técnica, y entre ellos se incluyen, por ejemplo, la clonación y restricción de secuencias apropiadas y la síntesis química directa. Entre los métodos de síntesis química pueden incluirse, por ejemplo, el método del fosfotriéster descrito por Narang S.A. *et al.*, *Methods in Enzymology* 68:90-98, 1979, el método del fosfodiéster de Brown E.L. *et al.*, *Methods in Enzymology* 68:109-151, 1979, el método de la fosforamidita dado a conocer en Beaucage *et al.*, *Tetrahedron Letters* 22:1859, 1981, y el método del H-fosfonato dado a conocer en Garegg *et al.*, *Chem. Scr.* 25:280-282, 1985, y el método del soporte sólido dado a conocer en la patente US n° 4.458.066.

Tal como se ha indicado anteriormente, un "ácido nucleico", así como el "ácido nucleico diana", es un compuesto polimérico de "nucleótidos", tal como es conocido por el experto en la materia. Se utiliza en la presente memoria para referirse a un "ácido nucleico" en una muestra que debe analizarse, es decir, la presencia, no presencia o cantidad del cual debe analizarse en una muestra. Por lo tanto, en otras palabras, el "ácido nucleico" es la diana y también puede denominarse, por lo tanto, "ácido nucleico diana". Por ejemplo, en el caso de que deba determinarse si la sangre contiene parvovirus B19, el "ácido nucleico diana"

es el ácido nucleico del parvovirus B19. La expresión "secuencia (de ácidos nucleicos) complementaria de una secuencia de ácidos nucleicos" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a que la secuencia (de ácidos nucleicos) complementaria a la que se hace referencia es exactamente el complemento (inverso) de la secuencia de ácidos nucleicos.

El término "cebador" se utiliza en la presente memoria es conocido por el experto en la materia y se refiere a "compuestos oligoméricos", principalmente "oligonucleótidos" aunque también "oligonucleótidos modificados", que son capaces de "cebar" la síntesis del ADN mediante una ADN polimerasa dependiente de molde, es decir, el extremo 3' del, por ejemplo, oligonucleótido, proporciona un grupo 3'-OH libre en el que pueden unirse "nucleótidos" adicionales por una ADN polimerasa dependiente de molde, estableciendo un enlace 3' a 5' fosfodiéster en el que se utilizan desoxinucleósidos-trifosfato y en el que se libera pirofosfato. Por lo tanto, no existe, excepto para la función pretendida, ninguna diferencia fundamental entre un "cebador", un "oligonucleótido" o una "sonda" según al invención. Tal como se utiliza en la presente memoria, las formas singulares "uno", "una" y "el" incluyen las referencias tanto singulares como plurales, a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "que comprende" situado antes de indicar las etapas en un método se refiere a que el método comprende una o más etapas que son adicionales a las indicadas expresamente, y que la etapa o etapas adicionales pueden llevarse a cabo antes,

durante y/o después de las etapas indicadas. Por ejemplo, un método que comprende las etapas a, b y c comprende un método con etapas a, b, x y c, un método con etapas a, b, c y x, así como un método con etapas x, a, b y c. Además, la expresión "que comprende" situada antes de indicar las etapas en un método no requiere (aunque podría requerirlo) la realización secuencial de las etapas indicadas, a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Por ejemplo, un método que comprende las etapas a, b y c comprende, por ejemplo, un método de realización de las etapas en el orden de etapas a, c y b, en el orden de etapas c, b y a, y en el orden de etapas c, a y b, etc.

La amplificación se lleva a cabo preferentemente con la reacción en cadena de la polimerasa, que amplifica específicamente ácidos nucleicos diana hasta cantidades detectables. Otras reacciones de amplificación posibles son la reacción en cadena de la ligasa (LCR, Wu D.Y. y Wallace R.B., *Genomics* 4:560-69, 1989, y Barany F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193, 1991; la reacción en cadena de la polimerasa-ligasa (patente EP n° 0439182 A2), 3SR (Kwoh D.Y. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177, 1989; Guatelli J.C. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878, 1990; patente WO n° 92/08808) y NASBA (patente US n° 5.130.238). Además, existen la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), la amplificación mediada por la transcripción (TMA) y la amplificación Q_{β} (para una revisión, ver, por ejemplo, Whelen A.C. y Persing D.H., *Annu. Rev. Microbiol.* 50:349-373, 1996; Abramson R.D. y Myers T.W., *Curr. Opin. Biotechnol.* 4:41-47, 1993).

Los métodos de detección de ADN adecuados son conocidos por el experto en la materia y se describe en libros de texto estándares, tales como Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, y en Ausubel F. *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, J. Wiley and Sons, NY, 1987. También pueden realizarse etapas de purificación adicionales antes de realizar la etapa de detección del ADN, tales como, por ejemplo, una etapa de precipitación. Entre los métodos de detección pueden incluirse, aunque sin limitarse a ellos, la unión o intercalado de pigmentos específicos, tales como bromuro de etidio, que se intercala en el ADN de doble cadena y modifica su fluorescencia posteriormente. El ADN purificado también puede separarse mediante métodos electroforéticos, opcionalmente tras una digestión de restricción, y visualizarse posteriormente. También existen ensayos basados en sondas que explotan la hibridación de oligonucleótidos a secuencias específicas y la detección posterior del híbrido. También resulta posible secuenciar el ADN tras etapas adicionales conocidas por el experto en la materia. La ADN polimerasa dependiente de molde preferente es la polimerasa Taq.

Una realización preferente de la invención es, por lo tanto, el método de purificación anteriormente descrito, seguido de una etapa de determinación o detección, o métodos de purificación seguidos de una etapa de amplificación y determinación o detección. En otra realización de la invención, se proporciona un método para la detección de un ácido nucleico diana que comprende la secuencia de ácidos

nucleicos del parvovirus B19 en una muestra, comprendiendo las etapas siguientes:

(a) proporciona una muestra que se sospecha que contiene el ácido nucleico diana,

5 (b) proporcionar una pareja de cebadores que comprende un primer y un segundo cebador,

(c) amplificar el ácido nucleico diana,

(d) poner en contacto la muestra con una sonda bajo condiciones para la unión de la sonda al ácido nucleico
10 diana,

(e) detectar el producto de unión entre el ácido nucleico diana y la sonda a modo de indicación del a presencia del ácido nucleico diana,

caracterizado porque:

15 el primer cebador consiste de la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID n° 15, y en la que el segundo cebador consiste de la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID n° 17, y la sonda consiste de por lo menos 12 nucleótidos contiguos de secuencia de ácidos nucleicos SEC ID n° 5, o
20 una secuencia complementaria de la misma.

Preferentemente, el método no comprende la etapa de proporciona la muestra que se sospecha que contiene el ácido nucleico diana. Por lo tanto, en otra realización de la invención, se proporciona un método para la detección de un
25 ácido nucleico diana que comprende la secuencia de ácidos nucleicos del parvovirus B19 en una muestra, comprendiendo las etapas siguientes:

(a) amplificar el ácido nucleico en una muestra que se sospecha que contiene el ácido nucleico diana en presencia

de una pareja de cebadores que comprende un primer y un segundo cebador,

(b) poner en contacto la muestra de la etapa (a) con una sonda bajo condiciones para la unión de la sonda al
5 ácido nucleico diana,

(c) detectar el producto de unión entre el ácido nucleico diana y la sonda a modo de indicación de la presencia del ácido nucleico diana,

caracterizado porque:

10 el primer cebador consiste de la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID n° 15, y en la que el segundo cebador consiste de por lo menos 12 nucleótidos contiguos de una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada de entre la secuencia complementaria de las secuencias de ácidos
15 nucleicos SEC ID n° 17, y

la sonda consiste de por lo menos 12 nucleótidos contiguos de la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID n° 5, o una secuencia complementaria de la misma.

El término "sonda" se refiere a ácidos nucleicos (ADN o
20 ARN) producidos sintéticamente o biológicamente que, en virtud de su diseño o selección, contienen secuencias de nucleótidos específicas que les permiten hibridarse bajo astringencias predeterminadas definidas de modo específico (es decir, preferentemente) a "ácidos nucleicos diana". Una
25 "sonda" puede identificarse como una "sonda de captura", haciendo referencia a que "captura" el ácido nucleico diana de manera que pueda separarse de materiales no deseables que podrían dificultar su detección. Tras conseguirse la separación, puede llevarse a cabo la detección del "ácido
30 nucleico diana" capturado, utilizando un procedimiento

adecuado. Las "sondas de captura" con frecuencia ya se encuentran unidas a una fase sólida.

En el método según la invención, la sonda consiste preferentemente de por lo menos 12 nucleótidos contiguos de
5 secuencia de ácidos nucleicos SEC ID n° 10, o una secuencia complementaria de la misma. Preferentemente, la sonda consiste de por lo menos 15 ó 18 nucleótidos contiguos de las secuencias de ácidos nucleicos de la invención. Más preferentemente, la sonda presente la secuencia de ácidos
10 nucleicos SEC ID n° 11 o una secuencia complementaria de la misma.

El método según la invención puede llevarse a cabo en una formato para la utilización en el instrumento LightCycler® que se describe en la patente US n° 6.174.670.
15 Este formato comprende la amplificación y detección en donde ésta última aplica la detección de la fluorescencia para la detección del producto de unión entre una pareja de sondas y el ácido nucleico diana. Estos formatos aplican la tecnología de transferencia energética de resonancia
20 fluorescente (ver, por ejemplo, las patentes US n° 4.996.142, n° 5.565.322, n° 5.849.489 y n° 6.162.603) y se basan en el hecho de que, en el caso de que un donante y un marcaje fluorescente aceptor correspondiente, se sitúan dentro de una determinada distancia entre ellos, tiene lugar
25 transferencia energética entre los dos marcajes fluorescentes que puede visualizarse o detectarse de otro modo y/o cuantificarse. Tal como se utiliza en la presente memoria, dos sondas, conteniendo cada una un marcaje fluorescente, en las que por lo menos una de las mismas es
30 un oligonucleótido según la invención, pueden hibridarse a

un producto de amplificación en posiciones particulares determinadas a partir de la complementariedad de las sondas respecto al ácido nucleico diana. El marcaje fluorescente según la invención del oligonucleótido según la invención
5 puede ser un marcaje fluorescente donante o aceptor. Tras la hibridación de las sondas con el producto de amplificación en las posiciones apropiadas, se genera una señal FRET. Puede llevarse a cabo el análisis fluorescente utilizando, por ejemplo, un sistema de microscopía epifluorescente de
10 recuento de fotones (que contiene el espejo dicroico apropiado y filtros para el seguimiento de la emisión fluorescente en el intervalo particular), un sistema fotomultiplicador de recuento de fotones, o un fluorímetro. La excitación para iniciar la transferencia energética puede
15 llevarse a cabo con un láser iónico 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 apropiadamente filtrada para la excitación en el intervalo deseado. Tal como se utiliza en la presente memoria con
20 respecto a los marcajes fluorescentes donante y aceptor correspondiente, el término "correspondiente" se refiere a un marcaje fluorescente aceptor que presenta un espectro de excitación que se solapa con el espectro de emisión del marcaje fluorescente donante. De acuerdo con lo anterior,
25 puede producirse una transferencia energética no radiante eficiente entre ellos. El marcaje fluorescente preferente es la fluoresceína como marcaje fluorescente donante, en el que el marcaje fluorescente aceptor es la rodamina; sin embargo, resulta preferente un pigmento cianina, preferentemente Cy5,
30 tal como se describe en la patente US nº 6.174.670.

Los "marcajes", con frecuencia denominados "grupos informadores" son generalmente grupos que convierten en distinguible a un ácido nucleico, en particular al "compuesto oligomérico" o al "oligonucleótido modificado" según la invención, así como cualquier ácido nucleico unido al mismo, respecto del resto del líquido, es decir, la muestra (los ácidos nucleicos a los que se encuentra unido un "marcaje" también pueden denominarse compuestos de unión a ácidos nucleicos marcados, sondas marcadas o simplemente sondas). Los marcajes preferentes según la invención son marcajes fluorescentes que son, por ejemplo, pigmentos fluorescentes, tales como un pigmento fluoresceína, un pigmento rodamina, un pigmento cianina, y un pigmento coumarina.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "relación de transferencia energética por resonancia fluorescente" y expresiones similares se refieren a la hibridación contigua de un "oligonucleótido" marcado con un "marcaje fluorescente donante" y de otro "compuesto oligomérico" marcado con un "marcaje fluorescente aceptor" con un "ácido nucleico diana" de manera que el "marcaje fluorescente donante" pueda transferir energía resonante al "marcaje fluorescente aceptor", de manera que el "marcaje fluorescente aceptor" produce una emisión fluorescente medible. En el caso de que el "marcaje fluorescente donante" y el "marcaje fluorescente aceptor" se encuentren separados por una distancia excesiva, el "marcaje fluorescente donante" no podrá transferir energía resonante al "marcaje fluorescente aceptor", de manera que el "marcaje fluorescente aceptor" emita fluorescencia medible, y por lo

tanto el "marcaje fluorescente donante" y el "marcaje fluorescente aceptor" no se encontrarán en relación de transferencia energética resonante.

En una realización preferente de la invención, la sonda
5 porta un marcaje. Preferentemente, se pone en contacto una sonda adicional que porta un marcaje con la muestra en la etapa d) de manera que se ponga en contacto una pareja de sondas que consiste de una primera y una segunda sonda con la muestra en la etapa d).

10 En una realización preferente de la invención, se proporciona un método según la invención en el que dicha etapa de amplificación c) en el método según la invención comprende poner en contacto la muestra con dicha pareja de cebadores para producir un producto de amplificación en el
15 caso de que el ácido nucleico diana se encuentre presente en dicha muestra, en el que dicha etapa de hibridación d) comprende poner en contacto dicha muestra con la pareja de sondas, en el que los miembros de dicha pareja de sondas se hibridan con dicho producto de amplificación a menos de
20 cinco nucleótidos uno de otro, en el que la primera sonda de dicha pareja de sondas se encuentra marcada con un marcaje fluorescente donante y en el que la segunda sonda de dicha pareja de sondas se encuentra marcada con un marcaje fluorescente aceptor correspondiente; y detectar el producto
25 de unión entre el ácido nucleico diana y la pareja de sondas en la etapa e) mediante la detección de la presencia o ausencia de transferencia energética por resonancia fluorescente entre dicho marcaje fluorescente donante de dicha primera sonda y dicho marcaje fluorescente aceptor de
30 dicha segunda sonda, en el que la presencia de transferencia

energética por resonancia fluorescente es indicativa de la presencia del ácido nucleico diana en la muestra, y en el que la ausencia de transferencia energética por resonancia fluorescente es indicativa de la ausencia del ácido nucleico diana en la muestra.

Por lo tanto, en una realización de la invención, se proporciona un método para detectar la presencia o ausencia de un ácido nucleico diana que comprende la secuencia de ácidos nucleicos del parvovirus B19 en una muestra, que comprende las etapas de realizar por lo menos una etapa de ciclado, en donde una etapa de ciclado comprende una etapa de amplificación y una etapa de hibridación, en donde dicha etapa de amplificación comprende poner en contacto dicha muestra con cebadores, en la que un cebador es un oligonucleótido según la invención, con el fin de producir un producto de amplificación en el caso de que el ácido nucleico diana se encuentre presente en dicha muestra, en donde dicha etapa de hibridación comprende poner en contacto dicha muestra con la pareja de sondas, en la que los miembros de dicha pareja de sondas se hibridan con dicho producto de amplificación a no más de cinco nucleótidos uno de otro, en donde una primera sonda de dicha pareja de sondas se encuentra marcada con un marcaje fluorescente donante y en donde una segunda sonda de dicha pareja de sondas se encuentra marcada con un marcaje fluorescente aceptor correspondiente, en la que una sonda puede ser un oligonucleótido según la invención; y detectar la presencia o ausencia de transferencia energética por resonancia fluorescente entre dicho marcaje fluorescente donante de dicha primera sonda y dicho marcaje fluorescente aceptor de

dicha segunda sonda, en donde la presencia de FRET es indicativa de la presencia del ácido nucleico diana en la muestra, y en donde la ausencia de FRET es indicativa de la ausencia del ácido nucleico diana en la muestra.

5 En otra realización preferente de la invención, se proporciona un método para detectar un ácido nucleico diana que comprende la secuencia de ácidos nucleicos del parvovirus B19 en una muestra, que comprende las etapas de amplificar el ácido nucleico mediante reacción en cadena de
10 la polimerasa en presencia de dos sondas de ácidos nucleicos, en la que una sonda puede ser un oligonucleótido según la invención, que se hibrida con regiones contiguas del ácido nucleico diana, encontrándose una de dichas sondas marcada con un marcaje fluorescente aceptor y encontrándose
15 la otra sonda marcada con un marcaje fluorescente donante de una pareja de transferencia energética fluorescente, de manera que, tras la hibridación de las dos sondas con el ácido nucleico diana, los marcajes fluorescentes donante y aceptor se encuentran a menos de 25 nucleótidos uno de otro,
20 comprendiendo dicha reacción en cadena de la polimerasa las etapas de añadir una polimerasa termoestable, nucleótidos y cebadores, en donde un cebador puede ser un oligonucleótido según la invención para el ácido nucleico diana en la muestra, y ciclar térmicamente la muestra entre por lo menos
25 una temperatura de desnaturalización y una temperatura de alargamiento; excitar la muestra biológica con luz a una longitud de onda absorbida por el marcaje fluorescente donante, y detectar la emisión fluorescente de la pareja de transferencia energética fluorescente.

En otra realización preferente de la invención, se proporciona un método para la detección de un ácido nucleico diana que comprende la secuencia de ácidos nucleicos del parvovirus B19 en la muestra, que comprende las etapas de
5 amplificar el ácido nucleico mediante reacción en cadena de polimerasa en presencia de dos sondas de ácidos nucleicos, en donde una sonda puede ser un oligonucleótido según la invención, que se hibridan con regiones contiguas del ácido nucleico, encontrándose marcada una de dichas sondas con un
10 marcaje fluorescente aceptor y encontrándose la otra sonda marcada con un marcaje fluorescente donante de una pareja de transferencia energética fluorescente, de manera que, tras la hibridación de las dos sondas con el ácido nucleico diana, los marcajes fluorescentes donante y aceptor se
15 encuentran a menos de 25 nucleótidos uno de otro, comprendiendo dicha reacción en cadena de polimerasa las etapas de añadir una polimerasa termoestable, nucleótidos y cebadores, en donde un cebador puede ser un oligonucleótido según la invención, para el ácido nucleico diana a la
20 muestra, y ciclar térmicamente la muestra entre por lo menos una temperatura de desnaturalización y una temperatura de alargamiento; excitar la muestra con luz a una longitud de onda absorbida por el marcaje donante y realizar un seguimiento de la fluorescencia dependiente de la
25 temperatura procedente de la pareja de transferencia energética fluorescente.

En una realización preferente del método de la invención, el formato utilizado en el ensayo TaqMan[®] se encuentra contemplado. Este formato comprende la
30 amplificación y detección, en donde ésta última utiliza la

detección de la fluorescencia para la detección del producto de unión de la sonda y el ácido nucleico diana. Por lo tanto, la sonda, que puede ser un oligonucleótido según la invención, comprende un marcaje, que preferentemente es un marcaje fluorescente, preferentemente fluoresceína. La sonda puede comprender además otros marcajes fluorescentes, en donde la longitud de onda de emisión de uno de los marcajes fluorescentes se solapa con la longitud de onda de absorción de otro de los marcajes fluorescentes.

5

10 Preferentemente, la sonda comprende además un segundo marcaje fluorescente que actúa como agente inhibidor, que inhibe la emisión fluorescente del marcaje fluorescente, que puede ser fluoresceína. Preferentemente, el agente inhibidor es una rodamina o cianina fluorescente. El agente inhibidor

15 también puede ser un compuesto o pigmento no fluorescente, tal como dabcilo ("inhibidor oscuro"). La sonda no puede ser extendida enzimáticamente para utilizarse como sonda en el formato TaqMan[®], tal como se explica principalmente en las patentes US n° 5.210.015, n° 5.478.972 o n° 5.804.375.

20 Preferentemente, la unidad monomérica en el extremo 3' del compuesto oligomérico es un 2',3'-desoxinucleótido o un nucleótido 3'-fosforilado. En consecuencia, para el formato utilizado en el ensayo TaqMan[®], en la etapa de determinación del método, la relación espacial entre el marcaje

25 fluorescente y el segundo marcaje, es decir el agente inhibidor, tras la alteración de la hibridación, preferentemente mediante hidrólisis de exonucleasa de una ADN polimerasa dependiente de molde, preferentemente la polimerasa Taq, de la sonda, de manera que se produce la

30 liberación del marcaje como resultado de la hidrólisis por

exonucleasa. Por lo tanto, en el método según la invención, el ácido nucleico diana en la etapa c) se amplifica con una ADN polimerasa dependiente de molde. El grado de hibridación entre el compuesto oligomérico según la invención y el ácido nucleico se determina a partir de la cantidad de marcaje que se libera de la sonda posteriormente a la hibridación. Por lo tanto, es una realización preferente de la invención que en la etapa (d), se determine el grado e hibridación a partir de la cantidad de marcaje que se libera de la sonda hibridada con el ácido nucleico mediante hidrólisis por exonucleasa por la ADN polimerasa dependiente de molde.

Por lo tanto, más preferentemente, la sonda, que puede ser un oligonucleótido según la invención, porta un primer y un segundo marcajes. En la realización más preferente, en la etapa (e) el grado de hibridación del producto de unión de la sonda y el ácido nucleico diana se determina a partir de la cantidad del primer o segundo marcajes fluorescentes que se liberan de la sonda hibridada con el ácido nucleico diana mediante hidrólisis por exonucleasa por la ADN polimerasa dependiente de molde.

En una realización muy preferente de la invención relacionada en mayor detalle con el formato de ensayo TaqMan[®], se proporciona un método para la detección de un ácido nucleico diana que comprende la secuencia de ácidos nucleicos del parvovirus B19 en una muestra, que comprende las etapas siguientes:

(a) poner en contacto una muestra que comprende ácidos nucleicos monocatenarios con una sonda que contiene un primer y un segundo marcajes fluorescentes, y en la que dicha sonda contiene una secuencia complementaria a una

segunda región de la misma cadena de la secuencia diana de ácidos nucleicos pero que no incluye la secuencia de ácidos nucleicos definida por los cebadores, creando una mezcla de dúplex durante las condiciones de hibridación, en donde los
5 dúplex comprenden el ácido nucleico diana apareado con los cebadores y con la sonda, de manera que el extremo 3' del primer cebador se encuentra cadena arriba del extremo 5' de la sonda,

(b) mantener la mezcla de la etapa (a) que presenta una
10 actividad de nucleasa 5' a 3' bajo condiciones suficientes para permitir que la actividad de nucleasa 5' a 3' de la polimerasa corte la sonda apareada y libere los fragmentos marcados, y

(c) detectar y/o medir la liberación de los fragmentos
15 marcados.

Para el método anteriormente descrito, los ácidos nucleicos pueden encontrarse presentes en forma de doble cadena o de una sola cadena, en donde los ácidos nucleicos de doble cadena se desnaturalizan, es decir, se convierten
20 en ácidos nucleicos de una sola cadena, antes de llevar a cabo el método mediante calentamiento, es decir, mediante desnaturalización térmica.

En otra realización preferente, un cebador y/o la sonda pueden modificarse químicamente, es decir, el cebador y/o la
25 sonda comprenden un nucleótido modificado o un compuesto no nucleótido. La sonda o el cebador en este caso es un oligonucleótido modificado.

Los "nucleótidos modificados" (o "análogos de nucleótido") difieren de un "nucleótido" natural en alguna
30 modificación, pero todavía consisten de una base, un azúcar

pentafuranosilo, una parte fosfato, de tipo base, de tipo
azúcar pentofuranosilo y una parte de tipo fosfato, o
combinaciones de las mismas. Por ejemplo, puede unirse un
"marcaje" a la parte base de un "nucleótido", de manera que
5 se obtenga un "nucleótido modificado". Una base natural en u
"nucleótido" también puede sustituirse mediante, por
ejemplo, una 7-desazapurina, en la que también se obtiene un
"nucleótido modificado". Las expresiones "nucleótido
modificado" o "análogo de nucleótido" se utilizan
10 intercambiabilmente en la presente solicitud. Un "nucleósido
modificado" (o "análogo de nucleósido") difiere de un
nucleósido natural en alguna modificación del modo indicado
de manera general anteriormente para un "nucleótido
modificado" (o para un "análogo de nucleótido").

15 Un "compuesto no nucleótido" es diferente de un
"nucleótido" natural aunque todavía es capaz, en el sentido
de la presente invención, de manera similar a un
"nucleótido", de ser una "unidad monomérica" de un
"compuesto oligomérico". Por lo tanto, un "compuesto no
20 nucleótido" debe ser capaz de formar un "compuesto
oligomérico" con "nucleótidos". Incluso los "compuestos no
nucleótidos" pueden contener partes de tipo base, de tipo
azúcar pentafuranosilo o de tipo fosfato, sin embargo, no
todas ellas se encuentran presentes simultáneamente en un
25 "compuesto no nucleótido".

Un "oligonucleótido modificado" (o "análogo de
nucleótido") pertenece a otro subgrupo específico de los
"compuestos oligoméricos", que presentan uno o más
"nucleótidos", uno o más "compuestos no nucleótidos" o
30 "nucleótidos modificados" como "unidades monoméricas". De

esta manera, las expresiones "oligonucleótido modificado" (o "análogo de oligonucleótido") se refieren a estructuras que funcionan de una manera sustancialmente similar a los "oligonucleótidos" y se utilizan intercambiabilmente en la totalidad de la solicitud. Desde un punto de vista sintético, un "oligonucleótido modificado" (o un "análogo de nucleótido") puede prepararse, por ejemplo, mediante modificación química de "oligonucleótidos" mediante modificación apropiada del esqueleto de fosfatos, unidades de ribosa o bases nucleotídicas (Uhlmann y Peyman, Chemical Reviews 90:543, 1990; Verma S. y Eckstein F., Annu. Rev. Biochem. 67:99-134, 1998). Entre las modificaciones representativas se incluyen fosforotioato, fosforoditioato, fosfonato de metilo, enlaces inter-nucleósido fosfotriéster o fosforamidato en lugar de los enlaces inter-nucleósido fosfodiéster; deaza-purinas o aza-purinas o pirimidinas en lugar de las bases purina y pirimidina naturales, bases pirimidina que presentan grupos sustituyentes en la posición 5 ó 6; bases purina que presentan grupos sustituyentes alterados en las posiciones 2, 6 ó 8 o en la posición 7, tal como las 7-deazapurinas; azúcares que presentan grupos sustituyentes en, por ejemplo, su posición 2'; o análogos carbocíclicos o acíclicos de azúcar. Otras modificaciones consistentes con el espíritu de la presente invención son conocidas del experto en la materia. Dichos "oligonucleótidos modificados" (o "análogos de oligonucleótido") se describen mejor como funcionalmente intercambiables, aunque estructuralmente diferentes, de los "oligonucleótidos" naturales (u "oligonucleótidos" sintéticos equivalentes a los naturales). En mayor detalle,

se dan a conocer modificaciones ejemplares en Verma S. y Eckstein F., Annu. Rev. Biochem. 67:99-134, 1998, o en la patente WO n° 02/12263. Además, pueden realizarse modificaciones en las que las unidades nucleósido se unen mediante grupos que sustituyen los enlaces internucleósido fosfato o azúcar-fosfato. Entre dichos enlaces se incluyen aquellos dados a conocer en Verma S. y Eckstein F., Annu. Rev. Biochem. 67:99-134, 1998. En el caso de que se utilicen otros enlaces fosfato para unir las unidades nucleosídicas, dichas estructuras también han sido descritas como "oligonucleósidos".

Otra realización preferente se relaciona con la detección multiplex de diversos ácidos nucleicos diana, preferentemente diferentes virus. Por lo tanto, en una realización preferente de la invención, se proporciona un método según la invención en el que se detectan otros ácidos nucleicos diana en la misma reacción. Preferentemente, los otros ácidos nucleicos diana comprenden ácido nucleico del virus de la hepatitis A, del virus de la hepatitis B, del virus de la hepatitis C, del virus del Nilo Occidental, del citomegalovirus (CMV), del virus de la inmunodeficiencia humana, o patógenos bacterianos responsables de infecciones bacterianas, tales como, por ejemplo, *Neisseria gonorrhoeae* o infecciones clamidiales.

Se da a conocer adicionalmente en la presente memoria un oligonucleótido en el que la secuencia de ácidos nucleicos del mismo se selecciona de entre las secuencias de ácidos nucleicos SEC ID n° 12 a 15, de entre las secuencias de ácidos nucleicos 10 ó 11, o de una secuencia complementaria de las mismas, o de la secuencia

complementaria de las secuencias de ácidos nucleicos 16 ó 17. En una realización preferente de la invención se proporciona un oligonucleótido que comprende un nucleótido modificado o un compuesto no nucleótido.

5 En otra realización de la invención, se proporciona una pareja de cebadores que comprende un primer y un segundo cebadores en la que la secuencia de ácidos nucleicos del primer cebador es SEC ID n° 15, y en la que la secuencia de ácidos nucleicos del segundo cebador es SEC ID n° 17.

10 La pareja de cebadores según la invención puede utilizarse en una reacción de hibridación con un ácido nucleico complementario. En otra realización e la invención, los oligonucleótidos según la invención se utilizan a modo de cebadores.

15 En otra realización, se encuentra contemplado por la invención un kit de partes en el que el kit contiene una polimerasa dependiente de molde que presenta actividad exonucleolítica 3' a 5', preferentemente la polimerasa Taq, nucleótidos y una pareja de cebadores según la invención. En
20 otra realización de la invención, se proporciona un kit que comprende una ADN polimerasa dependiente de molde, nucleótidos y una pareja de cebadores según la invención.

Dichos kits conocidos de la técnica comprenden recipientes de plástico que pueden utilizarse durante el
25 procedimiento de amplificación, tales como, por ejemplo, placas de microtitulación en el formato de 96 ó de 384 pocillos, o simplemente probetas de reacción ordinarias fabricadas por, por ejemplo, Eppendorf, Hamburg, Alemania, y todos los demás reactivos para llevar a cabo el método según
30 la invención.

En otra realización de la invención, el kit contiene reactivos adicionales para aislar el ácido nucleico. Por lo tanto, el kit adicionalmente puede contener un material con una afinidad para ácidos nucleicos, preferentemente el material con una afinidad para ácidos nucleicos comprende un material con una superficie de sílice. Preferentemente, el material con una superficie de sílice es un vidrio. Más preferentemente, el material con una afinidad para ácidos nucleicos es una composición que comprende partículas de vidrio magnéticas, tal como se describe en las patentes WO n° 96/41811 ó n° 01/37291. El kit puede comprender además o adicionalmente un tampón de lisis que contiene, por ejemplo, agentes caotrópicos, detergentes o alcoholes o mezclas de los mismos que permitan la lisis de las células, y separadamente una proteasa, por ejemplo la proteinasa K, para las digestiones de proteínas no deseadas. Estos componentes del kit según la invención pueden proporcionarse separadamente en tubos o recipientes de almacenamiento. Dependiendo de la naturaleza de los componentes, estos pueden proporcionarse incluso en un único tubo o recipiente de almacenamiento. El kit puede comprender además o adicionalmente una solución de lavado que resulte adecuada para la etapa de lavado de las partículas vítreas magnéticas cuando el ADN o el ARN se encuentre unido a las mismas. Esta solución de lavado puede contener etanol y/o agentes caotrópicos en una solución o soluciones tamponadas con un pH ácido sin etanol y/o agentes caotrópicos tal como se ha descrito anteriormente. Con frecuencia, la solución de lavado u otras soluciones se proporcionan en forma de soluciones madre que han sido diluidas antes de la

utilización. El kit puede comprender además o adicionalmente un eluyente o tampón de elución, es decir, una solución o un tampón (por ejemplo Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) o agua pura para eluir el ADN o ARN unido a las partículas vítreas magnéticas. Además, pueden encontrarse presentes reactivos o soluciones tamponadas adicionales que pueden utilizarse para el procedimiento de purificación de un ácido nucleico, es decir ADN o ARN.

Una realización preferente de la presente invención es utilizar el método o el kit de la presente invención en métodos automatizables tal como se describe, por ejemplo, en la patente WO n° 99/16781. La expresión "método automatizable" se refiere a que las etapas del método resultan adecuadas para llevarse a cabo con un aparato o máquina capaz de funcionar con poco o ningún control externo o influencia de un ser humano. La expresión "método automatizado" se refiere a que las etapas del método automatizable se llevan a cabo con un aparato o máquina capaz de funcionar con poco o ningún control externo o influencia de un ser humano. Únicamente las etapas de preparaciones para el método podrían tener que realizarse manualmente, por ejemplo los recipientes de almacenamiento deben rellenarse y ponerse en su sitio, la elección de las muestras debe ser realizada por un ser humano, así como etapas adicionales conocidas por el experto en la materia, por ejemplo la operación del ordenador de control. El aparato o máquina puede añadir, por ejemplo, automáticamente líquidos, mezclar las muestras o llevar a cabo etapas de incubación a temperaturas específicas. Típicamente, dicha máquina o aparato es un robot controlado por un ordenador

que ejecuta un programa en el que se han especificado las etapas y comandos individuales. Los métodos automatizados preferentes son aquellos que se llevan a cabo en un formato de alto rendimiento, lo que implica que los métodos y la máquina o aparato utilizado se han optimizado para un alto rendimiento de muestras en un corto tiempo. En otra realización de la invención, los métodos o los kits según la presente invención se utilizan en un procedimiento semi-automatizado, lo que implica que algunas de las etapas de reacción debe llevarse a cabo manualmente. En una realización preferente de la invención, se extrae una suspensión que contiene MGPs según la presente invención de un recipiente de almacenamiento y se añaden volúmenes parciales a diferentes reactores. Los reactores pueden ser tubos de reacción realizados en plástico finalmente en formato de placa de microtitulación que contiene 96 ó 384 ó más pocillos, en los que puede llevarse a cabo una reacción. Sin embargo, estos recipientes pueden realizarse en otro material, por ejemplo de acero.

En realizaciones preferentes de la invención, el kit según la invención se utiliza para investigación, bioanalítica o diagnóstico. En realizaciones preferentes según la invención, el kit según la invención o el método según la invención se utiliza en un formato de alto rendimiento, es decir, en un método automatizado que permite el análisis de un número alto de diferentes muestras en un periodo de tiempo muy corto.

Los ejemplos, referencias, listado de secuencias y figuras siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance verdadero

de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que pueden realizarse modificaciones en los procedimientos proporcionados.

Descripción de las figuras

5 **Figura 1** Curvas cinéticas de crecimiento de PCR para la combinación de cebadores STS12/16 conjuntamente con la sonda STS15 basadas en un eluido derivado de una muestra de 1.000 IU/muestra. Las líneas
10 verticales indican cuándo las curvas de crecimiento cruzan el umbral; en otras palabras, cuándo se detecta inicialmente una señal específica e inequívoca.

Figura 2 Las curvas cinéticas de crecimiento de PCR para la combinación de cebadores STS13/16 conjuntamente
15 con la sonda STS15 basada en un eluido derivado de una muestra de 1.000 IU/muestra. Las líneas verticales indican cuándo las curvas de crecimiento cruzan el umbral; en otras palabras, cuándo se detecta inicialmente una señal
20 específica e inequívoca.

Figura 3 Las curvas cinéticas de crecimiento de PCR para la combinación de cebadores STS14/16 conjuntamente
25 con la sonda STS15 basada en un eluido derivado de una muestra de 1.000 IU/muestra. Las líneas verticales indican cuándo las curvas de crecimiento cruzan el umbral; en otras palabras, cuándo se detecta inicialmente una señal
específica e inequívoca.

Figura 4 Análisis de los productos de amplificación
30 derivados de los experimentos en el Ejemplo 1 por

medio de electroforesis en gel de agarosa estándar (sistema E-Gel, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (carril 1: escala de 100 pb de ADN; 2: STS12/16: control de agua; 3: STS12/16: muestra de 1.000 IU/ml; 4: STS12/16: muestra de 1.000 IU/ml; 5: STS13/16: muestra de 1.000 IU/ml; 6: STS13/16: muestra de 1.000 IU/ml; 7: STS14/16: muestra de 1.000 IU/ml; 8: STS14/16: muestra de 1.000 IU/ml; 9: vacío; 10: escala de 100 pb de ADN).

5

Figura 5 Las curvas cinéticas de crecimiento de PCR para la combinación de cebadores STS14/16 en comparación con la combinación de cebadores STS17/18 conjuntamente con la sonda STS15 basada en un eluido derivado de una muestra de 1.000 IU/muestra. Las líneas verticales indican cuándo las curvas de crecimiento cruzan el umbral; en otras palabras, cuándo se detecta inicialmente una señal específica e inequívoca.

15

Figura 6 Análisis de los productos de amplificación derivados de los experimentos en el Ejemplo 2 por medio de electroforesis en gel de agarosa estándar (sistema E-Gel, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (carril 1: escala de 100 pb de ADN; 2: muestra de 50 IU/ml; positivo para PCR 3: muestra de 25 IU/ml; positivo para PCR 4: muestra de 25 IU/ml; negativo para PCR; 5: muestra de 10 IU/ml; negativo para PCR; 6: muestra de 10 IU/ml; negativo para PCR; 7: muestra de 10 IU/ml; negativo para PCR; 8: muestra de 10 IU/ml; positivo para PCR; 9: control negativo; negativo

25

30

para PCR; 10: controles negativos; negativo para PCR; 11: STS17/18: control de agua; negativo para PCR; 12: escala de 100 pb de ADN).

Figura 7 Curvas cinéticas de crecimiento de PCR para la combinación de cebadores STS17/18 conjuntamente con la sonda STS15 basadas en un eluido derivado de una muestra de 10 4IU/ml. Las líneas verticales indican cuándo las curvas de crecimiento cruzan el umbral; en otras palabras, cuándo se detecta inicialmente una señal inequívoca y específica.

Figura 8 Dibujo esquemático de la región diana en el genoma del parvovirus B19.

Ejemplos - Detección del parvovirus B19 mediante ensayo de ácidos nucleicos

Parte general:

Se llevó a cabo la preparación de muestras de EDTA-plasma, citrato-plasma y suero humano utilizando el kit de aislamiento total de ácidos nucleicos (TNAI) en el instrumento COBAS AmpliPrep (ambos de Roche Diagnostics GmbH, D-68305 Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante con 200 µl de espécimen, volumen introducido. A continuación, se transfirieron manualmente 50 µl de eluido a tubos para PCR específicos (denominados tubos k) y se mezclaron con 50 µl de mezcla de reacción para PCR. La amplificación y detección de los ácidos nucleicos se llevó a cabo mediante PCR cinética en el analizador COBAS TaqMan (Roche Diagnostics GmbH, D-68305 Mannheim, Alemania) con el perfil de PCR siguiente:

| Etapa | Tipo | Pendiente de rampa (0,1°C/s) | Temp. (°C) | Tiempo (s) | Retraso (s) | Número de |
|-------|------|------------------------------|------------|------------|-------------|-----------|
|-------|------|------------------------------|------------|------------|-------------|-----------|

| | | | | | | cicl os |
|---|------------------------------|----|-------|-----|----|--------------------|
| 1 | Calentamiento de cubierta | 3 | 100,0 | | | 1 |
| 2 | PreCiclo | 12 | 50 | 300 | | 1 |
| 4 | PreCiclo | 12 | 95 | 120 | | 1 |
| 5 | Inicio de secuencia | | | | | |
| 6 | Desnaturaliza ción | 12 | 95,0 | 15 | | |
| 7 | Apareamiento | 12 | 58 | 25 | 25 | |
| 8 | Final de secuencia | | | | | 60 |
| 9 | PostCiclo | 12 | 40 | 120 | | 1 |

Ejemplo 1

Comparación entre las diferentes combinaciones de cebadores

Se diseñó una sonda TaqMan (STS15) que comprendía una
 5 región altamente conservada del gen NS1. La sonda presentaba
 la secuencia SEC ID n° 11: 5'-CCCCGGGACCAGTTCAGGAGAATCAT-3'
 (nt 2.070-2.095 según Shade R.O. *et al.*, J. Virol. 58:921-
 936, 1986). La sonda presentaba una temperatura de fusión
 (Tm) de aproximadamente 80°C al aplicar el método del vecino
 10 más próximo (OLIGO, Molecular Biology Insights Inc., CO,
 USA). A continuación, se diseñaron secuencias de cebador
 para satisfacer los criterios siguientes:

- Tm 59°C a 63°C
- ningún apareamiento o menos apareamientos con la
 15 secuencias publicadas de eritrovirus, incluyendo
 las variantes nuevas recientemente descubiertas
 (Nguyen Q.T. *et al.*, Virology 301:374-80, 2002;
 Servant A. *et al.*, J. Virol. 76:9124-34, 2002)
- menos sitios de cebado falso
- el cebador debe finalizar con una A o una C
 20

Las secuencias siguientes se consideraron adecuadas y fueron sintetizadas:

STS12 (cebador directo): 5'-GTGGTGAAAGCTCTGAAGAA-3' (SEC ID n° 12)

STS13 (cebador directo): 5'-GAAACCCCGCGCTCTA-3' (SEC ID n° 13)

5 STS14 (cebador directo): 5'-AAACCCCGCGCTCTAGTA-3' (SEC ID n° 14)

STS17 (cebador directo): 5'-GAAACCCCGCGCTCTAGTAC-3' (SEC ID n° 15)

STS16 (cebador inverso): 5'-TTCCATCCATTATACCAAGC-3' (SEC ID n° 16)

STS18 (cebador inverso): 5'-CCCAACTAACAGTTCACGAA-3' (SEC ID n° 17)

Se evaluó el rendimiento de las combinaciones de
10 cebadores STS12/16, STS13/16, STS14/16 y STS17/18 con la sonda STS15 y una mezcla de reacción de PCR que consistía de tricina 50 mM, pH 8,3, acetato potásico 100 mM, acetato de manganeso 3 mM, glicerol al 4%, dATP 300 µM, dCTP 300 µM, dGTP 300 µM, dTTP 50 µM, dUTP 500 µM, 10 U de uracil-N-
15 glucosilasa, 40 U de polimerasa Z05, 200 nM de NTQ21-46A-aptámero, 400 nM de cada cebador y 100 nM de sonda. Se procesaron muestras consistían de 500 y 1.000 IU/ml de ADN de parvovirus B19 en un instrumento COBAS AmpliPrep utilizando el kit TNAI. A continuación, se mezclaron 50 µl
20 del eluido correspondiente con una mezcla de reacción de 2 veces en un tubo K y se introdujeron en el analizador COBAS TaqMan para la amplificación/detección.

Las figuras 1 a 3 muestran las curvas cinéticas de crecimiento de PCR para las combinaciones de cebadores
25 STS12/16, STS13/16 y STS14/16 basadas en un eluido derivado a partir de una muestra de 1.000 IU/ml. Las líneas verticales indican cuándo las curvas de crecimiento cruzan el umbral; en otras palabras, cuándo una señal específica e inequívoca es inicialmente detectable. Los puntos de cruce
30 de estas líneas verticales con el eje X se determinan como valores de umbral de ciclo (ct) y son directamente

proporcionales a la concentración de entrada de la secuencia diana. Cuanto menor sea un valor de ct, más alto es la entrada inicial de copias diana. De entre las combinaciones de cebadores presentadas en la presente memoria, STS14/16
5 aparentemente es superior según los valores de ct más bajos.

La figura 4 muestra el análisis de los amplicones correspondientes por medio de electroforesis en gel de agarosa. Demuestra que las reacciones de PCR con las combinaciones de cebadores dadas muestran ninguna o menos
10 reactividad cruzada o la amplificación de secuencias no específicas.

Un segundo cebador inverso, STS18, ha sido evaluado conjuntamente con el cebador directo STS17 y la combinación de cebadores se ha comparado con STS14/16, en una mezcla de
15 reacción y protocolo de PCR tales como los indicados anteriormente. A modo de muestras se utilizaron eluidos derivados de extracciones replicadas de un espécimen de 500 IU/ml. La figura 5 ilustra una comparación entre las dos combinaciones de cebadores. Tal como resulta evidente en la
20 presente memoria, se ha seleccionado STS17/18 para experimentos adicionales debido a que comprende los valores de ct más bajos conjuntamente con una menor desviación en proporción al valor de ct.

Ejemplo 2

25 Sensibilidad analítica con los cebadores STS17, STS18 y la sonda STS15

Para la determinación de la sensibilidad, la serie de dilución del estándar de la Organización Mundial de la Salud para el ADN del parvovirus B19 (National Institute for
30 Biological Standards and Control [NIBSC], 1° Estándar

Internacional, 2000, ADN de parvovirus B19, 500.000 IU/ml; código 99/800) de 1.000 a 10 IU/ml en EDTA-plasma, se procesó en doce réplicas utilizando el método de extracción descrito anteriormente con 200 µl de volumen de entrada de espécimen. Se transfirieron manualmente cincuenta microlitros de luido a tubos K, se mezclaron con 50 µl de MMx activado y se extrajeron posteriormente para la PCR (para ver los detalles, ver el Ejemplo 1). Según el algoritmo de análisis Probit, se encontró que la sensibilidad era de 26 IU/ml a una tasa de aciertos del 95%. La Tabla 1 resume los resultados del estudio e ilustra las tasas de aciertos a la concentración de entrada correspondiente. La figura 6 muestra el análisis de electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación seleccionados.

Tabla 1:

| Nº | Concentración (IU/ml) | Número de ensayos | Número de positivos | Tasa de aciertos |
|----|-----------------------|-------------------|---------------------|------------------|
| 1 | 500 | 12 | 12 | 100% |
| 2 | 400 | 12 | 12 | 100% |
| 3 | 300 | 11 | 11 | 100% |
| 4 | 200 | 12 | 12 | 100% |
| 5 | 100 | 11 | 11 | 100% |
| 6 | 75 | 12 | 12 | 100% |
| 7 | 50 | 11 | 11 | 100% |
| 8 | 25 | 11 | 10 | 91% |
| 9 | 10 | 12 | 9 | 75% |

Ejemplo 3

Ensayo de la precisión utilizando diferentes combinaciones de cebadores

La precisión con la combinación de cebadores STS17/18 se evaluó en comparación con la combinación STS14/16 conjuntamente con la sonda STS15. El análisis de control de

ES 2 354 020 T3

ADN Parvo-B19 Pelispy a 10^4 IU/ml (VQC Laboratory, Alkmaar, NL) se extrajo en 46 réplicas en dos días diferentes siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Los eluidos se analizaron mediante PCR cinética tal como se describe en el Ejemplo 1. Se encontró que el C.V. basado en los valores de ct era de 2,18% en el caso de la combinación de cebadores STS17/18, mientras que la combinación STS14/16 proporcionaba un CV de 4,89% (Tabla 2).

10

Tabla 2:

| | Valores de ct | |
|-------|---|---|
| | Combinación de cebadores STS14/STS16 | Combinación de cebadores STS17/STS18 |
| Día 1 | 39,8 | 35,1 |
| | 40,0 | 33,5 |
| | 41,6 | 34,3 |
| | 40,6 | 35,7 |
| | 41,2 | 36,9 |
| | 40,0 | 35,0 |
| | 40,6 | 34,3 |
| | 42,0 | 34,8 |
| | 40,0 | 35,1 |
| | 41,0 | 35,5 |
| | 41,0 | 35,4 |
| | 41,3 | 35,4 |
| | 40,9 | 34,8 |
| | 42,5 | 35,4 |
| | 41,3 | 33,2 |
| | 43,4 | 34,4 |
| | 40,9 | 35,1 |
| | 42,4 | 36,0 |
| | 43,2 | 36,7 |
| | 42,1 | 35,8 |
| 44,4 | 35,5 | |
| 41,8 | 35,3 | |
| 40,9 | 36,7 | |
| Día 2 | 39,8 | 35,5 |
| | 40,2 | 35,1 |
| | 36,4 | 34,5 |
| | 36,3 | 35,7 |
| | 37,8 | 35,8 |

| | | |
|-------|-------|-------|
| | ND | 34,5 |
| | 38,4 | 35,2 |
| | 40,2 | 35,4 |
| | 39,5 | 34,7 |
| | 37,5 | 35,2 |
| | 40,5 | 35,5 |
| | 36,2 | 35,6 |
| | 38,4 | 35,3 |
| | 39,5 | 35,9 |
| | 37,2 | 35,6 |
| | 38,6 | 37,4 |
| | 37,7 | 35,2 |
| | 41,7 | 35,5 |
| | 44,3 | 35,8 |
| | 38,6 | 36,4 |
| | 40,1 | 35,5 |
| | 39,0 | 34,8 |
| | 41,4 | 35,0 |
| Media | 40,3 | 35,3 |
| S.D. | 1,968 | 0,770 |
| C.V. | 4,89 | 2,18 |

Ejemplo 4**Ensayo de especificidad utilizando diferentes combinaciones de cebadores**

5 Se evaluó la especificidad utilizando diferentes combinaciones de cebadores y la sonda STS15, situada dentro del gen NS1 del genoma del parvovirus B19. Se adaptó el procedimiento general (mezcla de reacción, protocolo de PCR) del Ejemplo 1. Las donaciones rutinarias frescas de sangre
10 fueron suministradas por el Blood Donation Center de la Cruz Roja alemana, Munich, BRD, y se extrajeron tal como se ha descrito anteriormente. La Tabla 3 a continuación ilustra los resultados de este análisis y demuestra una especificidad del 100% para todas las combinaciones
15 investigadas.

Tabla 3:

| N° int. | BRK-plasma n° | Ensayo de PCR con | Ensayo de PCR con | Ensayo de PCR con |
|---------|------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|---------|------------------|----------------------|----------------------|----------------------|

ES 2 354 020 T3

| | | STS13/STS16 | STS14/STS16 | STS17/STS18 |
|-----|---------|-------------|-------------|-------------|
| 301 | 0926091 | negativo | ND | ND |
| 302 | 0926033 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 303 | 0926094 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 304 | 0926037 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 305 | 0926086 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 306 | 0926038 | ND | ND | Negativo |
| 307 | 0986092 | ND | ND | Negativo |
| 308 | 0926049 | ND | ND | Negativo |
| 309 | 0926061 | ND | ND | Negativo |
| 310 | 0926068 | ND | ND | Negativo |
| 311 | 0926042 | ND | ND | Negativo |
| 312 | 0986076 | ND | Negativo | Negativo |
| 313 | 0926043 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 314 | 0926073 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 315 | 0926046 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 316 | 0926072 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 317 | 0926067 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 318 | 0926050 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 319 | 0926090 | ND | ND | Negativo |
| 320 | 0926079 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 321 | 0926053 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 322 | 0926051 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 323 | 0926063 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 324 | 0926088 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 325 | 0926071 | Negativo | Negativo | ND |
| 326 | 0926034 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 327 | 0926039 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 328 | 0926087 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 329 | 0926095 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 330 | 0926036 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 331 | 0926093 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 332 | 0926064 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 333 | 0926064 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 334 | 0926085 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 335 | 0926029 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 336 | 0926032 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 337 | 0926082 | ND | Negativo | Negativo |
| 338 | 0926098 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 339 | 0926047 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 340 | 0926097 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 341 | 0941982 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 342 | 0926069 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 343 | 0926041 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 344 | 0941983 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 345 | 0926066 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 346 | 0926035 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 347 | 0926089 | Negativo | ND | Negativo |
| 348 | 0926045 | Negativo | ND | Negativo |

| | | | | |
|-----|---------|----------|----------|----------|
| 349 | 0926084 | ND | ND | ND |
| 350 | 0941971 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 351 | 0926054 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 352 | 0941962 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 353 | 0926052 | ND | Negativo | Negativo |
| 354 | 0926081 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 355 | 0941985 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 356 | 0926080 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 357 | 0937866 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 358 | 0937882 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 359 | 0937864 | Negativo | Negativo | Negativo |
| 360 | 0937861 | Negativo | Negativo | Negativo |

Ejemplo 5**Influencia de la composición de la mezcla de reacción sobre la precisión de la PCR**

El objetivo del experimento era analizar si la

5 composición de la mezcla de reacción presentaba una influencia significativa sobre la presión de la reacción de PCR dirigida a la región NS1 del parvovirus B19. Se añadió la combinación de cebadores STS17/18 (concentración final de cada uno: 0,4 μ M) y la sonda STS15 (concentración final: 0,1

10 μ M) a la mezcla de reacción descrita en el Ejemplo 4, así como a dos mezclas de reacción preformuladas que se encuentran disponibles comercialmente (kit de amplificación de ADN COBAS TaqMan Generic, kit de amplificación de ARN COBAS TaqMan Generic). El análisis de control de ADN Parvo-

15 B19 Pelipsy a 10^4 IU/ml tal como se ha descrito en el Ejemplo 3 se extrajo en 20 réplicas por cada mezcla de reacción y se analizó según el Ejemplo 1. La figura 7 demuestra que la mezcla de reacción de ARN comercial proporcionaba los valores de ct más bajos conjuntamente con

20 la mejor precisión según el C.V., que fue el más bajo obtenido, de 0,5%, en comparación con la mezcla de reacción de ADN comercial, con un C.V. de 4,4%, y la mezcla de

reacción del propio laboratorio, con un C.V. de 2,3% (Tabla 4).

En la fig. 8 se muestra un estudio de la región diana dentro del genoma del parvovirus B19.

5

Tabla 4:

| | Valores de ct con la combinación de cebadores STS17/STS18 | | |
|-------|--|--|--|
| | Mezcla de reacción del propio laboratorio | Mezcla de reacción genérica de ARN comercial | Mezcla de reacción genérica de ADN comercial |
| | 35,2 | 31,2 | 47,7 |
| | 35,5 | 31,3 | 47,4 |
| | 35,2 | 31,1 | 49,1 |
| | 35,8 | 31,1 | 49,2 |
| | 34,9 | 30,8 | 50,6 |
| | 35,3 | 31,1 | 48,6 |
| | 36,0 | 30,6 | 44,8 |
| | 34,8 | 31,1 | 51,8 |
| | 34,7 | 31,2 | 50,1 |
| | 35,2 | 31,2 | 47,9 |
| | 35,1 | 31,2 | 49,6 |
| | 36,3 | 31,2 | 48,6 |
| | 37,3 | 31,0 | 52,1 |
| | 35,5 | 31,0 | 50,9 |
| | 34,9 | 31,1 | 50,1 |
| | 35,7 | 31,1 | 49,9 |
| | 37,3 | 31,2 | 55,9 |
| | 35,9 | 31,2 | 52,1 |
| | 37,2 | 31,1 | 48,9 |
| | 36,6 | 31,4 | 49,4 |
| Media | 35,7 | 31,1 | 49,7 |
| S.D. | 0,811 | 0,166 | 2,191 |
| C.V. | 2,27 | 0,53 | 4,41 |

Lista de referencias

- Abramson R. D. and Myers T. W., *Curr Opin Biotechnol* 4 (1993) 41-47
Alderton R. P. et al., *S., Anal. Biochem.* 201 (1992) 166-169
Anderson M. J., *Lancet* 1 (1983) 1378
Astell et al., *J. Gen. Virol.* 68 (1987) 885-893
Ausubel F. et al.: *Current Protocols in Molecular Biology* 1987, J. Wiley and Sons, NY
Barany F., *PCR Methods and Applic.* 1 (1991) 5-16
Barany F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 189-193
Beaucage et al., *Tetrahedron Letters* 22 (1981) 1859
Boom R., *J Clin Microbiol* 28 (1990) 495-503
Brown E. L., et al., *Methods in Enzymology* 68 (1979) 109-151
Brown K. E., *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 13 (2000) 245-259
Carriere C. et al., *J Virol Methods* 44 (1993), 221-234
Cohen B., *BMJ* 311 (1995) 1549-1552
Cotmore S. F. et al., *J. Virol.* 60 (1986) 548-557
Cubie H. A. et al., *Mol Cell Probes* 9 (1995), 59-66

DE 3724442
 DE 3734442
 Dorsch S. et al., *J. Gen. Virol.* (2001) 82, 191-199
 Dux S. et al., *Dtsch Med Wochenschr* 127 (2002) 1584-1588
 Enders E: *Infections of the fetus and the neonate other than rubella*. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Edited by Collier L. London, Edward Arnold, 1998, pp. 873-915
 Enders G. et al., *Clin Infect Dis* 26 (1998) 355-358
 EP 0439182
 EP 238 893
 EP 783 580
 Erdman D. D. et al., *J Gen Virol* 77 (1996), 2767-2774
 Garegg et al., *Chem. Scr.* 25 (1985) 280-282
 GB 91/00212
 Guatelli J.C., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 1874-1878
 Hemauer A. et al., *J. Gen. Virol.* (1996) 77, 1781-1785
 Hicks K. E. et al., *Arch Virol.* 141 (1996), 1319-1327
 Holloway B. et al., *Nucleic Acids Res* 21 (1993), 3905-3906
 Jakobi R. et al., *Anal. Biochem.* 175 (1988) 196-201
 Jordan J. A. et al., *Mol. Diagn.* 1 (1996), 321-328
 JP 04088985
 JP 11221099
 JP 147986/1995
 Jungkind D., *J Clin Virol* 20 (2001) 1-6
 Kwoh D. Y. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 1173-1177
 Marko M. A. et al., *Anal. Biochem.* 121 (1982) 382-387
 Narang S. A. et al., *Methods in Enzymology* 68 (1979) 90-98
 Nguyen Q. T. et al., *Virology* 301 (2002) 374-80
Oligonucleotide Synthesis, Gait, M.J., ed., 1984; *Nucleic Acid Hybridization*, Hames, B.D., and Higgins, S.J., eds., 1984; and a series, *Methods in Enzymology*, Academic Press, Inc., all of which are incorporated herein by reference
 Ozawa K. et al., *J. Virol.* 62 (1988) 2508-2511
 Pattison J. R. et al., *Lancet* 1 (1981) 664-665
 RU2146372
 Sambrook J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989
 Sato K. et al., *J Clin Microbiol* 38 (2000) 1241-1243
 Schorling S. et al., *J. Mol. Diagn.* 6 (2004) 37-41
 Servant A. et al., *J. Virol.* 76 (2002) 9124-34
 Shade R. O. et al., *J. Virol.* 58 (1986) 921-936
 Stelzl E. et al., *J Clin Microbiol* 40 (2002) 1447-1450
 Takahashi N. et al., *FEBS Lett.* 450 (1999) 289-293
 Turton J. et al., *Epidemiol Infect* 105 (1990) 197-201
 Uhlmann and Peyman, *Chemical Reviews* 90 (1990) 543
 Umene K. and Nunoue T., *J. Gen. Virol.* 76 (1995) 2645-2651
 US 4,458,066
 US 4,996,143
 US 5,130,238
 US 5,210,015
 US 5,386,024
 US 5,478,972
 US 5,487,972
 US 5,565,322
 US 5,585,254
 US 5,804,375
 US 5,849,489
 US 6,103,476
 US 6,162,603
 US 6,174,670
 US 6,183,999

US 6,268,349
 US 6,274,307
 Vassias I. et al., J. Virol. Meth. 44 (1993) 329-338
 Verma S., and Eckstein F., Annu. Rev. Biochem. 67 (1998) 99-134
 Vogelstein B. et al., Proc. Natl. Acad. USA 76 (1979) 615-9
 Walsh, 1979, Enzymatic Reaction Mechanisms. W. H. Freeman and Company, San Francisco, Chapter 3
 Whelen A. C. and Persing D. H., Annu. Rev. Microbiol. 50 (1996) 349-373
 WO 00/24917
 WO 01/06019
 WO 01/14593
 WO 01/37291
 WO 02/00924
 WO 02/096925
 WO 02/12263
 WO 03/002753
 WO 90/01069
 WO 91/04330
 WO 92/08808
 WO 96/41811
 WO 98/04730
 WO 99/ 16781
 WO 99/28439
 Wu D. Y. and Wallace R. B., Genomics 4 (1989) 560-69
 Yoto Y. et al., Lancet 347 (1996) 868-9

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Roche Diagnostics GmbH
- <120> Nuevos cebadores y sondas para la detección del
 5 parvovirus B19
- <130> 22398 WO
- <150> EP 04002854.0
- <151> 2004-02-10
- <160> 17
- 10 <170> PatentIn versión 3.2
- <210> 1
- <211> 349
- <212> ADN
- <213> Parvovirus B19
- 15 <400> 1
- <210> 2
- <211> 95
- <212> ADN

ES 2 354 020 T3

gtggtgaaag ctctgaagaa ctcaagtgaag gcagcttttt taacctcatc accccaggcg 60
 cctggaacac tgaaaccccg cgctctagta cgcccatccc cgggaccagt tcaggagaat 120
 catttgcgg aagcccagtt tcctccgaag ttgtagctgc atcgtgggaa gaagccttct 180
 acacaccttt ggcagaccag tttcgtgaac tgtagttgg ggttgattat gtgtgggacg 240
 gtgtaagggg tttacctgtg tgttgtgtgc aacatattaa caatagtggg ggagggttg 300
 gactttgtcc ccattgcatt aatgtagggg cttggtataa tggatggaa 349

<210> 2

<211> 95

<212> ADN

5 <213> Parvovirus B19

<400> 2

gtggtgaaag ctctgaagaa ctcaagtgaag gcagcttttt taacctcatc
 accccaggcg 60

cctggaacac tgaaaccccg cgctctagta cgccc 95

10 <210> 3

<211> 29

<212> ADN

<213> Parvovirus B19

<400> 3

15 tcaaccccaa ctaacagttc acgaaactg 29

<210> 4

<211> 32

<212> ADN

<213> Parvovirus B19

20 <400> 4

ttccatccat tataccaagc ccctacatta at 32

<210> 5

<211> 55

<212> ADN

25 <213> Parvovirus B19

ES 2 354 020 T3

<400> 5
tccccgggac cagttcagga gaatcatttg tcggaagccc agtttcctcc
gaagt 55
<210> 6
5 <211> 35
<212> ADN
<213> Parvovirus B19
<400> 6
cagtgggtggt gaaagctctg aagaactcag tgaaa 35
10 <210> 7
<211> 34
<212> ADN
<213> Parvovirus B19
<400> 7
15 ctggaacact gaaaccccg c gctctagtagtac gcc 34
<210> 8
<211> 29
<212> ADN
<213> Parvovirus B19
20 <400> 8
tcaaccccaa ctaacagttc acgaaactg 29
<210> 9
<211> 24
<212> ADN
25 <213> Parvovirus B19
<400> 9
aaatttccat ccattatacc aagc 24
<210> 10
<211> 37
30 <212> ADN

ES 2 354 020 T3

<213> Parvovirus B19
<400> 10
ccccgggacc agttcaggag aatcatttgt cgggaagc 37
<210> 11
5 <211> 26
<212> ADN
<213> Parvovirus B19
<400> 11
ccccgggacc agttcaggag aatcat 26
10 <210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Parvovirus B19
<400> 12
15 gtggtgaaag ctctgaagaa 20
<210> 13
<211> 16
<212> ADN
<213> Parvovirus B19
20 <400> 13
gaaaccccgc gctcta 16
<210> 14
<211> 18
<212> ADN
25 <213> Parvovirus B19
<400> 14
aaaccccgcg ctctagta 18
<210> 15
<211> 20
30 <212> ADN

ES 2 354 020 T3

<213> Parvovirus B19
<400> 15
gaaaccccgc gctctagtac 20
<210> 16
5 <211> 20
<212> ADN
<213> Parvovirus B19
<400> 16
ttccatccat tataccaagc 20
10 <210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> Parvovirus B19
<400> 17
15 cccaactaac agttcacgaa 20

REIVINDICACIONES

1. Método para la detección de un ácido nucleico diana que comprende la secuencia de ácidos nucleicos del parvovirus B19 en una muestra, que comprende las etapas de:
 - (a) proporcionar una muestra que se sospecha que contiene el ácido nucleico diana,
 - (b) proporcionar una pareja de cebadores que comprende un primer y un segundo cebador, en la que el primer cebador consiste de la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID n° 15 y en la que el segundo cebador consiste de la secuencia de ácidos nucleicos SEC ID n° 17,
 - (c) amplificar el ácido nucleico diana,
 - (d) detectar el ácido nucleico diana amplificado de la etapa (c).
2. Método según la reivindicación 1, que comprende adicionalmente, entre las etapas (c) y (d),
 - (c1) poner en contacto la muestra con una sonda bajo condiciones para la unión de la sonda al ácido nucleico diana,y en la que la etapa (d) comprende:

detectar el producto de unión entre el ácido nucleico diana y la sonda a modo de indicación de la presencia del ácido nucleico diana.
3. Método según la reivindicación 2, en el que la sonda consiste de por lo menos 12 nucleótidos contiguos de secuencia de ácidos nucleicos SEC ID n° 5 o una secuencia complementaria de la misma.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, en el que la sonda porta un marcaje.
5. Método según la reivindicación 4, en el que una sonda adicional que porta un marcaje se pone en contacto con la muestra de la etapa (d), de manera que una pareja de sondas que consiste de una primera y una segunda sonda se pone en contacto con la muestra de la etapa (d).
6. Método según la reivindicación 5, en el que dicha etapa de amplificación c) comprende poner en contacto la muestra con dicha pareja de cebadores para producir un producto de amplificación en el caso de que el ácido nucleico diana se encuentre presente en dicha muestra, en el que dicha etapa de hibridación d) comprende poner en contacto dicha muestra con la pareja de sondas, en el que los miembros de dicha pareja de sondas se hibridan con dicho producto de amplificación a no más de cinco nucleótidos uno de otro, en el que la primera sonda de dicha pareja de sondas se marca con un marcaje fluorescente donante y en el que la segunda sonda de dicha pareja de sondas se marca con un marcaje fluorescente aceptor correspondiente, y detectar el producto de unión entre el ácido nucleico diana y la pareja de sondas de la etapa e) mediante la detección de la presencia o ausencia de transferencia energética por resonancia fluorescente entre dicho marcaje fluorescente donante de dicha sonda y dicho marcaje fluorescente aceptor de dicha segunda sonda, en el que la presencia de transferencia energética por resonancia fluorescente es indicativa de la presencia del ácido nucleico diana en la muestra, y en el que la

ausencia de transferencia energética por resonancia fluorescente es indicativa de la ausencia del ácido nucleico diana en la muestra.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3,
5 en el que la sonda porta un primer y un segundo marcajes.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en el que el ácido nucleico diana de la etapa c) se amplifica con una ADN polimerasa dependiente de molde.
- 10 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, en el que el producto de unión entre el ácido nucleico diana y la sonda de la etapa (e) se detectar a partir de la cantidad del primer o segundo marcaje fluorescente que se libera a partir de la sonda
15 hibridada con el ácido nucleico diana mediante hidrólisis de exonucleasa de la ADN polimerasa dependiente de molde.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en el que la sonda consiste de por lo menos 12
20 nucleótidos contiguos de secuencia de ácidos nucleicos SEC ID n° 10 o una secuencia complementaria de la misma.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en el que la sonda presenta la secuencia de ácidos
25 nucleicos SEC ID n° 11 o una secuencia complementaria de la misma.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11, en el que el cebador y/o la sonda comprende un nucleótido modificado o un compuesto no nucleótido.

13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en el que se detectan otros ácidos nucleicos diana en la misma reacción.
14. Método según la reivindicación 13, en el que otros ácidos nucleicos diana comprenden ácido nucleico del virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus del Nilo Occidental o el virus de la inmunodeficiencia humana.
15. Pareja de cebadores que comprende un primer y un segundo cebador, en la que la secuencia de ácidos nucleicos del primer cebador es SEC ID n° 15, y en la que la secuencia de ácidos nucleicos del segundo cebador es SEC ID n° 17.
16. Utilización de una pareja de cebadores según la reivindicación 15 en una reacción de hibridación con un ácido nucleico complementario.
17. Kit que comprende una ADN polimerasa dependiente de molde, nucleótidos y una pareja de cebadores según la reivindicación 15.

20

Fig. 1

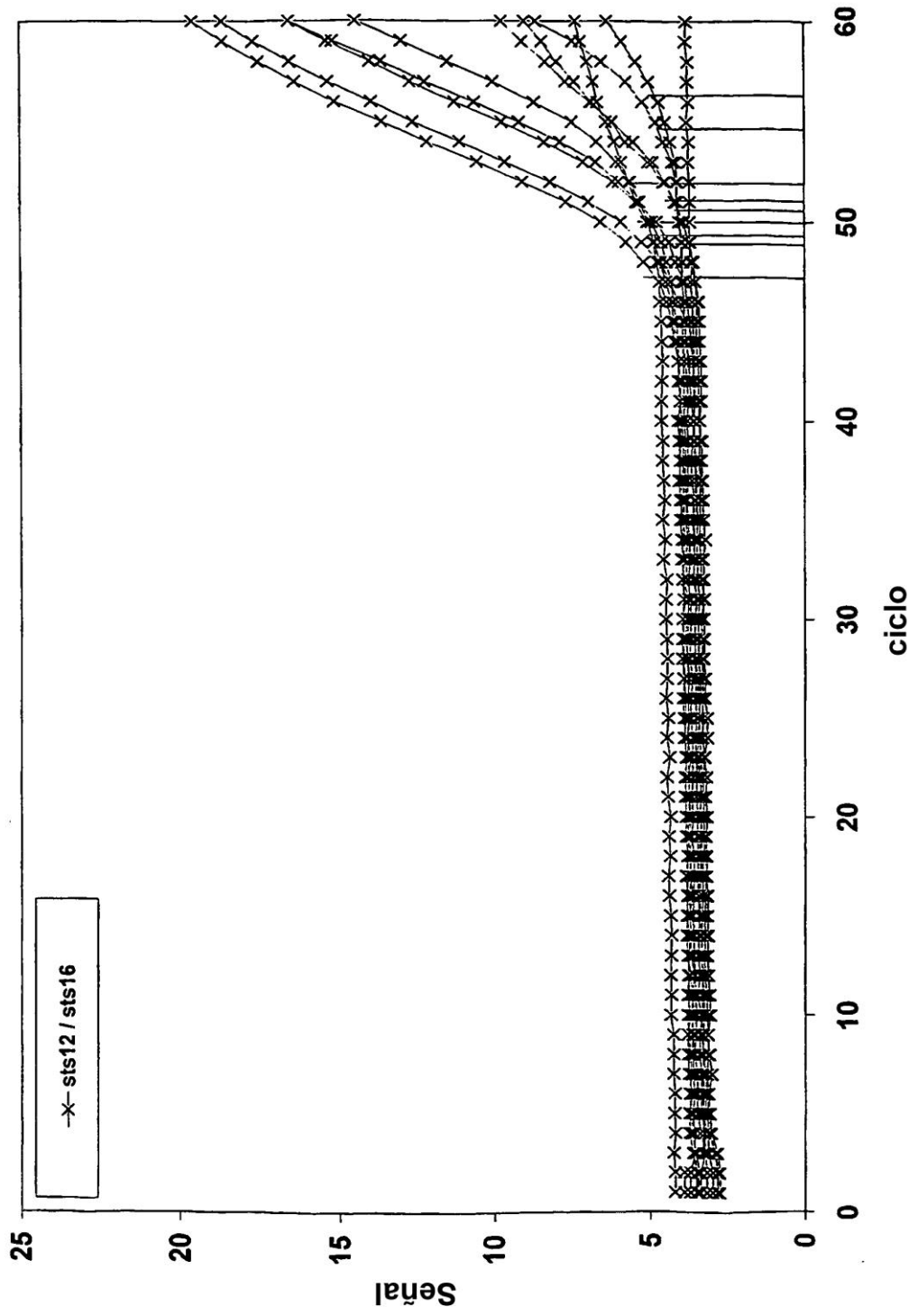


Fig. 2

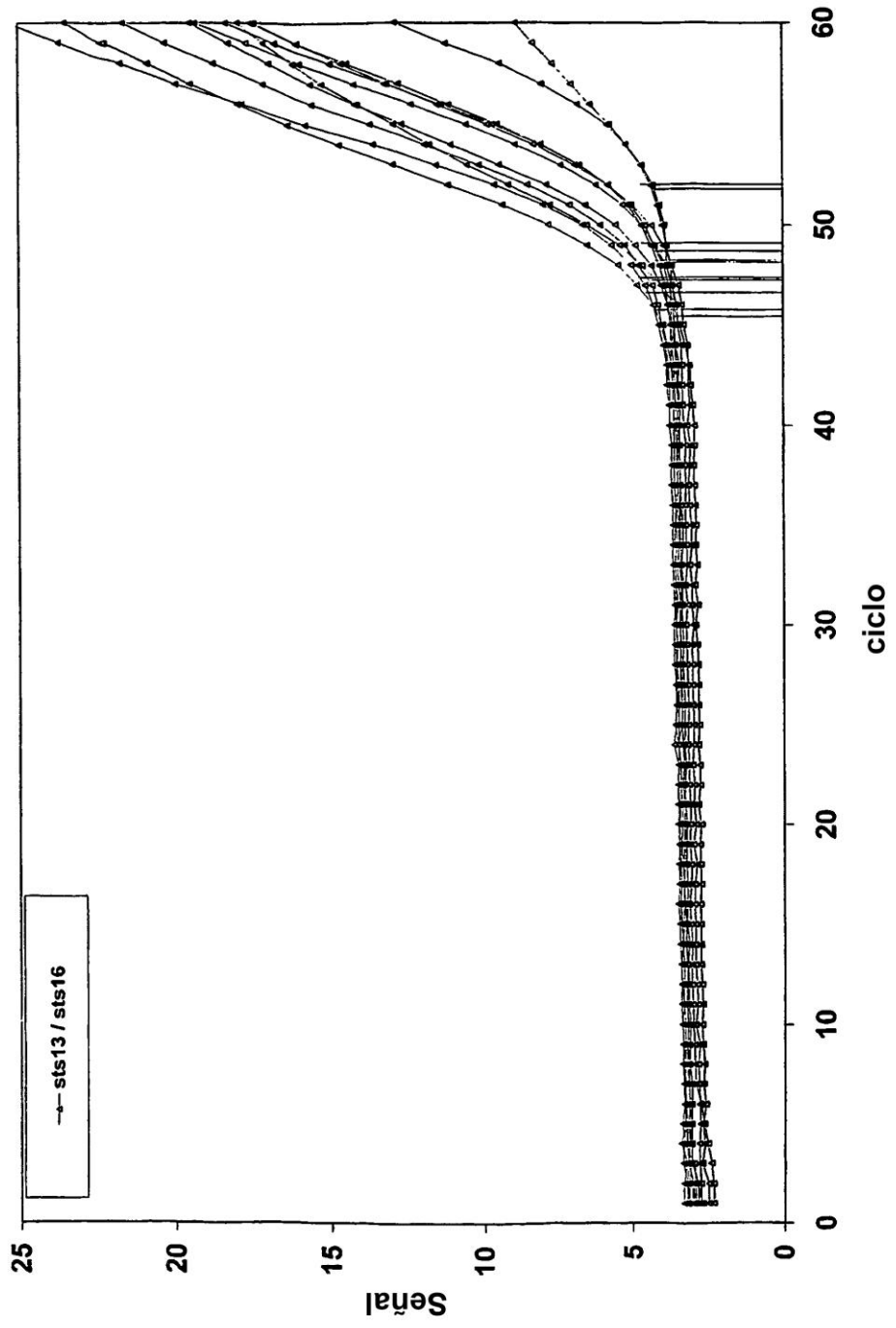


Fig. 3

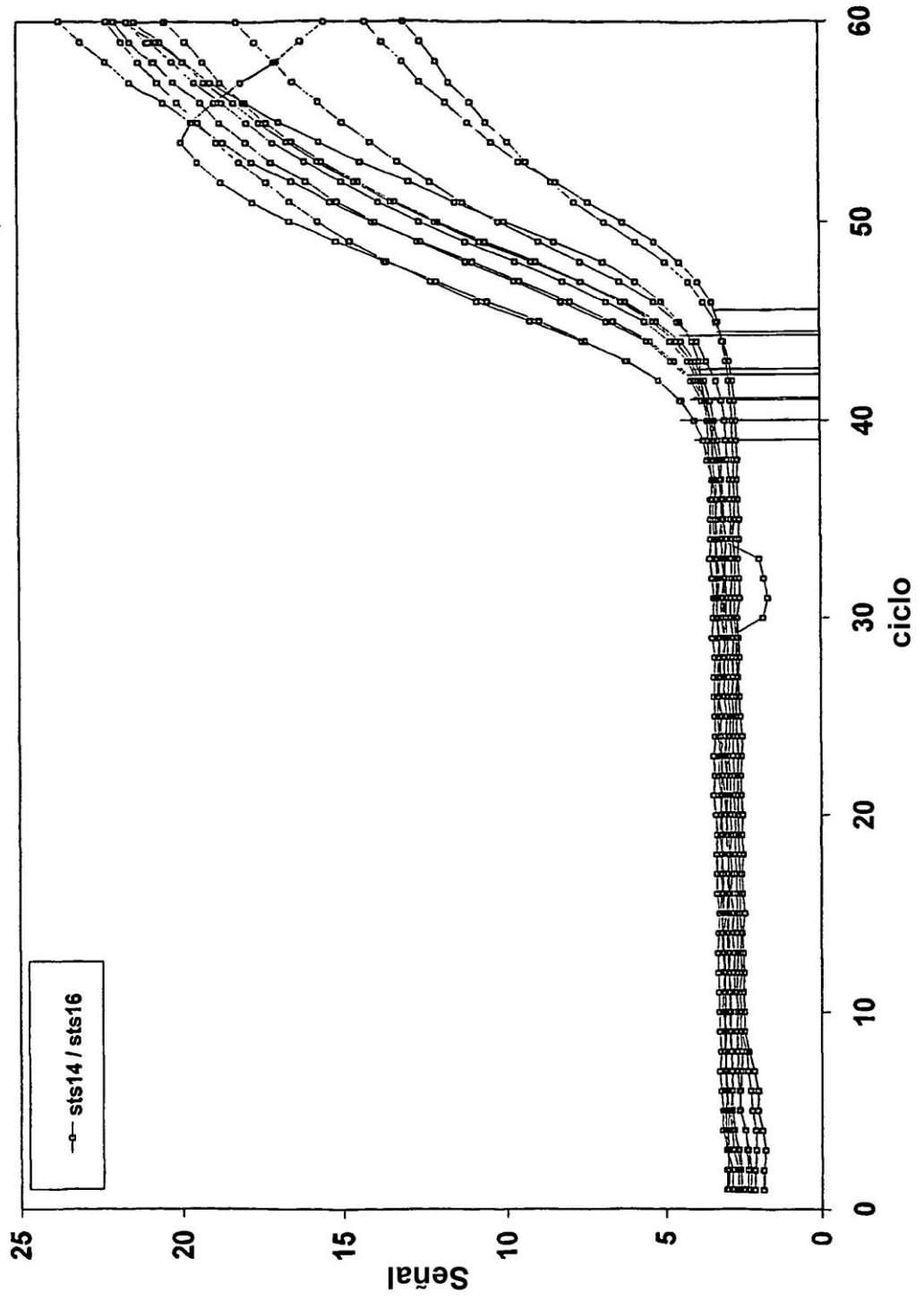
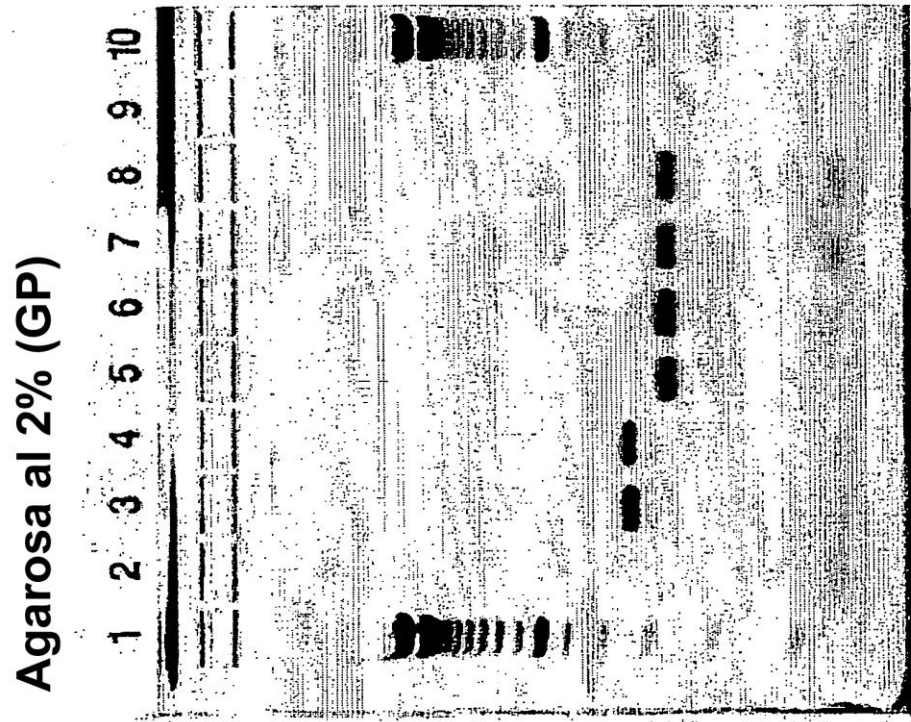


Fig. 4



5

10

Fig. 5

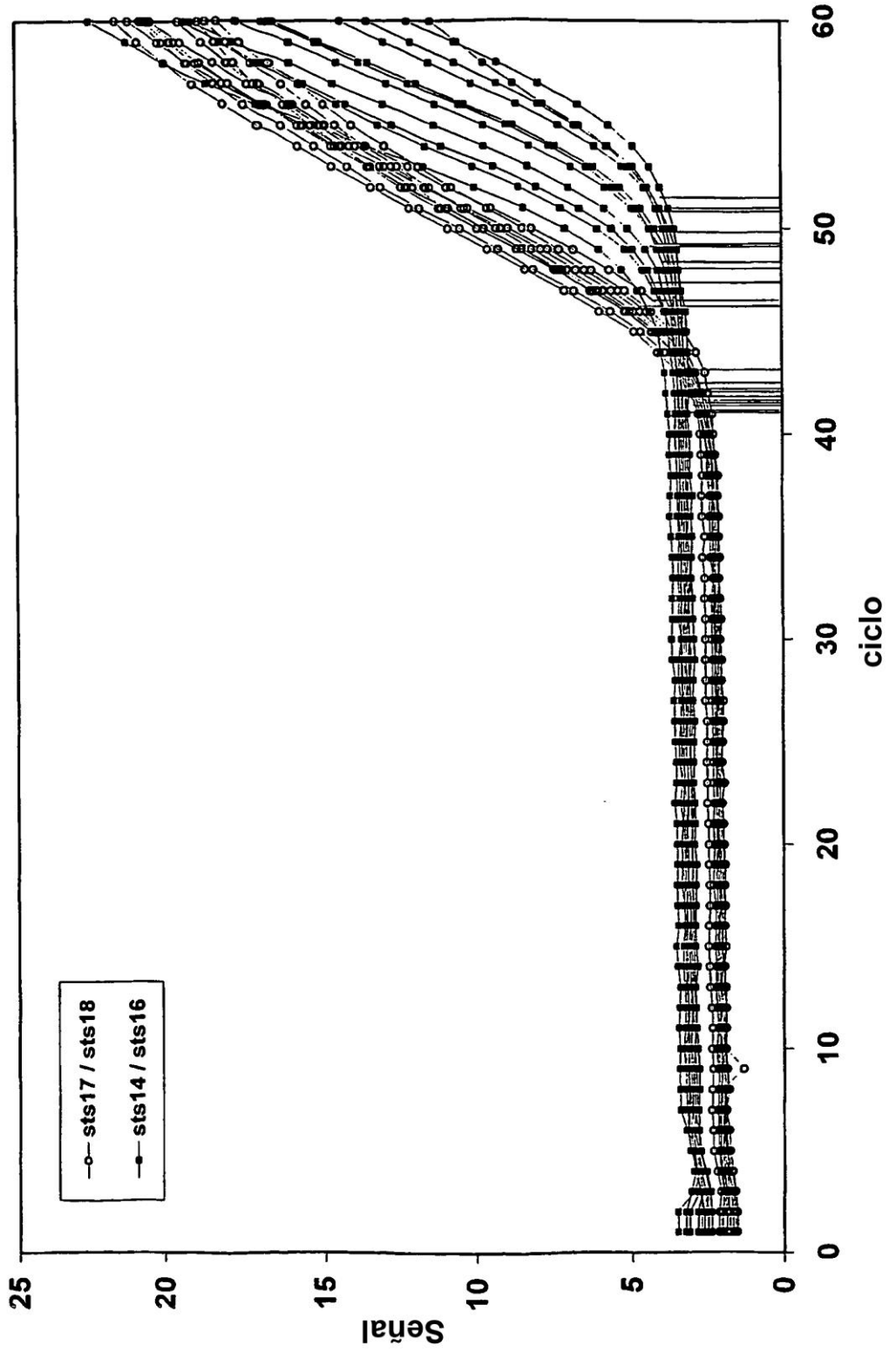


Fig. 6

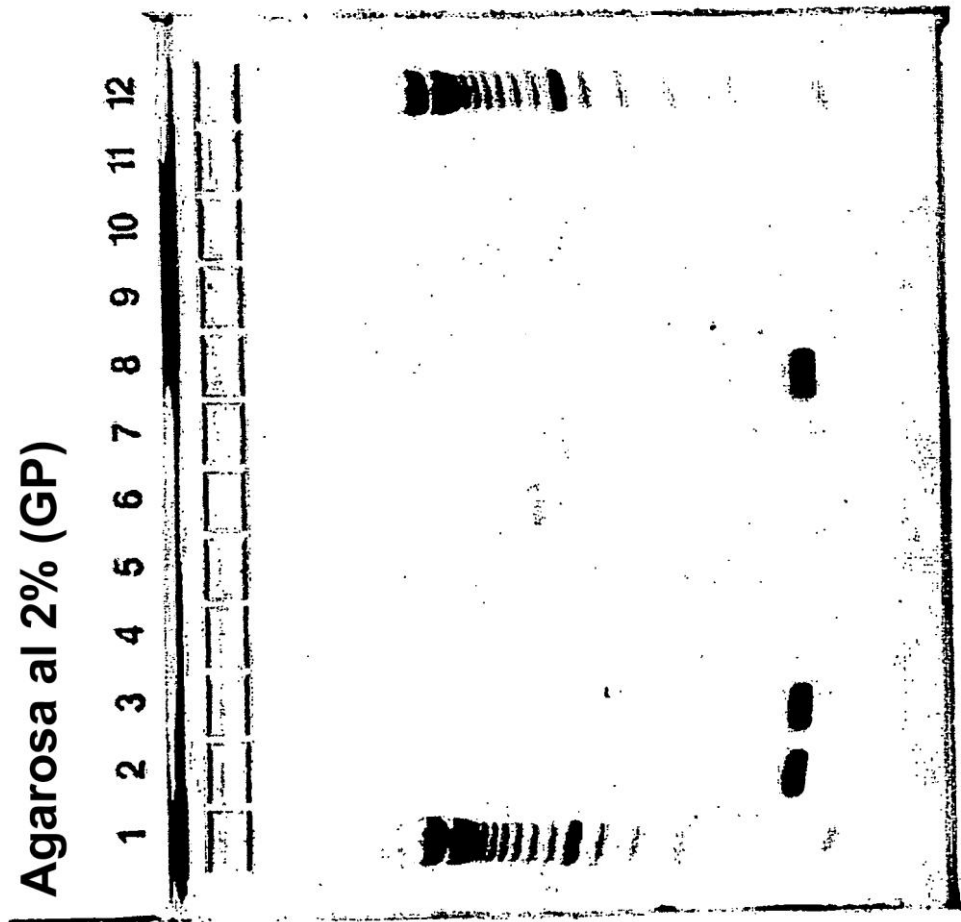


Fig. 7

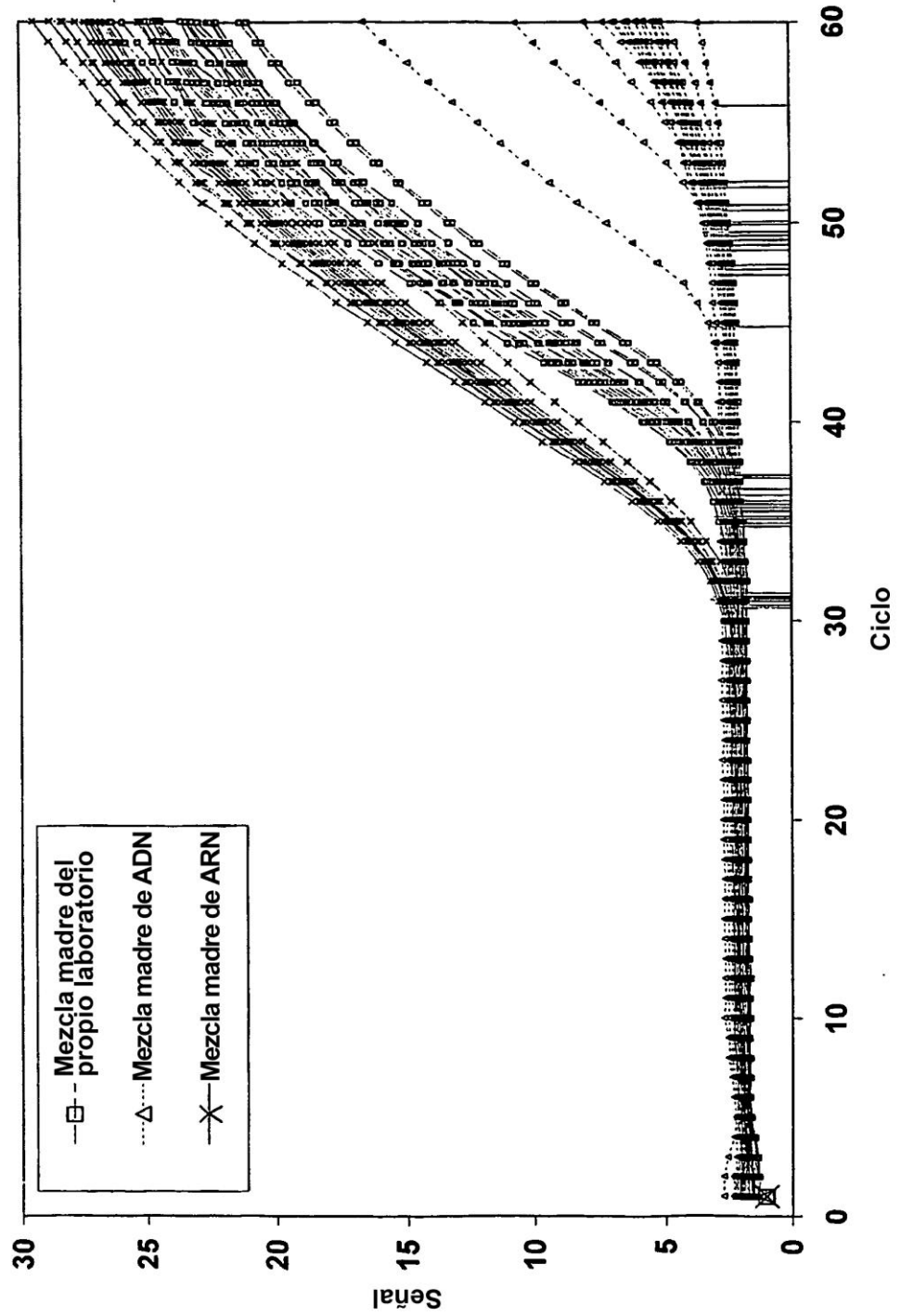


Fig. 8:

