


PCT ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
 Oficina Internacional
**SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION
 EN MATERIA DE PATENTES (PCT)**

<p>(51) Clasificación Internacional de Patentes ⁶ : A61K</p>	A2	<p>(11) Número de publicación internacional: WO 96/25909</p> <p>(43) Fecha de publicación internacional: 29 de Agosto de 1996 (29.08.96)</p>
<p>(21) Solicitud internacional: PCT/ES96/00031</p> <p>(22) Fecha de la presentación internacional: 16 de Febrero de 1996 (16.02.96)</p> <p>(30) Datos relativos a la prioridad: P 9500320 17 de Febrero de 1995 ES (17.02.95)</p> <p>(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): INSTITUTO DE SALUD CARLOS III [ES/ES]; Calle Sinesio Delgado, 6, E-28029 Madrid (ES).</p> <p>(72) Inventores; e</p> <p>(75) Inventores/solicitantes (sólo US): CASAS, Inmaculada [ES/ES]; CNMVIS, Carretera Majadahonda a Pozuelo, Km 2,5, E-28220 Majadahonda (ES). TENORIO, Antonio [ES/ES]; (ES). ECHEVARRIA, José, Manuel [ES/ES]; (ES). KLAPPER, Paul, E. [GB/GB]; University of Manchester, Virology Unit, Clinical Sciences Building, Manchester (GB). CLEATOR, Graham, M. [GB/GB]; University of Manchester, Virology Unit, Clinical Sciences Building, Manchester (GB).</p>		<p>(81) Estados designados: AU, CA, CN, GB, JP, US, Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publicada <i>Sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe.</i></p>
<p>(54) Title: PROCESS FOR THE GENOME AMPLIFICATION AND MIXTURES OF INDUCER OLIGONUCLEOTIDES FOR THE DETECTION AND IDENTIFICATION OF RELATED INFECTIOUS AGENTS</p> <p>(54) Título: PROCEDIMIENTOS DE AMPLIFICACION DE GENOMA Y MEZCLAS DE OLIGONUCLEOTIDOS INICIADORES PARA LA DETECCION Y LA IDENTIFICACION DE AGENTES INFECCIOSOS RELACIONADOS</p> <p>(57) Abstract</p> <p>In order to initiate the detection reaction, a combination of mixtures of inducer oligonucleotides is used, each of said mixtures being specifically designed for a family of infectious agents with genomically related sequences, and being obtained by simple addition of homologous oligonucleotides at its 3' extremity. The amplification reaction may be carried out in the same way while including an internal amplification control. The amplification products may be later discriminated by hybridation or by a second amplification reaction. The processes and mixtures of the invention are specially useful for the differential diagnosis of infectious agents which produce similar pathologies, specially the human herpes viruses and enteroviruses.</p> <p>(57) Resumen</p> <p>Se utiliza para la reacción de detección una combinación de mezclas de oligonucleótidos iniciadores, estando cada una de dichas mezclas específicamente diseñada para una familia de agentes infecciosos con secuencias genómicamente relacionadas y obteniéndose como suma simple de oligonucleótidos homólogos en su extremo 3'. La reacción de amplificación puede realizarse igualmente con la inclusión de un control de amplificación interno. Los productos de la amplificación pueden discriminarse posteriormente por hibridación o por una segunda reacción de amplificación. Los procedimientos y mezclas de la invención son especialmente útiles para realizar el diagnóstico diferencial de agentes infecciosos que producen patologías similares, especialmente los herpesvirus y enterovirus humanos.</p>		

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AM	Armenia	GB	Reino Unido	MW	Malawi
AT	Austria	GE	Georgia	MX	México
AU	Australia	GN	Guinea	NE	Níger
BB	Barbados	GR	Grecia	NL	Países Bajos
BE	Bélgica	HU	Hungría	NO	Noruega
BF	Burkina Faso	IE	Irlanda	NZ	Nueva Zelanda
BG	Bulgaria	IT	Italia	PL	Polonia
BJ	Benin	JP	Japón	PT	Portugal
BR	Brasil	KE	Kenya	RO	Rumania
BY	Belarús	KG	Kirguistán	RU	Federación Rusa
CA	Canadá	KP	República Popular Democrática de Corea	SD	Sudán
CF	República Centroafricana	KR	República de Corea	SE	Suecia
CG	Congo	KZ	Kazajstán	SG	Singapur
CH	Suiza	LI	Liechtenstein	SI	Eslovenia
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Eslovaquia
CM	Camérún	LR	Liberia	SN	Senegal
CN	China	LT	Lituania	SZ	Swazilandia
CS	Checoslovaquia	LU	Luxemburgo	TD	Chad
CZ	República Checa	LV	Letonia	TG	Togo
DE	Alemania	MC	Mónaco	TJ	Tayikistán
DK	Dinamarca	MD	República de Moldova	TT	Trinidad y Tabago
EE	Estonia	MG	Madagascar	UA	Ucrania
ES	España	ML	Mali	UG	Uganda
FI	Finlandia	MN	Mongolia	US	Estados Unidos de América
FR	Francia	MR	Mauritania	UZ	Uzbekistán
GA	Gabón			VN	Viet Nam

PROCEDIMIENTOS DE AMPLIFICACION DE GENOMA Y MEZCLAS DE OLIGONUCLEOTIDOS INICIADORES PARA LA DETECCION Y LA IDENTIFICACION DE AGENTES INFECCIOSOS RELACIONADOS.

5 Campo de la invención

La invención se refiere a nuevas mezclas de iniciadores de reacción y a nuevos procedimientos de amplificación genómica útiles para la detección e identificación específica de agentes infecciosos relacionados, especialmente de agentes infecciosos capaces de producir enfermedad neurológica y más especialmente para detección e identificación específica de virus herpes y enterovirus humanos.

15 Estado de la técnica

La detección y caracterización de los diferentes agentes infecciosos es uno de los objetivos de trabajo de un laboratorio de diagnóstico que con frecuencia tiene que plantearse la necesidad de establecer un diagnóstico diferencial, tal como sucede, entre otros, en el diagnóstico de infección neurológica aguda. Las infecciones neurológicas y más concretamente, las de origen vírico se producen, entre otros, por virus pertenecientes a dos Familias taxonómicamente no relacionadas: *Herpesviridae* y *Picornaviridae*. En primer lugar, los virus Herpes son agentes infecciosos que tras la primoinfección establecen latencia produciendo en determinadas condiciones recurrencias periódicas. Son virus envueltos cuyo genoma consiste en una molécula de ADN bicatenario. Fundamentalmente, la patología neurológica se asocia a recurrencias de los virus Herpes simplex tipo 1 (HSV1), Herpes simplex tipo 2 (HSV2) y Virus de la varicela zóster (VZV). Además, Citomegalovirus (CMV), Herpesvirus humano 6 (HHV6) y el Virus de Epstein-Barr (EBV) son posibles agentes directamente relacionados

con determinados síndromes que conllevan una alteración neurológica. Meningitis aséptica, encefalitis, meningoencefalitis y polirradiculitis son las manifestaciones clínicas más comunes de las infecciones del sistema nervioso central asociadas a este grupo de virus. En segundo lugar, incluido dentro de la familia Picornaviridae se encuadra al grupo de los enterovirus, género conocido ya desde el siglo XIV a.C. por la producción de epidemias de poliomielitis. La infección por estos virus de pequeño tamaño no envueltos y cuyo genoma está constituido por una molécula de ARN monocatenaria de polaridad positiva, tiene mayor incidencia en los primeros años de vida y genera un amplio espectro de síndromes clínicos. En los países desarrollados son los agentes etiológicos más frecuentes de casos de meningitis aséptica, síndrome neurológico que en España se asocia con los enterovirus en un 90% del total de los casos dependiendo del año y de los brotes epidémicos producidos.

Tanto los enterovirus como los virus herpes son capaces de producir síndromes neurológicos tanto en pacientes inmunocompetentes como en inmunodeprimidos. La meningitis aséptica, por su elevada frecuencia, además de encefalitis y meningoencefalitis, por su peor evolución clínica, son motivo de diferentes estudios que tienen como fin el hallazgo de los virus implicados en su producción.

El control de las enfermedades neurológicas agudas puede realizarse mediante el establecimiento de un diagnóstico eficaz que permita el hallazgo y la identificación del agente etiológico asociado a un determinado cuadro neurológico. La detección e identificación de estos agentes infecciosos es una de las necesidades fundamentales de un laboratorio de diagnóstico microbiológico. En la actualidad, el diagnóstico de laboratorio se basa en el aislamiento de los diferentes virus en cultivos celulares. Esta técnica es lenta y

además requiere un esfuerzo adicional para mantener líneas celulares distintas con el fin de abarcar el número mayor de serotipos de enterovirus, además de los diferentes virus herpes. Un resultado positivo en aislamiento puede ser establecido en un período de tiempo entre 4 y 15 días. Sin embargo, determinados enterovirus son incapaces de crecer en cultivos celulares lo que impide su detección en este tipo de sistemas de diagnóstico.

Con respecto a las técnicas serológicas, los sistemas indirectos de análisis de anticuerpos específicos producidos frente a un determinado virus herpes son de gran utilidad cuando se analizan muestras en donde el título de anticuerpos es elevado. Esta situación es diferente en aquellos casos de infección neurológica, en donde la muestra que se analiza es, principalmente, líquido cefalorraquídeo (LCR). En este tipo de muestras el título de anticuerpos específicos frente a un virus puede ser muy bajo y apenas detectable. Por otra parte los métodos indirectos de análisis de anticuerpos específicos frente a enterovirus no tienen un valor diagnóstico debido a su libre circulación como patógenos normales entre la población sana. Además, la gran diversidad antigénica de los enterovirus no permite desarrollar técnicas serológicas suficientemente sensibles y específicas para identificar todos sus tipos.

La introducción de técnicas de amplificación genómica (PCR) de agentes infecciosos víricos en muestras clínicas, ha supuesto uno de los mayores avances a la hora de detectar el agente etiológico de numerosas enfermedades infecciosas y por ello a la hora de establecer un diagnóstico etiológico diferencial. Así, los procedimientos de amplificación genómica de herpesvirus y enterovirus en muestras clínicas están ampliamente documentados en la literatura. Concretamente en el proceso de amplificación de ARN es necesario llevar a cabo una

primera fase inicial en la que se debe de producir una molécula de ADN complementario específico mediante un proceso de transcripción inversa. Particularmente, son importantes aquellos protocolos en los que se han diseñado conjuntamente la amplificación de diferentes virus en una única reacción (multiplex-PCR) como es el caso de los virus herpes (Patente Española P9201174). Virus pertenecientes a una misma familia y que están intrínsecamente relacionados entre sí, presentan un elevado grado de homología de determinadas zonas genómicas; por ejemplo, la región 5' no codificante, en el caso de los enterovirus y la región que codifica para el gen de la ADN polimerasa, en el caso de los virus Herpes. Estas zonas genómicas altamente conservadas, son motivo de estudios moleculares y en ellas se diseñan iniciadores comunes y específicos que serán utilizados en la técnica de PCR para poder detectar e identificar cada uno de los virus en un solo ensayo. La principal ventaja de este tipo de ensayos es el ahorro de muestra clínica y de tiempo para establecer un diagnóstico etiológico diferencial.

El uso de técnicas de amplificación múltiple no sólo permite detectar cualquier enterovirus o herpesvirus incluyendo los difícilmente cultivables, sino que permite en el caso de los virus herpes su identificación específica aunque estén presentes en cantidades tan pequeñas como en LCR. Hay que destacar, que una técnica de amplificación múltiple presenta también una serie de inconvenientes y problemas de difícil solución. Los problemas de inespecificidad, reproducibilidad y falta de sensibilidad son, entre otros, cuestiones que *a priori*, son necesarias considerar, sobre todo en el momento del diseño de los iniciadores específicos de cada uno de los virus a amplificar. Una vez diseñados los iniciadores, la fase de estandarización de la técnica de amplificación múltiple es esencial, y es en este período en donde se

presentan los mayores problemas de incompatibilidad a todos los niveles. Interacciones entre los iniciadores específicos de los correspondientes virus a detectar y el genoma humano, molécula que presenta un elevado grado de complejidad, generan amplificaciones inespecíficas no deseables. Hay que tener en cuenta, que la molécula de ADN humano está presente en todo tipo de muestra clínica en donde se realiza la detección específica de los agentes víricos implicados en una determinada enfermedad infecciosa. Además, la presencia en una misma muestra de agentes radicalmente diferentes como los virus herpes y los enterovirus puede suponer un fallo del sistema en cuanto a la reproducibilidad de los resultados obtenidos. Otro factor a tener en cuenta es la fase inicial de transcripción inversa de las moléculas de ARN enterovírico ya que puede representar una pérdida de la disponibilidad de las moléculas de ADN de herpesvirus a ser amplificadas en la segunda fase de polimerización (PCR).

Otro de los problemas que se pueden encontrar cuando se utiliza la técnica de PCR en el laboratorio de diagnóstico, se deben incluir una serie de controles específicos que excluyan los falsos negativos, debidos a la presencia de inhibidores de la reacción de amplificación. Así, es muy recomendable el desarrollo y uso de controles internos de amplificación en cada tubo de reacción.

La aplicación de la tecnología de PCR y las posibles combinaciones de iniciadores para poder amplificar secuencias genómicas de virus asociados con la producción de infección neurológica, cubriría una de las necesidades que se plantean en el diagnóstico de laboratorio.

Descripción de la invención

La presente invención tiene por objeto describir nuevas mezclas de iniciadores de reacción y nuevos

procedimientos de amplificación genómica útiles para la
detección e identificación específica de agentes
infecciosos relacionados, especialmente de agentes
infecciosos capaces de producir enfermedad neurológica y
5 más especialmente para detección e identificación
específica de herpesvirus y enterovirus humanos, virus sin
ninguna homología significativa a nivel genómico.

Un aspecto de la invención es un procedimiento de
amplificación de genoma para la detección de agentes
10 infecciosos relacionados en una única mezcla de reacción,
caracterizado por

1 utilizar una combinación de mezclas de
oligonucleótidos iniciadores, estando cada mezcla
15 específicamente diseñada para una familia de agentes
infecciosos con secuencias genómicamente relacionadas
y caracterizada a su vez por:

- i) obtenerse como suma simple de oligonucleótidos,
- ii) por incluir, cada uno de los oligonucleótidos
20 componentes de dicha mezcla, preferentemente en
su extremo 3', secuencias homólogas
seleccionadas de entre las secuencias
relacionadas que se quieren amplificar,
- iii) por poder incluir además, cada uno de los
25 oligonucleótidos componentes de dicha mezcla,
preferentemente en su extremo 5', secuencias no
homólogas seleccionadas de entre las secuencias
relacionadas que se quieren amplificar, y
- iv) porque uno o más de los oligonucleótidos
30 componentes de dicha mezcla pueden diferenciarse
de las secuencias conocidas que se quieren
amplificar en la menos un nucleótido, y

2 porque todas las mezclas diseñadas según las
35 características anteriores se combinan en una única

mezcla que será utilizada para la reacción de amplificación genómica.

5 El término "secuencias homólogas", en el sentido utilizado en esta descripción, se refiere a secuencias de nucleótidos que tienen una homología entre sí superior al 50%, preferiblemente superior al 70% y, todavía más preferiblemente, superior al 90%.

10 Otro aspecto de la invención son mezclas como las descritas para el procedimiento anterior.

El uso de los procedimientos y mezclas anteriormente descritos suma, a las ventajas logradas por el uso individual de las mezclas descritas y que esencialmente son una mejora en la especificidad y sensibilidad de reacción, la ventaja añadida de poder detectar, en una
15 única reacción de amplificación, agentes infecciosos que producen patologías similares pero que no están genómicamente relacionados entre sí, tal como sucede con los virus pertenecientes a las familias *Herpesviridae* y
20 *Picornaviridae*. Para cada una de las familias, la mejora en la sensibilidad se logra disminuyendo al máximo el grado de degeneración de los iniciadores, diseñados sobre una zona con secuencias relativamente conservadas entre los diferentes miembros de la familia. La mejora en la
25 especificidad se logra aumentando, si fuera necesario, la longitud de los iniciadores y extendiéndolos en su extremo 5' hacia zonas no conservadas entre los diferentes miembros de la familia y logrando así una longitud de iniciador suficiente como para evitar la hibridación
30 inespecífica con secuencias similares que puedan estar presentes en genomas con elevada complejidad, como el humano.

Las mezclas y procedimientos anteriormente descritos son útiles para la detección de agentes infecciosos que
35 producen patologías similares pero que no están

genómicamente relacionados entre sí, especialmente los que producen patología en humanos, como son los pertenecientes a las familias *Herpesviridae* y *Picornaviridae*.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento de
5 detección e identificación de secuencias genómicas relacionadas, caracterizado por

i) hacerse una primera reacción de amplificación de
10 genoma en la que al menos uno de los iniciadores utilizados es en una mezcla como la utilizada en el primer procedimiento descrito

ii) tomando como sustrato el producto de la primera
15 reacción, realizar la identificación específica mediante hibridación con oligonucleótidos específicos de cada una de las especies que se quiere identificar.

Este procedimiento permite realizar tanto la
20 detección como la identificación de agentes infecciosos relacionados en dos reacciones consecutivas, la primera de amplificación genómica y la segunda de hibridación específica, posibilitando así tanto la detección como la identificación de agentes infecciosos relacionados.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento de
25 amplificación de genoma para la detección y la identificación de agentes infecciosos relacionados en una única mezcla de reacción, caracterizado porque al menos uno de los iniciadores utilizados es una mezcla
30 caracterizada

i) por obtenerse como suma simple de oligonucleótidos,
ii) por incluir, cada uno de los oligonucleótidos
35 componentes de dicha mezcla, preferentemente en su extremo 3', secuencias específicas de cada una de las

secuencias que se quieren tipificar en la reacción de amplificación,

- 5 iii) por estar diseñada de manera que los fragmentos específicos amplificados son diferentes entre sí por tamaño o por diferente marcaje físico o químico de cada uno de los oligonucleótidos componentes de la mezcla, y
- 10 iv) porque uno o más de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla pueden diferenciarse de las secuencias conocidas que se quieren amplificar en la menos un nucleótido.

15 Otro aspecto de la invención son mezclas como las descritas para el procedimiento anterior.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento de detección e identificación de secuencias genómicas relacionadas, caracterizado por

- 20 i) hacerse una primera reacción de amplificación de genoma en la que al menos uno de los iniciadores utilizados es en una mezcla como la utilizada en el primer procedimiento descrito y
- 25 ii) tomando como substrato el producto de la primera reacción, realizar una segunda reacción de amplificación en la que se utiliza una mezcla como la descrita en el procedimiento anterior.

30 Este procedimiento permite igualmente realizar tanto la detección como la identificación de agentes infecciosos relacionados, en dos reacciones consecutivas.

35 Además, según la invención, la mezcla compleja de iniciadores utilizada en la segunda reacción no produce las amplificaciones inespecíficas debidas a su uso en

presencia de un genoma complejo. Esto se logra utilizando como sustrato de la segunda reacción el producto de reacción obtenido en la primera reacción de amplificación.

5 Las mezclas y los procedimientos anteriormente descritos son especialmente útiles para la detección y la identificación específica de diferentes agentes infecciosos relacionados por producir patología similar, especialmente en el hombre.

10 Otro aspecto de la invención es la inclusión de un control interno de amplificación en los procedimientos y mezclas anteriores que se utilizan para la detección e identificación de agentes infecciosos relacionados. Así, según la invención, los procedimientos y mezclas anteriores pueden incluir en la propia mezcla de reacción
15 cantidades concretas de un genoma que no cabe esperar en una muestra clínica, además de los iniciadores de reacción u otros reactivos específicos que permitan su detección si la reacción de amplificación se ha desarrollado en ausencia de inhibidores. La inclusión del control interno
20 de amplificación permitirá detectar las muestras que contienen inhibidores de la amplificación, identificando así fácilmente los resultados falsos negativos.

Un último aspecto de la invención son mezclas de oligonucleótidos diseñadas para ser utilizadas como
25 iniciadores de la reacción de amplificación, caracterizadas porque al menos uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla se diferencia de las secuencias conocidas que se quieren amplificar en al menos un nucleótido.

30 La alteración de la secuencia según la invención, tiene como principal objetivo lograr que las mezclas complejas de iniciadores sean compatibles entre sí; es decir, que no se produzcan hibridaciones entre los diferentes componentes de las mezclas de oligonucleótidos
35 presentes en la mezcla de reacción de amplificación. Las

hibridaciones entre oligonucleótidos, frecuentes en mezclas complejas, producen durante la reacción de amplificación secuestro del reactivo necesario y, frecuentemente, la formación de dímeros de iniciadores.

5 Una realización de la invención es la aplicación de las mezclas y procedimientos anteriormente descritos para la detección e identificación de agentes infecciosos relacionados por ser capaces de producir patología similar, especialmente aquéllos capaces de producir
10 patología similar en el hombre, más especialmente aquéllos capaces de producir enfermedad neurológica en el hombre, concretamente los pertenecientes a las familias *Herpesviridae* y *Picornaviridae*.

Los siguientes ejemplos y figuras ilustran, pero no
15 limitan, algunos de los modos de llevar a cabo la invención.

Descripción de las figuras

Figura 1

20 Alineamiento de las secuencias de nucleótidos correspondientes a los fragmentos 5' no codificantes (5'NCR) de los enterovirus de secuencia conocida. Los nombres de los virus y su procedencia se describe a continuación, así como el código de reconocimiento de
25 secuencia en la base de datos de donde se han obtenido (GenBank), entre corchetes, y su identificación en la figura, entre paréntesis. Poliovirus tipo 1, cepa Mahoney [POL1] (POL1A); Poliovirus tipo 1, cepa Mahoney versión A [POLIO1A] (POL1B); Poliovirus tipo 1, cepa Mahoney versión
30 B [POLIO1B] (POL1C); Poliovirus tipo 1, cepa Sabin 1 [POLIOS] (POL1D); Poliovirus tipo 2, cepa Sabin 2 [PIPOLS2] (POL2A); Poliovirus tipo 2 [POL2CG1] (POL2B); Poliovirus tipo 2, cepa Lansing [POL2LAN] (POL2C); Poliovirus tipo 3, cepa Sabin 3 [PIPOL3] (POL3A);
35 Poliovirus tipo 3, cepa 23127 [PIPO3XX] (POL3B);

Poliovirus tipo 3, cepa León 37 [POL3L37] (POL3E);
Poliovirus tipo 3, cepa P3/119 [PIPO3119] (POL3C);
Poliovirus tipo 3, cepa León 12a1b [POL3L12C] (POL3D);
Coxsackievirus A21 [CXA21CG] (CA21); Coxsackievirus B1
5 [CXA1g] (CB1); Coxsackievirus B3 [CXA3CG] (CB3);
Coxsackievirus B4 [PICOXB4] (CB4); Coxsackievirus B4 [CXB4S]
(CB4S); Coxsackievirus B5 [CXB5CGA] (CB5); Coxsackievirus
A16 [CAU05876] (CA16); Coxsackievirus A9 [CXA9CG] (CA9);
Coxsackievirus A24 [CXA24CG] (CA24); Echovirus 12 [EC12TCG]
10 (E12); Echovirus 12, prototipo Travis salvaje [EC12TCGW]
(E12W). Se identifican con el código de secuencia (SEQ ID
No:) las correspondientes secuencias de los iniciadores de
enterovirus. Los guiones representan ausencia del
correspondiente nucleótido en los alineamientos.

15 **Figura 2**

Representación esquemática de los alineamientos de
las secuencias de nucleótidos correspondiente a: (A)
fragmentos diana de los genes de la ADN polimerasa de los
6 herpesvirus humanos: Herpes simplex tipo 1 (HSV1);
20 Herpes simplex tipo 2 (HSV2); Virus Varicela-zóster (VZV);
Citomegalovirus (HCMV); Herpesvirus humano 6 tipo A (HHV6-
A); virus Epstein-Barr (EBV); de la ADN polimerasa humana
(HUMANA) y del Virus de la Pseudorrabia Porcina (PRV), (B)
Oligonucleótidos iniciadores de la primera reacción de
25 amplificación y (C) Oligonucleótidos iniciadores de la
segunda reacción de amplificación. Se identifica cada
oligonucleótido con el código de secuencia (SEQ ID No:).

Figura 3

Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de
30 amplificación generados en el Ejemplo 2. Marcador de peso
molecular (M); Coxsackievirus A 16 (carril 1); HSV1
(carril 2); HSV2 (carril 3); VZV (carril 4); CMV (carril
5); HHV6 (carril 6); EBV (carril 7); Mezcla de todos los
herpesvirus (carril 8); Fibroblastos fetales humanos
35 (carriles 9 y 17); Coxsackievirus A16 y HSV1 (carril 10);

Coxsackievirus A16 y HSV2 (carril 11); Coxsackievirus A16 y VZV (carril 12); Coxsackievirus A16 y CMV (carril 13); Coxsackievirus A16 y HHV6 (carril 14); Coxsackievirus A16 y EBV (carril 15); Coxsackievirus A16 y mezcla de todos los herpesvirus (carril 16). El fragmento de 500 bp corresponde a los enterovirus y el de 194 bp a los herpesvirus.

Figura 4

Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de amplificación generados en el Ejemplo 4. Marcador de peso molecular (M); marcador de peso molecular de los fragmentos amplificados: 120 bp HSV1 y HSV2, 98 bp VZV, 78 bp CMV, 66 bp HHV6 y 54 bp EBV (carriles 1, 10 y 19). HSV1, HSV2, VZV, CMV, HHV6, EBV (carriles 2, 3, 4, 5, 6 y 7 sin ARN de Coxsackievirus A16 respectivamente, carriles 11, 12, 13, 14, 15 y 16 en presencia de ARN de Coxsackievirus A16 respectivamente). Mezcla de todos los herpesvirus (carril 8 y 17 con y sin ARN de Coxsackievirus A16 respectivamente); Fibroblastos humanos (carriles 9 y 18).

Figura 5

Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de amplificación generados en la primera y en la segunda amplificación según el Ejemplo 6. Marcador de peso molecular (M), fragmento de 500 bp corresponde a la amplificación de Coxsackievirus A16 (carriles 1, 3 y 4), el fragmento de 194 bp corresponde a primera amplificación de PRV (carriles 2, 3 y 4). Marcador de peso molecular de herpesvirus (carril 6), Coxsackievirus A16 en segunda amplificación (carril 7), identificación de PRV sin enterovirus (carril 8), con enterovirus (carril 9), en una mezcla de todos los herpesvirus (carril 10), Fibroblastos fetales humanos (carriles 5 y 11).

Figura 6

Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de amplificación generados en segunda amplificación de los virus herpes con o sin control interno de amplificación según el Ejemplo 7. Marcador de peso molecular (M); mezcla de todos los herpesvirus, HSV1, HSV2, VZV, CMV, HHV6, EBV y Fibroblastos fetales humanos con iniciadores del segunda reacción de amplificación múltiple de herpesvirus (carriles 1 al 8 respectivamente), con iniciadores de PRV además de los de amplificación múltiple de herpesvirus (carriles 9 al 16 respectivamente), con iniciadores de PRV y ADN de PRV (carriles 17 al 24 respectivamente).

Figura 7

1) Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de amplificación generados en la primera y en la segunda amplificación según el Ejemplo 10. Marcador de peso molecular (M), fragmento de 500 bp para Coxsackievirus A16 (carril 1) y los fragmentos de 194 bp para HSV1 (carriles 2 y 3) y HSV2 (carril 4). Después de la tipificación se observa amplificación específica de HSV1 (carril 5) y HSV2 (carril 6).

2) Electroforesis en gel de agarosa de cuatro muestras clínicas en las que se identificó previamente a la amplificación genómica HSV1 (carriles 1 y 2) y HSV2 (carriles 3 y 4). Fibroblastos fetales humanos (carriles 5 y 6). Marcador de peso molecular (M).

En una realización práctica de esta invención, se proporciona un método para el diagnóstico diferencial de agentes infecciosos relacionados por su capacidad de producir una patología similar, pertenecientes a distintas familias que no están genómicamente relacionadas entre sí, que incluye (a) la detección de dichos agentes infecciosos por amplificación enzimática de un fragmento de sus genomas y (b) la identificación de dichos agentes

infecciosos a partir de los productos de la reacción de amplificación, en el que dicha reacción de amplificación se lleva a cabo en una única mezcla de reacción que comprende, como iniciador de la reacción, una combinación de mezclas de oligonucleótidos, cada una de las cuales ha sido específicamente diseñada para cada una de las familias de agentes infecciosos a detectar de manera que cada mezcla de oligonucleótidos:

- i) se obtiene como suma simple de oligonucleótidos,
- 10 ii) cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla, incluye, preferentemente en su extremo 3', secuencias homólogas seleccionadas de entre las secuencias genómicamente relacionadas que se quieren amplificar,
- 15 iii) cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla, puede incluir además, preferentemente en su extremo 5', secuencias no homólogas seleccionadas de entre las secuencias genómicamente relacionadas que se quieren amplificar, y
- 20 iv) cuyos oligonucleótidos componentes pueden diferenciarse de las secuencias conocidas que se quieren amplificar en al menos un nucleótido.

Una aplicación concreta de dicho método consiste en la detección e identificación de agentes infecciosos que producen una patología similar en humanos, en particular, una patología neurológica, tal como la causada por agentes infecciosos pertenecientes a las familias *Herpesviridae* y *Picornaviridae*, particularmente la causada por herpesvirus y enterovirus humanos.

En una realización alternativa de dicho método, la mezcla para la reacción de amplificación incluye además un control interno de amplificación que comprende el genoma de un virus que no debe estar presente en la muestra a estudiar junto con iniciadores de reacción específicos de

un fragmento de dicho genoma. Preferiblemente, dicho genoma deriva de una especie vírica perteneciente a una de las familias de virus a identificar y no es capaz de infectar a la especie animal, por ejemplo la humana, sobre la que se realiza el diagnóstico. En una realización particular, dicho genoma corresponde a un herpesvirus que no puede infectar al hombre tal como el herpesvirus porcino 1.

La identificación del agente infeccioso una vez detectado puede realizarse bien por hibridación de las secuencias amplificadas con sondas de oligonucleótidos específicos o mezclas de oligonucleótidos específicos de las especies o géneros a identificar o, alternativamente, por medio de una segunda reacción de amplificación de los productos resultantes de la primera reacción de amplificación en la que la mezcla de reacción para dicha segunda reacción de amplificación comprende, como iniciador de la reacción, una mezcla de oligonucleótidos diseñada de manera que:

- i) se obtiene como suma simple de oligonucleótidos,
- ii) cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla, incluye, preferentemente en su extremo 3', secuencias específicas de cada una de las secuencias a tipificar en dicha segunda reacción de amplificación,
- iii) los fragmentos específicos amplificados son diferentes entre sí por tamaño o por diferente marcaje físico o químico de cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla, y
- iv) uno o más de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla pueden diferenciarse de las secuencias conocidas que se quieren amplificar en al menos un nucleótido.

Al objeto de confirmar el diagnóstico, el método propuesto también contempla la posibilidad de confirmar la

identidad de cada especie de virus identificado mediante una reacción de hibridación específica adicional con un oligonucleótido específico de cada especie cuya identidad se desea confirmar o alternativamente mediante una
5 reacción de amplificación genómica adicional utilizando los oligonucleótidos iniciadores adecuados. De este modo, el método de diagnóstico facilitado por esta invención permite identificar específicamente la presencia de virus herpes simplex (tipo 1 ó tipo 2) en una muestra (véase
10 Ejemplo 10).

Ejemplos

**Ejemplo 1. Diseño de iniciadores para la detección de enterovirus humanos con objeto de obtener un método
15 múltiple de amplificación de enterovirus y/o herpesvirus.**

El género enterovirus engloba a un número muy elevado de virus de los que en sólo una minoría se ha podido obtener secuencias completas de su genoma. Se ha destacado la región 5' no codificante (5'NCR) por la enorme
20 homología que presentan los enterovirus secuenciados y cuyas secuencias están disponibles hasta la fecha en la base de datos GENBANK. La región 5'NCR presenta un enorme interés biológico por su participación en el inicio de la replicación de este grupo de virus. Excepcionalmente
25 enterovirus 22 y Coxsackievirus A2 que no presentan homología en esta zona del genoma, han sido excluidos del bloque génico conservado de la región 5'NCR de los enterovirus disponibles, que se representa en la Figura 1.

A partir de los análisis comparativos de cada uno de
30 los genomas estudiados se han diseñado los siguientes iniciadores:

POLARIDAD POSITIVA: SEQ ID No: 1

SEQ ID No: 2

35 POLARIDAD NEGATIVA: SEQ ID No: 3

Como se puede apreciar en la Figura 1, el grado de homología entre los dos iniciadores diseñados y la correspondiente secuencia específica de cada uno de los enterovirus cuyo genoma ha sido secuenciado, es muy elevada llegando a ser exactamente igual en la mayoría de los virus. Este grado de homología tan elevado permite realizar reacciones de amplificación de enterovirus muy específicas y altamente sensibles.

Una vez diseñados los iniciadores de enterovirus, se ha de compatibilizar el sistema para poder amplificar en una primera reacción de amplificación ARN procedente de los enterovirus, además de ADN procedente de los herpesvirus. Para ello se ha diseñado una mezcla de reacción que contiene los iniciadores de primera reacción de amplificación de enterovirus y herpesvirus. Los iniciadores de herpesvirus fueron diseñados y descritos en la Patente Española P9201174.

A partir de las secuencias reflejadas en las Figuras 1 y 2 y según el Ejemplo 2 y los procedimientos descritos en la Patente Española P9201174 se ha diseñado una mezcla de amplificación de enterovirus y herpesvirus en una única reacción de amplificación. La mezcla de iniciadores consiste en:

	POLARIDAD POSITIVA	POLARIDAD NEGATIVA
25	SEQ ID No: 1	SEQ ID No: 3
	SEQ ID No: 2	SEQ ID No: 9
	SEQ ID No: 4	SEQ ID No: 10
	SEQ ID No: 5	SEQ ID No: 11
30	SEQ ID No: 6	SEQ ID No: 12
	SEQ ID No: 7	SEQ ID No: 13
	SEQ ID No: 8	

Ejemplo 2. Detección de enterovirus y/o herpesvirus humanos en una primera reacción de amplificación.

Para realizar un primer ensayo de amplificación las muestras para analizar contienen diferentes diluciones de enterovirus mezcladas con una cantidad determinada de fibroblastos humanos. El método de preparación del ARN viral ha sido descrito anteriormente (Casas, I. Powell L., Klapper P.E., Cleator G.M. A new extraction method for RNA and DNA by precipitation in clinical samples. J. Virol. Methods 1994, en prensa). Una vez precipitados los ácidos nucleicos (ADN y ARN) presentes en la muestra a analizar se diluyen en 10 μ l de agua. El ARN presente en 5 μ l de la anterior dilución se transforma en cDNA mediante una transcripción inversa de 30 minutos de duración a una temperatura de 37°C, en las condiciones que recomienda el fabricante de la transcriptasa inversa, enzima vital para este proceso. Se utilizan 100 pmol de iniciador de polaridad negativa, ya que la hebra de ARN presenta una polaridad positiva.

El cDNA se someterá a una amplificación de 40 ciclos, con una temperatura de hibridación de los iniciadores de 60°C. El rango de la temperatura de desnaturalización se fija entre 92°C y 95°C, aunque preferentemente se ha elegido 94°C. La temperatura de extensión de la ADN polimerasa se fija entre 60°C y 80°C, aunque preferiblemente es 72°C. La mezcla de reacción está constituida por una mezcla de las dos mezclas de iniciadores en una concentración elegida de 100 pmol de cada uno de ellos. El volumen total elegido de la reacción es 50 μ l.

Utilizando los iniciadores diseñados en el Ejemplo 1, se ensayan muestras conteniendo 30 tipos diferentes de enterovirus procedentes de aislados clínicos obtenidos en nuestro laboratorio:

	Polio 1, salvaje y vacunal	Echovirus 7
	Polio 2, salvaje y vacunal	Echovirus 9
	Polio 3, salvaje y vacunal	Echovirus 11
	Coxsackievirus B1	Echovirus 14
5	Coxsackievirus B2	Echovirus 17
	Coxsackievirus B4	Echovirus 19
	Coxsackievirus B5	Echovirus 20
	Coxsackievirus B6	Echovirus 21
	Coxsackievirus A9	Echovirus 24
10	Coxsackievirus A16	Echovirus 25
	Echovirus 2	Echovirus 27
	Echovirus 3	Echovirus 30
	Echovirus 4	Echovirus 31
	Echovirus 5	Echovirus 33
15	Echovirus 6	Enterovirus 70

Utilizando los iniciadores diseñados en el Ejemplo 1, se ensayan muestras conteniendo 100 TCID₅₀ de Coxsackievirus A16 con HSV1, HSV2, VZV, CMV, HHV6 y EBV. El análisis de los fragmentos generados se muestra en la Figura 3. Todos los enterovirus generan fragmentos de amplificación entre 500 y 487 bp y los herpesvirus lo generan de 194 bp.

Ejemplo 3. Diseño de iniciadores para la detección específica de enterovirus y/o herpesvirus en los que el marcaje es el peso molecular del fragmento amplificado

Para la identificación de los fragmentos generados en el Ejemplo 2, se han diseñado los iniciadores para una segunda reacción de amplificación que utilice como molécula diana el fragmento obtenido en la primera reacción de amplificación. De esta forma se aumenta la sensibilidad y la especificidad de la reacción de identificación. A partir de las secuencias relacionadas y comparadas en la Figura 1 se han seleccionado inicialmente

los siguientes iniciadores comunes para todos los enterovirus

POLARIDAD POSITIVA: SEQ ID No: 14

5 POLARIDAD NEGATIVA: SEQ ID No: 15

Después de la segunda reacción de amplificación se generan fragmentos de amplificación de 272 bp.

10 A partir de la comparación de secuencias de las Figuras 1 y 2 y según los procedimientos descritos en la Patente Española P9201174 se ha diseñado una mezcla para una segunda amplificación que utilizará como sustrato los fragmentos de amplificación obtenidos en el Ejemplo 2 de enterovirus y herpesvirus. Dicha mezcla consiste en

15

	POLARIDAD POSITIVA	POLARIDAD NEGATIVA
	SEQ ID No: 14	SEQ ID No: 15
	SEQ ID No: 16	SEQ ID No: 21
	SEQ ID No: 17	SEQ ID No: 22
20	SEQ ID No: 18	SEQ ID No: 23
	SEQ ID No: 19	SEQ ID No: 24
	SEQ ID No: 20	SEQ ID No: 25

25 **Ejemplo 4. Detección e identificación por el peso molecular del fragmento amplificado de herpesvirus humanos en presencia de enterovirus.**

30 Utilizando las mezclas de iniciadores definidas para una segunda reacción de amplificación de herpesvirus diseñadas en la Patente Española P9201174, se reamplificaron, en las condiciones descritas en dicha patente, diluciones 1:1000 de los fragmentos de 194 bp generados en la reacción primera de amplificación Ejemplo 2. Como se puede apreciar en la Figura 4, se puede determinar e identificar el virus herpes que está presente

35 en la muestra sin que ésta amplificación se vea afectada

por la presencia de fragmentos de amplificación procedentes de ARN de enterovirus. Todos los herpesvirus humanos generaron un fragmento de amplificación del peso molecular esperado.

5

Ejemplo 5. Diseño de sonda común y específica para la identificación de enterovirus humanos.

Para la identificación de los fragmentos generados en el Ejemplo 2, se ha diseñado una sonda específica a partir de las secuencias relacionadas y comparadas en la Figura 1. La zona elegida en el interior del fragmento de amplificación presenta una elevada homología siendo prácticamente la misma para todos los enterovirus comparados. La secuencia de nucleótidos es la siguiente:

10
15 POLARIDAD POSITIVA: SEQ ID No: 26

Ejemplo 6. Diseño de los iniciadores para la detección de un control interno de amplificación en cada tubo de reacción.

20 Se ha tomado como base del diseño el método múltiple de amplificación de herpesvirus ya descrito en la Patente Española P9201174. Se basa en la amplificación múltiple de los herpesvirus HSV1, HSV2, VZV, CMV, HHV6 y EBV utilizando una mezcla de iniciadores caracterizados en dicha patente porque sus extremos 3' son zonas conservadas entre los genes de la ADN polimerasa de los herpesvirus humanos.

30 Como control de amplificación interno se ha diseñado el uso de un fragmento clonado del gen de la ADN polimerasa del herpesvirus porcino PRV (virus de la pseudorrabia porcina o enfermedad de Auzjevski). Este fragmento de ADN añadido de forma sistemática en todos los tubos será amplificado por iniciadores específicos que han sido diseñados de igual forma que el resto de los herpesvirus en la patente anteriormente mencionada. En la

35

Figura 2 se presentan las secuencias de nucleótidos de los fragmentos seleccionados de la ADN polimerasa y las mezclas de polaridad positiva y de polaridad negativa de los herpesvirus.

5 Las secuencias de los iniciadores específicos del control interno o del fragmento clonado del virus PRV son las siguientes:

POLARIDAD POSITIVA: SEQ ID No: 27

10 POLARIDAD NEGATIVA: SEQ ID No: 28

Se han diseñado iniciadores específicos capaces de reamplificar el fragmento generado en la primera reacción de amplificación de PRV como control interno de amplificación. Para la segunda reacción de amplificación se han diseñado los siguientes iniciadores:

POLARIDAD POSITIVA: SEQ ID No: 29

20 POLARIDAD NEGATIVA: SEQ ID No: 30

El fragmento específico de PRV tendría un tamaño de 140 bp tras la segunda amplificación por lo que es fácilmente detectable.

25 **Ejemplo 7. Detección de herpesvirus en presencia de los iniciadores específicos del virus PRV utilizado como control interno de primera y segunda amplificación.**

Según el procedimiento descrito en el Ejemplo 4, se ha utilizado una nueva mezcla de iniciadores específicos de los virus herpes que contiene además los iniciadores específicos de PRV, utilizado como control interno de amplificación. En primer lugar se han sometido a una primera reacción de amplificación ADN de cada uno de los virus herpes según los procedimientos descritos en el Ejemplo 1 y utilizando la mezcla de iniciadores compuesta

por:

	POLARIDAD POSITIVA	POLARIDAD NEGATIVA
	SEQ ID No: 27	SEQ ID No: 28
5	SEQ ID No: 4	SEQ ID No: 9
	SEQ ID No: 5	SEQ ID No: 10
	SEQ ID No: 6	SEQ ID No: 11
	SEQ ID No: 7	SEQ ID No: 12
	SEQ ID No: 8	SEQ ID No: 13

10

A continuación tras una segunda reacción de amplificación según el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 se han amplificado los fragmentos de ADN procedentes de la primera reacción de amplificación correspondientes a cada uno de los virus herpes (HSV1, HSV2, VZV, CMV, HHV6 y EBV). Se ha podido detectar ADN específico de cada uno de los virus herpes y de PRV tras la segunda reacción de amplificación utilizando la mezcla de iniciadores específicos compuesta por:

20

	POLARIDAD POSITIVA	POLARIDAD NEGATIVA
	SEQ ID No: 29	SEQ ID No: 30
	SEQ ID No: 16	SEQ ID No: 21
	SEQ ID No: 17	SEQ ID No: 22
25	SEQ ID No: 18	SEQ ID No: 23
	SEQ ID No: 19	SEQ ID No: 24
	SEQ ID No: 20	SEQ ID No: 25

30 Cada virus se identificar en función del peso molecular de los fragmentos amplificados Figura 6.

Ejemplo 8. Detección de enterovirus y herpesvirus en presencia de los iniciadores específicos del virus PRV como control interno de primera y de segunda reacción de amplificación.

35

Como control de amplificación interno se ha utilizado el diseñado en el Ejemplo 6. La mezcla de iniciadores constituida por aquellos específicos de enterovirus y por los de herpesvirus se enriquece por la presencia de los iniciadores del control interno, que consiste en un fragmento clonado del gen de la ADN polimerasa del virus PRV.

Utilizando las mezclas de iniciadores de amplificación general de enterovirus y herpesvirus diseñadas en el Ejemplo 1 y reamplificadas en las condiciones definidas en el Ejemplo 4, se han obtenido fragmentos de amplificación de 500 bp específicos de enterovirus y de 194 bp específicos de herpesvirus cuando se realiza la primera reacción de amplificación. Con respecto a la segunda reacción de amplificación se pueden tipificar todos los herpesvirus y se demuestra la presencia de un fragmento de amplificación de 140 bp de tamaño coincidente con los fragmentos generados en el Ejemplo 6. Los fragmentos de amplificación de primera y segunda reacción e amplificación pueden ser observados en la Figura 5.

Ejemplo 9. Diseño de la mezcla de iniciadores específicos de HSV1 y HSV2

La homología existente entre el virus herpes simplex tipo 1 y el virus herpes simplex tipo 2 es muy elevada. De manera similar a como se ha realizado el diseño de los iniciadores del Ejemplo 6, se han determinado las secuencias de nucleótidos de los iniciadores específicos de HSV1 y HSV2 para una segunda reacción de amplificación en la que la molécula diana es el fragmento de amplificación resultado de una primera reacción de amplificación previamente desarrollada y descrita en la Patente Española P9201174.

A partir de las secuencias alineadas y comparadas de

los herpesvirus humanos de la Figura 2 se ha diseñado unos iniciadores específicos para estos dos virus tan homólogos.

- 5 POLARIDAD POSITIVA: SEQ ID No: 31
POLARIDAD NEGATIVA: SEQ ID No: 32

La amplificación utilizando las mezclas diseñadas debería generar fragmentos de 93 bp para HSV1 y de 138
10 para HSV2.

Ejemplo 10. Detección de secuencias específicas de HSV1 o HSV2 en muestras que contienen o no ARN de enterovirus.

Utilizando las mezclas de iniciadores de primera
15 reacción de amplificación y de tipificación de los Ejemplos 1 y 8 y los procedimientos descritos en los Ejemplos 2 y 4 se ha podido identificar específicamente fragmentos de amplificación de HSV1 o de HSV2. Como en Ejemplos anteriores 4 y 7 la presencia de enterovirus en
20 la mezcla de reacción de la primera amplificación, así como de la segunda reacción de amplificación, no influye para poder caracterizar los fragmentos de amplificación específicos de 93 bp y de 138 bp en el caso de ser HSV1 o HSV 2 respectivamente.

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT:

- 5 (A) NAME: INSTITUTO DE SALUD CARLOS III
(B) STREET: Sinesio Delgado, 6 / Pabellón 3
(C) CITY: Madrid
(D) STATE: Madrid
(E) COUNTRY: Spain
10 (F) POSTAL CODE (ZIP): E-28029
(G) TELEPHONE: + 34 1 3230141
(H) TELEFAX: + 34 1 3231943

- (ii) TITLE OF INVENTION: PROCEDIMIENTOS DE
AMPLIFICACION DE GENOMA Y MEZCLAS DE OLIGONUCLEOTIDOS
15 INICIADORES PARA LA DETECCION Y LA IDENTIFICACION DE
SECUENCIAS GENOMICAS RELACIONADAS

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 32

(iv) COMPUTER READABLE FORM:

- (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
20 (B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version
#1.30 (EPO)

25 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 24 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
30 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA to mRNA

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

- 35 (A) ORGANISM: Enterovirus

28

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:
CGGTACCTTT GTGCGCCTGT TTTA

24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2:

5 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 24 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

10 (ii) MOLECULE TYPE: cDNA to mRNA
(iii) HYPOTHETICAL: YES
(iv) ANTI-SENSE: NO
(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Enterovirus

15 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:
CGGTACCTTT GTACGCCTGT TTTA

24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
20 (A) LENGTH: 25 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA to mRNA
25 (iii) HYPOTHETICAL: YES

(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Enterovirus

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3:
GAAACACGGA CACCCAAAGT AGTCG

25

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 23 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
35 (C) STRANDEDNESS: single

29

- (D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
(iii) HYPOTHETICAL: YES
(iv) ANTI-SENSE: NO
5 (vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Herpes simplex virus
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 4:
CGCATCATCT ACGGGGACAC GGA 23
- 10 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 5:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 23 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
15 (D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
(iii) HYPOTHETICAL: YES
(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Varicella-zoster virus
20 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 5:
AAGGTTATAT ATGGAGATAC GGA 23
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 6:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
25 (A) LENGTH: 23 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
30 (iii) HYPOTHETICAL: YES
(iv) ANTI-SENSE: NO
(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Human cytomegalovirus
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 6:
35 CGGGTCATCT ACGGGGACAC GGA 23

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 23 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

5 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

10 (vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Human herpesvirus 6

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 7:

GAGGTAATTT ATGGTGATAC GGA

23

15 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 23 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

20 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

25 (A) ORGANISM: Epstein-Barr virus

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 8:

CGAGTCATCT ACGGGGACAC GGA

23

30 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 23 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

35 (D) TOPOLOGY: linear

31

- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
- (iii) HYPOTHETICAL: YES
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:

5

- (A) ORGANISM: Herpes simplex virus

- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 9:

ATGACGCCGA TGTACTTTTT CTT

23

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 10:

10

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 23 base pairs

- (B) TYPE: nucleic acid

- (C) STRANDEDNESS: single

- (D) TOPOLOGY: linear

15

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

- (A) ORGANISM: Varicella-zoster virus

20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 10:

ATTACCCCAA TGTACTTTTT CTT

23

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

25

- (A) LENGTH: 23 base pairs

- (B) TYPE: nucleic acid

- (C) STRANDEDNESS: single

- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

30

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

- (A) ORGANISM: Human cytomegalovirus

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 11:

35

ACTTTACCAA TGTATCTTTT CTT

23

32

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 23 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

5 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

10 (vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Human herpesvirus 6

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 12:

TGTCTACCAA TGTATCTTTT TTT

23

15 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 23 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

20 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

25 (A) ORGANISM: Epstein-Barr virus

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 13:

AGCACCCCA CATATCTCTT CTT

23

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 14:

30 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 21 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

35 (ii) MOLECULE TYPE: cDNA to mRNA

33

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Enterovirus

5 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 14:

CAAGCACTTC TGTTTCCCCG G

21

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

10 (A) LENGTH: 23 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA to mRNA

15 (iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Enterovirus

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 15:

20

TAGCTCAATA GGCTCTTCAC ACC

23

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

25 (A) LENGTH: 20 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

30 (iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Herpes simplex virus

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 16:

35 GTGTTGTGCC GCGGTCGCAC

20

34

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 20 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

5 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

10 (vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Varicella-zoster virus

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 17:

TGAGGGGATA GCTAAAATCG

20

15 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 20 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

20 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

25 (A) ORGANISM: Human cytomegalovirus

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 18:

GGGCCAGCC TGGCGCACTA

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 19:

30 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 20 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

35 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

35

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Human herpesvirus 6

5 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 19:

GCCAAACATA TCACAGATCG

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

10 (A) LENGTH: 20 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

15 (iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Epstein-Barr virus

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 20:

20 ACCCGGAGCC TGTTTGTAGC

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 21:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

25 (A) LENGTH: 21 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: YES

30 (iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Herpes simplex virus

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 21:

GGTGAACGTC TTTTCGAACT C

21

35

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 22:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 21 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Varicella-zoster virus

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 22:

TATAAAAGTT TTTTCACACT C

21

15

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 23:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 21 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Human cytomegalovirus

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 23:

GACGAAGACC TTTTCAAAC T C

21

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 24:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 21 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

35

37

- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
(iii) HYPOTHETICAL: YES
(iv) ANTI-SENSE: NO
(vi) ORIGINAL SOURCE:
5 (A) ORGANISM: Human herpesvirus 6
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 24:
ACATAAAATC TTTTCAAAC C 21
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 25:
10 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 21 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
15 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
(iii) HYPOTHETICAL: YES
(iv) ANTI-SENSE: NO
(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Epstein-Barr virus
20 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 25:
GGAGAAGGTC TTCTCGGCCT C 21
- (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 26:
(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
25 (A) LENGTH: 25 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: cDNA to mRNA
30 (iii) HYPOTHETICAL: YES
(iv) ANTI-SENSE: NO
(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Enterovirus
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 26:
35 CCTCCGGCCC CTGAATGCGG CTAAT 25

38

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 27:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 23 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

5 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

10 (vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Pseudorabies virus

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 27:

CGCGTGGTCT ACGGGGACAC GGA

23

15 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 28:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 23 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

20 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

25 (A) ORGANISM: Pseudorabies virus

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 28:

ATGACGCCGA TGTATTTCTT CTT

23

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 29:

30 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 20 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

35 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

39

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Pseudorabies virus

5 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 29:

GGGACACGGA CTCGGTCTTC

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 30:

10 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 21 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

15 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Pseudorabies virus

20 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 30:

CCGGAAGGTC TTCTCGCACT C

21

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 31:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

25 (A) LENGTH: 24 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

30 (iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Herpes simplex virus type 1

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 31:

35 GGGCTCACGG CCGCCGGGCT GACC

24

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 32:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 22 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

5 (C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: YES

(iv) ANTI-SENSE: NO

10 (vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Herpes simplex virus type 2

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 32:

GACACGGACT CCATTTTCGT TT

22

Reivindicaciones

1. Un método para el diagnóstico diferencial de agentes infecciosos relacionados por su capacidad de producir una patología similar, pertenecientes a distintas familias que no están genómicamente relacionadas entre sí, que incluye (a) la detección de dichos agentes infecciosos por amplificación enzimática de un fragmento de sus genomas y (b) la identificación de dichos agentes infecciosos a partir de los productos de la reacción de amplificación, caracterizado porque dicha reacción de amplificación se lleva a cabo en una única mezcla de reacción que comprende, como iniciador de la reacción, una combinación de mezclas de oligonucleótidos, cada una de las cuales ha sido específicamente diseñada para cada una de las familias de agentes infecciosos a detectar de manera que cada mezcla de oligonucleótidos:
- i) se obtiene como suma simple de oligonucleótidos,
 - ii) cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla, incluye, preferentemente en su extremo 3', secuencias homólogas seleccionadas de entre las secuencias genómicamente relacionadas que se quieren amplificar,
 - iii) cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla, puede incluir además, preferentemente en su extremo 5', secuencias no homólogas seleccionadas de entre las secuencias genómicamente relacionadas que se quieren amplificar, y
 - iv) cuyos oligonucleótidos componentes pueden diferenciarse de las secuencias conocidas que se quieren amplificar en al menos un nucleótido.
2. Un método según la reivindicación 1, en el que la mezcla para la reacción de amplificación incluye además un

control interno de amplificación que comprende el genoma de un virus que no debe estar presente en la muestra a estudiar junto con iniciadores de reacción específicos de un fragmento de dicho genoma.

5

3. Un método según la reivindicación 2, en el que dicho genoma deriva de una especie vírica perteneciente a una de las familias de virus a identificar.

10

4. Un método según la reivindicación 3, en el que dicho genoma corresponde a un virus que no es capaz de infectar a la especie animal sobre la que se realiza el diagnóstico.

15

5. Un método según la reivindicación 4, en el que dicho genoma corresponde a un virus que no es capaz de infectar a humanos.

20

6. Un método según la reivindicación 5, en el que dicho genoma corresponde a un herpesvirus que no puede infectar al hombre.

25

7. Un método según la reivindicación 6, en el que dicho genoma corresponde al herpesvirus porcino 1.

30

8. Un método según la reivindicación 1, en el que la identificación del agente infeccioso se realiza por hibridación de las secuencias amplificadas con sondas de oligonucleótidos específicos o mezclas de oligonucleótidos específicos de las especies o géneros a identificar.

35

9. Un método según la reivindicación 1, en el que la identificación del agente infeccioso se realiza por una segunda reacción de amplificación de los productos resultantes de la primera reacción de amplificación en la

que la mezcla de reacción para dicha segunda reacción de amplificación comprende, como iniciador de la reacción, una mezcla de oligonucleótidos diseñada de manera que:

- i) se obtiene como suma simple de oligonucleótidos,
- 5 ii) cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla, incluye, preferentemente en su extremo 3', secuencias específicas de cada una de las secuencias a tipificar en dicha segunda reacción de amplificación,
- 10 iii) los fragmentos específicos amplificados son diferentes entre sí por tamaño o por diferente marcaje físico o químico de cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla, y
- 15 iv) uno o más de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla pueden diferenciarse de las secuencias conocidas que se quieren amplificar en al menos un nucleótido.

10. Un método según la reivindicación 1, en el que
20 dichos agentes infecciosos producen una patología similar en humanos.

11. Un método según la reivindicación 1, en el que
25 dichos agentes infecciosos pertenecen a las familias *Herpesviridae* y *Picornaviridae*.

12. Un método según la reivindicación 11, en el que
dichos agentes infecciosos son herpesvirus y enterovirus humanos.

30

13. Un método según la reivindicación 12, en el que la mezcla para la reacción de amplificación comprende:

- al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo formado por los oligonucleótidos identificados como SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 2 y SEQ ID No: 3; y
- 35

- al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo formado por los oligonucleótidos identificados como SEQ ID No: 4, SEQ ID No: 5, SEQ ID No: 6, SEQ ID No: 7, SEQ ID No: 8, SEQ ID No: 9, SEQ ID No: 10, SEQ ID No: 11, SEQ ID No: 12 y SEQ ID No: 13; o sus homólogos en las hebras complementarias.

14. Un método según la reivindicación 13, en el que la mezcla para la reacción de amplificación incluye, además, un control interno de amplificación que comprende un genoma completo o un fragmento genómico del herpesvirus porcino 1, y unos iniciadores de reacción capaces de amplificar un fragmento del mismo.

15. Un método según la reivindicación 14, en el que dichos iniciadores de reacción capaces de amplificar un fragmento del genoma del herpesvirus porcino 1 se seleccionan del grupo formado por los oligonucleótidos identificados como SEQ ID No: 27, SEQ ID No: 29, SEQ ID No: 28 y SEQ ID No: 30, o sus homólogos en las hebras complementarias.

16. Un método según la reivindicación 12, en el que la identificación de los enterovirus detectados se lleva a cabo por hibridación específica con un oligonucleótido que comprende una secuencia como la identificada como SEQ ID No: 26 o su homólogo en las hebras complementarias.

17. Un método según la reivindicación 12, en el que la identificación de los herpesvirus detectados se lleva a cabo por hibridación específica con una mezcla de oligonucleótidos específicos de cada una de las especies víricas a identificar.

18. Un método según la reivindicación 17, en el que

tras la identificación de los herpesvirus detectados se lleva a cabo una reacción de hibridación específica con un oligonucleótido específico de cada especie de herpesvirus a identificar.

5

19. Un método según la reivindicación 12, en el que la identificación de los virus detectados se lleva a cabo por medio de una segunda reacción de amplificación cuya mezcla de reacción comprende al menos uno de los oligonucleótidos identificados como SEQ ID No: 14, SEQ ID No: 16, SEQ ID No: 17, SEQ ID No: 18, SEQ ID No: 19, SEQ ID No: 20, SEQ ID No: 15, SEQ ID No: 21, SEQ ID No: 22, SEQ ID No: 23, SEQ ID No: 24 y SEQ ID No: 25, o sus homólogos en las hebras complementarias.

15

20. Un método según la reivindicación 19, en el que tras identificar la presencia de virus herpes simplex (tipo 1 ó tipo 2), se lleva a cabo una segunda reacción de amplificación genómica para su identificación específica, cuya mezcla de reacción comprende al menos uno de los oligonucleótidos identificados como SEQ ID No: 31, SEQ ID No: 32, o sus homólogos en las hebras complementarias.

20

21. Una combinación de mezclas de oligonucleótidos, para ser utilizada como iniciador de una reacción de amplificación de genoma para la detección de agentes infecciosos relacionados por su capacidad de producir una patología similar, pertenecientes a distintas familias que no están genómicamente relacionadas entre sí, estando cada una de dichas mezclas específicamente diseñada para cada una de la familias de agentes infecciosos que se quieren detectar y diseñada de manera que cada mezcla de oligonucleótidos:

25

30

- i) se obtiene como suma simple de oligonucleótidos,
- ii) cada uno de los oligonucleótidos componentes de

35

- dicha mezcla, incluye, preferentemente en su extremo 3', secuencias homólogas seleccionadas de entre las secuencias genómicamente relacionadas que se quieren amplificar,
- 5 iii) cada uno de los oligonucleótidos componentes de dicha mezcla, puede incluir además, preferentemente en su extremo 5', secuencias no homólogas seleccionadas de entre las secuencias genómicamente relacionadas que se quieren
- 10 amplificar, y
- iv) cuyos oligonucleótidos componentes pueden diferenciarse de las secuencias conocidas que se quieren amplificar en al menos un nucleótido.
- 15 22. Una combinación según la reivindicación 21, útil como iniciador de una reacción de amplificación de genoma para la detección de agentes infecciosos relacionados por su capacidad de producir una patología similar en humanos.
- 20 23. Una combinación según la reivindicación 21, útil como iniciador de una reacción de amplificación de genoma para la detección de agentes infecciosos pertenecientes a las familias *Herpesviridae* y *Picornaviridae*.
- 25 24. Una combinación según la reivindicación 21, útil como iniciador de una reacción de amplificación de genoma para la detección de agentes infecciosos seleccionados del grupo formado por herpesvirus y enterovirus humanos.

1 1 1 1 1 1

POL1A CGGTA-CCCTTGTACGCCCTGTTTTA
POL1B CGGTA-CCCTTGTACGCCCTGTTTTA
POL1C CGGTA-CCCTTGTACGCCCTGTTTTA
POL1D CGGTA-CCCTTGTACGCCCTGTTTTA
POL2A CGGTA-CCCTTGTACGCCCTGTTTTA
POL2B CGGTA-CCCTTGTACGCCCTGTTTTA
POL2C CGGTA-CCCTTGTACGCCCTGTTTTA
POL3A CGGTA-CCCTTGTACGCCCTGTTTTA
POL3B CGGTA-CCCTTGTACGCCCTGTTTTA
POL3C CGGTA-CCCTTGTACGCCCTGTTTTA
POL3D CGGTA-CCCTTGTACGCCCTGTTTTA
POL3E CGGTA-CCCTTGTACGCCCTGTTTTA
CA21 -GGTA-CCCTTGTACGCCCTGTTTTA
CB1 CGGTA-CCCTTGTACGCCCTGTTTTA
CB3 CGGTA-CCCTTGTACGCCCTGTTTTA
CB4 CGGTA-CCCTTGTACGCCCTGTTTTA
CB4E CGGTA-CCCTTGTACGCCCTGTTTTA
CB5 CGGTA-CCCTTGTACGCCCTGTTTTA
CA16 CGGTA-CCCTTGTACGCCCTGTTTTA
CA9 CGGTA-CCCTTGTACGCCCTGTTTTA
CA24 CGGTA-CCCTTGTACGCCCTGTTTTA
E12 CGGTA-CCCTTGTACGCCCTGTTTTA
E12W GGTGTGAAGAGCTTqACTGAGCTA

SEQ ID No: 1

POL1A CCTCGGCCCTGAATCGGGCTAAT
POL1B CCTCGGCCCTGAATCGGGCTAAT
POL1C CCTCGGCCCTGAATCGGGCTAAT
POL1D CCTCGGCCCTGAATCGGGCTAAT
POL2A CCTCGGCCCTGAATCGGGCTAAT
POL2B CCTCGGCCCTGAATCGGGCTAAT
POL2C CCTCGGCCCTGAATCGGGCTAAT
POL3A CCTCGGCCCTGAATCGGGCTAAT
POL3B CCTCGGCCCTGAATCGGGCTAAT
POL3C CCTCGGCCCTGAATCGGGCTAAT
POL3D CCTCGGCCCTGAATCGGGCTAAT
POL3E CCTCGGCCCTGAATCGGGCTAAT
CA21 CCTCGGCCCTGAATCGGGCTAAT
CB1 CCTCGGCCCTGAATCGGGCTAAT
CB3 CCTCGGCCCTGAATCGGGCTAAT
CB4 CCTCGGCCCTGAATCGGGCTAAT
CB4E CCTCGGCCCTGAATCGGGCTAAT
CB5 CCTCGGCCCTGAATCGGGCTAAT
CA16 CCTCGGCCCTGAATCGGGCTAAT
CA9 CCTCGGCCCTGAATCGGGCTAAT
CA24 CCTCGGCCCTGAATCGGGCTAAT
E12 CCTCGGCCCTGAATCGGGCTAAT
E12W CCTCGGCCCTGAATCGGGCTAAT

SEQ ID No: 2

POL1A CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
POL1B CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
POL1C CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
POL1D CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
POL2A CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
POL2B CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
POL2C CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
POL3A CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
POL3B CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
POL3C CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
POL3D CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
POL3E CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
CA21 CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
CB1 CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
CB3 CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
CB4 CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
CB4E CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
CB5 CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
CA16 CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
CA9 CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
CA24 CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
E12 CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
E12W CAAGCACTTCTGTTCCCGGG

SEQ ID No: 3

POL1A CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
POL1B CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
POL1C CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
POL1D CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
POL2A CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
POL2B CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
POL2C CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
POL3A CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
POL3B CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
POL3C CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
POL3D CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
POL3E CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
CA21 CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
CB1 CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
CB3 CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
CB4 CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
CB4E CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
CB5 CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
CA16 CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
CA9 CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
CA24 CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
E12 CAAGCACTTCTGTTCCCGGG
E12W CAAGCACTTCTGTTCCCGGG

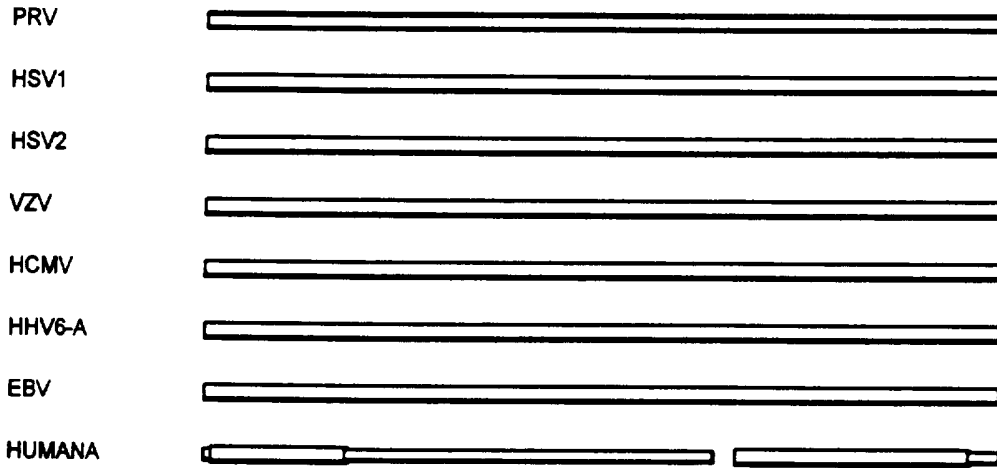
SEQ ID No: 14

POL1A GGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTA
POL1B GGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTA
POL1C GGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTA
POL1D GGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTA
POL2A GGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTA
POL2B GGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTA
POL2C GGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTA
POL3A GGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTA
POL3B GGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTA
POL3C GGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTA
POL3D GGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTA
POL3E GGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTA
CA21 GGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTA
CB1 GGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTA
CB3 GGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTA
CB4 GGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTA
CB4E GGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTA
CB5 GGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTA
CA16 GGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTA
CA9 GGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTA
CA24 GGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTA
E12 GGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTA
E12W GGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTA

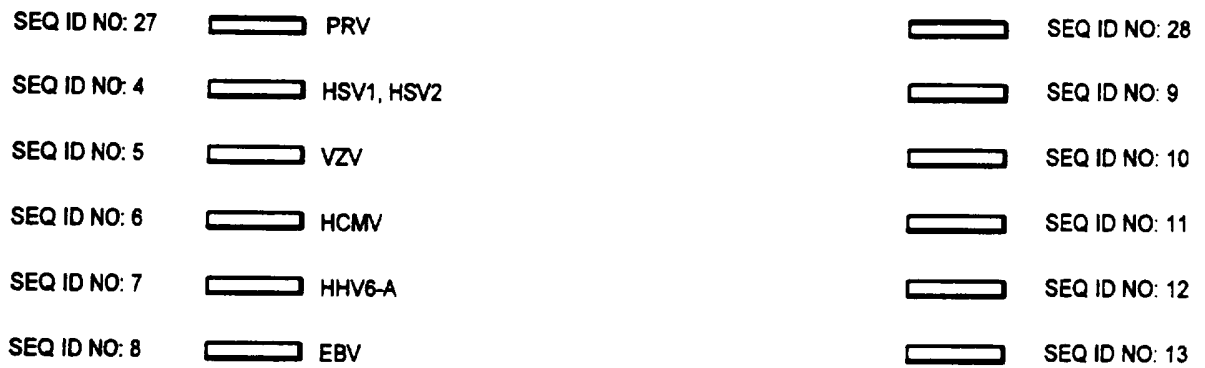
SEQ ID No: 15

Figura 2

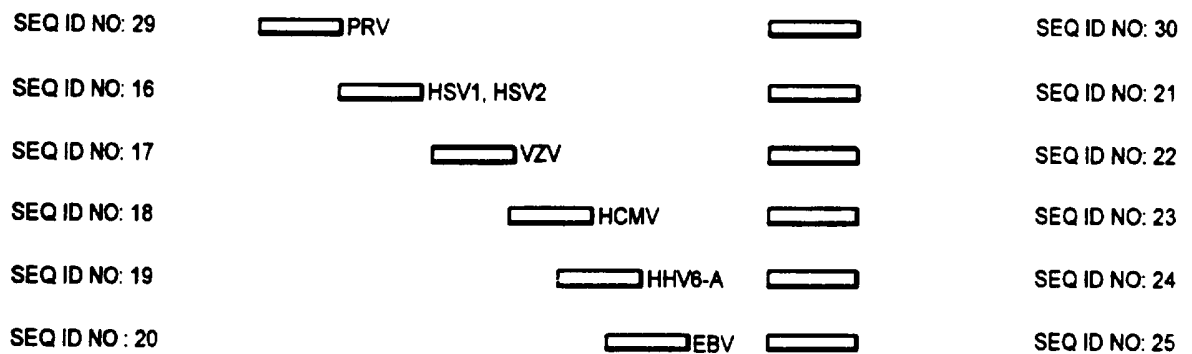
A



B

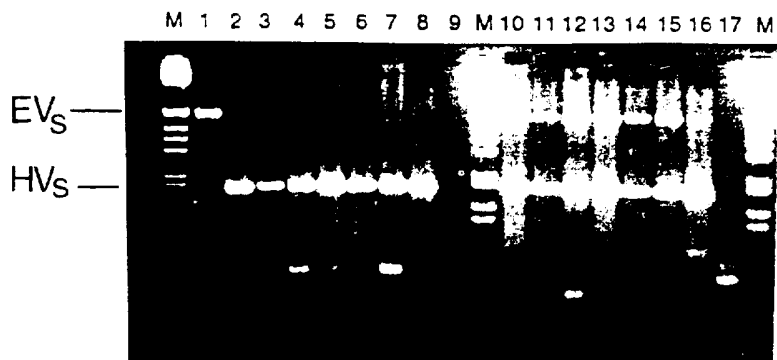


C



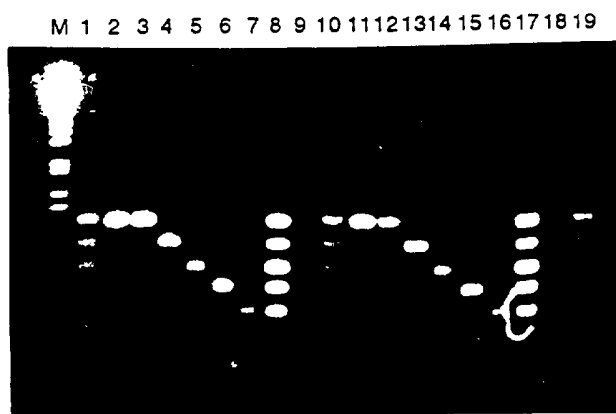
3/7

Figura 3



4/7

Figura 4



5/7

Figura 5

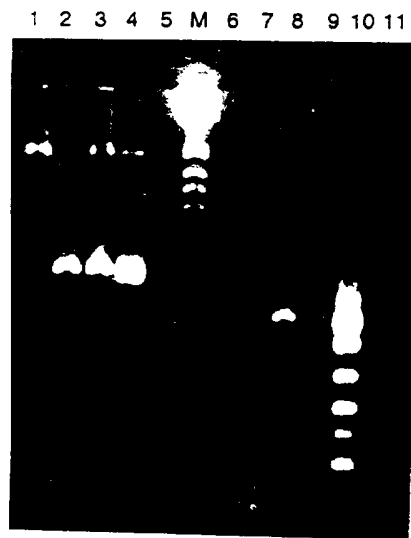
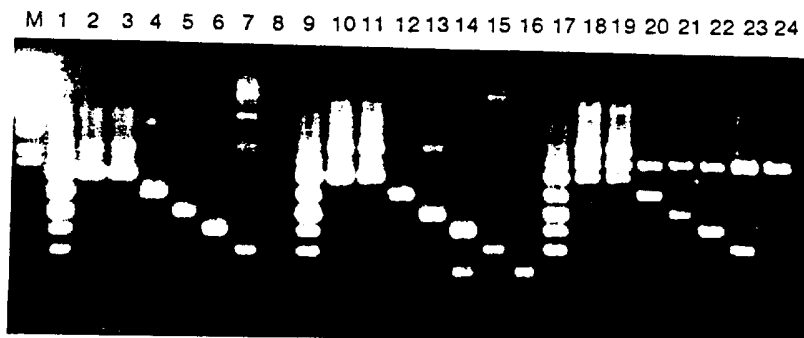


Figura 6



7/7

Figura 7

