



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 344 594**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**C12P 19/34** (2006.01)  
**C07H 21/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02709256 .8**  
96 Fecha de presentación : **31.01.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1364063**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.11.2003**

54 Título: **Detección del virus del herpes simplex.**

30 Prioridad: **31.01.2001 US 265376 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.09.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.09.2010**

73 Titular/es: **MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL  
EDUCATION AND RESEARCH  
Mayo Clinic, 200 First Street S.W.  
Rochester, Minnesota 55905, US**

72 Inventor/es: **Smith, Thomas, F;  
Espy, Mark, J.;  
Wold, Arlo y  
Uhl, James, R.**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

## DESCRIPCIÓN

Detección del virus del herpes simplex.

5 **Campo técnico**

Esta invención se relaciona con diagnósticos víricos, y más particularmente con detección del virus del herpes simplex (HSV).

10 **Antecedentes**

El virus del herpes simplex (HSV) es el virus más comúnmente detectado en laboratorios de diagnósticos, que cuenta con más del 40% de los virus que se detectaran en cultivos celulares durante un periodo de 25-años. El HSV origina una variedad de síndromes clínicos, y los sitios anatómicos infectados incluyen la piel, labios, cavidades orales, ojos, tracto genital, y sistema nervioso central. La infección por HSV diseminada o generalizada puede ocurrir en pacientes inmunológicamente comprometidos por neoplasia, trasplante de órganos, enfermedad de inmunodeficiencia heredada, o SIDA, o a través de infección neonatal adquirida mediante transmisión del virus a través del canal de nacimiento infectado. La mayor parte de las enfermedades diseminadas es fatal.

20 **Resumen**

La invención proporciona métodos para identificar el HSV en una muestra biológica, y adicionalmente, para distinguir entre HSV-1 y HSV-2. La invención proporciona un cebador y sondas para detectar HSV y para distinguir entre HSV-1 y HSV-2, como son los equipos que contienen tales cebadores y sondas. Se pueden utilizar los métodos de la invención para identificar rápidamente el ADN del HSV de especímenes para diagnóstico de diferencial de infección del HSV. Utilizando cebadores y sondas específicas, el método incluye amplificar y monitorear el desarrollo de productos de amplificación específico que utilizan tecnología de emisión de resonancia fluorescente (FRET).

En un aspecto, la invención representa un método para determinar la presencia o ausencia del virus herpes simplex (HSV) en una muestra biológica de un individuo. El método para detectar el HSV incluye desarrollar por lo menos una etapa cíclica, que incluye una etapa de amplificación y una etapa de hibridación. La etapa de amplificación incluye poner en contacto la muestra con un par de cebadores de polimerasa de ADN del HSV para producir un producto de amplificación de polimerasa de ADN del HSV si está presente en una molécula de ácido nucleico de polimerasa de ADN del HSV en la muestra. La etapa de hibridación incluye poner en contacto la muestra con un par de sondas de polimerasa de ADN del HSV. De manera general, los miembros del par de sondas de polimerasa de ADN del HSV hibridan dentro no más de cinco nucleótidos de cada uno. Una sonda de polimerasa de ADN del HSV del par de sondas de polimerasa de ADN del HSV se etiquetan típicamente con un grupo funcional fluorescente donante y una segunda sonda de polimerasa de ADN del HSV del par de sondas de polimerasa de ADN del HSV se etiquetan con un grupo funcional fluorescente aceptor correspondiente. Adicionalmente El método incluye detectar la presencia o ausencia transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) entre el grupo funcional fluorescente donante de la sonda de polimerasa de ADN del HSV y el grupo funcional fluorescente aceptor correspondiente de la segunda sonda de polimerasa de ADN del HSV. La presencia de FRET es usualmente indicadora de la presencia de HSV en la muestra biológica, aunque la ausencia de FRET es usualmente indicadora de la ausencia de HSV en la muestra biológica.

Alternativamente, o adicionalmente, la etapa de amplificación puede incluir poner en contacto la muestra con un par de cebadores TK del HSV para producir un producto de amplificación TK del HSV si está presente una molécula de ácidos nucleicos TK del HSV en la muestra. La etapa de hibridación incluye poner en contacto la muestra con un par de sondas TK del HSV. Generalmente, los miembros del par de sondas TK del HSV hibridan dentro no más de cinco nucleótidos de cada uno. Una sonda TK del HSV del par de sonda TK del HSV se etiquetan típicamente con un grupo funcional fluorescente donante y una segunda sonda TK del HSV del par de sonda TK del HSV se etiquetan típicamente con un grupo funcional fluorescente aceptor correspondiente. El método incluye adicionalmente detectar la presencia o ausencia de FRET entre el grupo funcional fluorescente donante de la primera sonda TK del HSV y el grupo funcional fluorescente aceptor de la segunda TK del HSV. La presencia de FRET es usualmente indicadora de la presencia del HSV en la muestra, aunque la ausencia de FRET es usualmente indicadora de la ausencia del HSV en la muestra.

En otro aspecto, la invención representa un método para distinguir entre HSV-1 y HSV-2 en una muestra biológica de un individuo. El método para distinguir entre HSV-1 y HSV-2 incluye desarrollar por lo menos una etapa ciclización de amplificación e hibridación. La etapa de amplificación incluye poner en contacto la muestra con un par de cebadores de polimerasa de ADN del HSV para producir un producto de amplificación de polimerasa de ADN de HSV-1 si está presente una molécula de ácido nucleico de polimerasa de ADN del HSV-1 en la muestra y/o un producto de amplificación de polimerasa de ADN del HSV-2 si está presente una molécula de ácido nucleico de polimerasa de ADN del HSV-2 en la muestra. La etapa de hibridación incluye poner en contacto la muestra con un par de sondas de polimerasa de ADN del HSV. Los miembros del par de cebadores de polimerasa de ADN del HSV pueden hibridar secuencias dentro de una molécula de ácido nucleico que codifican la polimerasa de ADN del HSV que son idénticas entre el ácido nucleico de polimerasa de ADN del HSV-1 y entre el ácido nucleico de polimerasa de ADN del HSV-2, aunque las sondas de polimerasa de ADN del HSV hibriden a una secuencia que difiere entre el ácido nucleico de polimerasa de ADN del HSV-1 y entre el ácido nucleico de polimerasa de ADN del HSV-2 mediante por lo menos

un nucleótido. De manera general, una sonda de polimerasa de ADN del HSV del par de sondas de polimerasa de ADN del HSV que se etiquetan con un grupo funcional fluorescente donante, y una segunda sonda de polimerasa de ADN del HSV del par de sondas de polimerasa de ADN del HSV que se etiquetan con un grupo funcional fluorescente aceptor correspondiente. El método incluye adicionalmente detectar la presencia o ausencia de FRET entre el grupo funcional fluorescente donante de la sonda de polimerasa de ADN del HSV y el grupo funcional fluorescente aceptor correspondiente de la segunda sonda de polimerasa de ADN del HSV. La presencia de FRET indica usualmente la presencia de HSV en la muestra biológica, y la ausencia de FRET indica usualmente la ausencia de HSV en la muestra biológica. La temperatura de fusión se puede determinar luego entre las sondas de polimerasa de ADN del HSV y los respectivos productos de amplificación para distinguir entre HSV-1 y HSV-2.

Un par de cebadores de polimerasa de ADN del HSV incluyen general un cebador de polimerasa de ADN del HSV y un segundo cebador de polimerasa de ADN del HSV. El cebador de polimerasa de ADN del HSV puede incluir la secuencia 5'-GCT CGA GTG CGA AAA AAC GTT C-3' (SEQ ID NO:1), y el segundo cebador de polimerasa de ADN del HSV puede incluir la secuencia 5'-CGG GGC GCT CGG CTA AC-3' (SEQ ID NO:2). La sonda de polimerasa de ADN del HSV puede incluir la secuencia 5'-GCG CAC CAG ATC CAC GCC CTT GAT GAG C- 3' (SEQ ID NO:3), y el segundo sonda de polimerasa de ADN del HSV puede incluir la secuencia 5'- CTT GCC CCC GCA GAT GAC GCC- 3' (SEQ ID NO:4). También la descripción proporciona Una sonda de polimerasa de ADN del HSV que puede incluir la secuencia 5'-GTA CAT CGG CGT CAT CTG CGG GGG CAA G- 3' (SEQ ID NO:5), y una segunda sonda de polimerasa de ADN del HSV puede incluir la secuencia 5'- T GCT CAT CAA GGG CGT GGA TCT GGT GC- 3' (SEQ ID NO:6).

Un par de Cebadores TK del HSV incluye generalmente un cebador TK del HSV y un segundo cebador TK del HSV. El cebador TK del HSV puede incluir la secuencia 5'-CAC GCT RCT GCG GGT TTA TAT AGA-3' (SEQ ID NO:7), en donde R es A o G, y el segundo cebador TK del HSV puede incluir la secuencia 5'-TTG TTA TCT GGG CGC TMG TCA TT-3' (SEQ ID NO:8), en donde M es A o C. la cebador sonda TK del HSV puede incluir la secuencia 5'-CGC GCG ACG ATA TCG TCT ACG TAC- 3' (SEQ ID NO:9), y la segunda sonda de cebador TK del HSV puede incluir la secuencia 5'-CGA GCC GAT GAC TTA CTG GCA GGT G- 3' (SEQ ID NO:10).

Los miembros de un par de sondas de polimerasa de ADN del HSV pueden hibridar dentro no más de dos nucleótidos de cada uno, o pueden hibridar dentro no más de un nucleótido de cada uno. Un grupo funcional fluorescente donante representativo es fluoresceína, y que corresponden a grupos funcionales fluorescentes aceptores que incluyen LC-Red 640, LC-Red 705, Cy5, y Cy5.5. Se conocen en la técnica grupos funcionales fluorescentes aceptores y donantes correspondientes adicionales.

En un aspecto, la etapa de detección incluye excitar la muestra biológica en una longitud de onda absorbida por el grupo funcional fluorescente donante y visualizar y/o medir la longitud de onda emitida por el grupo funcional fluorescente aceptor correspondiente. En otro aspecto, la etapa de detección incluye cuantificar el FRET. En aún otro aspecto, la etapa de detección se puede desarrollar después de cada etapa de ciclo (por ejemplo, en tiempo real).

Generalmente, la presencia del FRET dentro de 50 ciclos (por ejemplo, 10, 20, 30, 37, 40 o 45 ciclos) indica la presencia de una infección por HSV en el individuo. Típicamente, la presencia de FRET dentro de 37 ciclos indica la presencia de una infección por HSV en el individuo, aunque la ausencia de FRET dentro de 37 ciclos indica la ausencia de una infección por HSV en el individuo.

Las muestras biológicas representativas que se pueden utilizar en los métodos de la invención incluyen un hisopo ocular, un espécimen genital, un espécimen dérmico, una prueba de Papanicolaou, fluido amniótico y fluido cerebroespinal. Los métodos descritos anteriormente pueden incluir adicionalmente prevenir la amplificación de un ácido nucleico contaminante. Prevenir la amplificación puede incluir desarrollar la etapa de amplificación en la presencia de uracilo y tratar las muestras biológicas glicosilasa de ADN uracilo antes de amplificación. Adicionalmente, la etapa de ciclo se puede desarrollar sobre una muestra de control. Una muestra de control puede incluir la misma porción de polimerasa de ADN del HSV o La molécula de ácido nucleico TIE HSV. Alternativamente, una muestra de control puede incluir una molécula de ácido nucleico diferente de polimerasa de ADN del HSV o Molécula de ácido nucleico TK del HSV. Las etapas de ciclo se pueden desarrollar sobre tal una muestra de control utilizando un par de cebadores de control y un par de sondas de control. Los cebadores de control y las sondas son diferentes de la polimerasa de ADN del HSV o cebadores o sondas TK del HSV. Cada una de las sondas de control hibrida al producto de amplificación de control.

En otro aspecto de la invención, se proporcionan artículos de fabricación, o equipos. Los equipos de la invención pueden incluir un par de cebadores de polimerasa de ADN del HSV, un par de sondas de polimerasa de ADN del HSV, y un grupo funcional fluorescente aceptor correspondiente. Por ejemplo, un cebador de polimerasa de ADN del HSV suministrado en un equipo de la invención puede incluir la secuencia 5'-GCT CGA GTG CGA AAA AAC GTT C-3' (SEQ ID NO:1), y un segundo cebador de polimerasa de ADN del HSV puede incluir la secuencia 5'-CGG GGC GCT CGG CTA AC-3' (SEQ ID NO:2). Una primera sonda de polimerasa de ADN del HSV proporcionada en un equipo de la invención incluye la secuencia 5'-GCG CAC CAG ATC CAC GCC CTT GAT GAG C- 3' (SEQ ID NO:3), y el segunda sonda de polimerasa de ADN del HSV incluye la secuencia 5'- CTT GCC CCC GCA GAT GAC GCC- 3' (SEQ ID NO:4). También la descripción proporciona una primera sonda de polimerasa de ADN del HSV suministrada en un equipo de la invención puede incluir la secuencia 5'-GTA CAT CGG CGT CAT CTG CGG GGG CAA G- 3' (SEQ ID NO:5), y el segunda sonda de polimerasa de ADN del HSV puede incluir la secuencia 5'- T GCT CAT CAA GGG CGT GGA TCT GGT GC- 3' (SEQ ID NO:6).

Artículos de fabricación o equipos de la invención pueden incluir adicionalmente un par de cebadores TK del HSV, un par de sondas TK del HSV, y un donante y grupo funcional fluorescente aceptor correspondiente. Por ejemplo, Un cebador TK del HSV suministrado en un equipo de la invención puede incluir la secuencia 5'-CAC GCT RCT GCG GGT TTA TAT AGA-3' (SEQ ID NO:7), en donde R es A o G, y una segundo cebador TK del HSV puede incluir la secuencia 5'-TTG TTA TCT GGG CGC TMG TCA TT-3' (SEQ ID NO:8), en donde M es A o C. Una primera sonda TK del HSV suministrado en un equipo de la invención puede incluir la secuencia 5'-CGC GCG ACG ATA TCG TCT ACG TAC- 3' (SEQ ID NO:9), y una segunda sonda TK del HSV puede incluir la secuencia 5'-CGA GCC GAT GAC TTA CTG GCA GGT G- 3' (SEQ ID NO:10). Los Artículos de fabricación puede incluir grupos funcionales fluorofóricos para etiquetar las sondas o las sondas pueden ya estar etiquetadas con grupos funcionales fluorescentes aceptores correspondientes y donantes. El artículo de fabricación también puede incluir un inserto de paquete que tienen instrucciones en este para utilizar los cebadores, sondas, y grupos funcionales fluorofóricos para detectar la presencia o ausencia de HSV en una muestra biológica y puede incluir adicionalmente instrucciones allí para utilizar las sondas para distinguir entre HSV-1 y HSV-2.

En aún otro aspecto de la invención, se proporciona aquí un método para detectar la presencia o ausencia de HSV en una muestra biológica de un individuo. Tal un método incluye desarrollar por lo menos una etapa de ciclo. Una etapa de ciclo puede incluir una etapa de amplificación y una etapa de hibridación. Generalmente, una etapa de amplificación incluye poner en contacto la muestra con un par de cebadores de polimerasa de ADN del HSV para producir un producto de amplificación de polimerasa de ADN del HSV si una polimerasa de ADN del HSV que codifica la molécula de ácido nucleico está presente en la muestra. Generalmente, una etapa de hibridación incluye poner en contacto la muestra con una sonda de polimerasa de ADN del HSV. Tal una sonda de polimerasa de ADN del HSV se etiqueta usualmente con un grupo funcional fluorescente donante y un grupo funcional fluorescente aceptor correspondiente. El método incluye adicionalmente detectar la presencia o ausencia de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) entre el grupo funcional fluorescente donante y el grupo funcional fluorescente aceptor correspondiente de la sonda de polimerasa de ADN del HSV. La presencia o ausencia de FRET es indicadora de la presencia o ausencia de HSV en dicha muestra. Adicionalmente a los cebadores de polimerasa de ADN del HSV y las sondas descritos aquí, este método también se puede desarrollar utilizando sondas y cebadores TK del HSV.

En un aspecto, la amplificación puede emplear una enzima de polimerasa que tiene actividad exonucleasa 5' a 3'. Así, los grupos funcionales fluorescentes aceptores y donantes están dentro de no más de 5 nucleótidos de cada uno a lo largo de la longitud de la sonda. En otro aspecto, la sonda de polimerasa de ADN del HSV incluye una secuencia de ácido nucleico que permite la formación de estructura secundaria. Tal formación de estructura secundaria generalmente resulta en una proximidad espacial entre los grupos funcionales fluorescentes aceptores y donantes. De acuerdo con este método, el grupo funcional fluorescente aceptor sobre una sonda puede ser un extintor.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para detectar la presencia o ausencia del HSV en una muestra biológica de un individuo. Tal un método incluye desarrollar por lo menos etapa de ciclo. Una etapa de ciclo puede incluir una etapa de amplificación y una etapa de unión de tinte. Una etapa de amplificación incluye generalmente poner en contacto la muestra con un par de cebadores de polimerasa de ADN del HSV para producir un producto de amplificación de polimerasa de ADN del HSV si está presente una polimerasa de ADN del HSV que codifica la molécula de ácido nucleico en la muestra. Una etapa de unión de tinte incluye generalmente poner en contacto el producto de amplificación de polimerasa de ADN del HSV con un tinte de unión de ácido nucleico. El método incluye adicionalmente detectar la presencia o ausencia de la unión del tinte de unión del ácido nucleico al producto de amplificación. De acuerdo con este método la invención, la presencia de la unión es típicamente indicadora de la presencia de HSV en la muestra, y la ausencia de la unión es típicamente indicadora de la ausencia de HSV en la muestra. Tal un método pueden incluir adicionalmente las etapas de determinar la temperatura de fusión entre el producto de amplificación de polimerasa de ADN del HSV y el tinte de unión de ácido nucleico. Generalmente, la temperatura de fusión confirma la presencia o ausencia del HSV. Los tintes de unión de ácido nucleico representativos incluye SYBRGreenI®, SYBRGold®, y bromuro de etidio.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por el experto en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos aquí en la práctica o prueba de la presente invención, se describen adelante materiales y métodos adecuados. Adicionalmente, los materiales, métodos, y ejemplos son solo de ilustración y no están destinados a ser limitantes.

Los detalles de una o más de las realizaciones de la invención se establecen en los dibujos acompañantes y la descripción adelante. Otras características, objetos, y ventajas de la invención serán evidentes a partir de los dibujos y de la descripción detallada, y de las reivindicaciones.

## Descripción detallada

La presente invención proporciona métodos para detectar HSV en una muestra biológica, y adicionalmente para distinguir entre Infecciones por HSV-1 y HSV-2. Se proporcionan cebadores y sondas para determinar HSV-1 y HSV-2, como son los artículos de fabricación que contienen tal los cebadores y sondas. La detección del HSV de fuentes genitales, dérmicas, y oculares se compara aquí utilizando métodos PCR LightCycler™ (Roche Molecular Biochemicals; Indianapolis, IN), métodos Shell Vial y de cultivo celular. La sensibilidad incrementada de PCR LightCycler™ comparados con otros métodos y las características de los instrumentos para contenido de muestra y detección en

tiempo real del producto amplificado indica la factibilidad para la implementación de esta tecnología para rutina de diagnóstico de infección por HSV en el laboratorio clínico.

### *Virus herpes simplex (HSV)*

El HSV origina, o está asociado con, una amplia variedad de enfermedades en humanos tal como lesiones genitales, estomatitis, encefalitis, dermatitis herpética, meningitis, faringitis, queratoconjuntivitis, neumonía, herpes neonatal, queratitis, coriorretinitis, hepatitis herpética, eczema herpeticum y eritema multiforme. Los virus herpes simplex tipos 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2) infectan un gran número de individuos cada año. La infección por HSV-1 produce típicamente vesículas en la piel o úlceras en la mucosa generalmente limitada a la orofaringe, aunque el HSV-2 produce típicamente generalmente en la región genital. El HSV-2 es una de las enfermedades más comúnmente transmitidas sexualmente en la sociedad. Existen casos en los que es imperativo el diagnóstico rápido, sensible, y específico o de la enfermedad de HSV. La infección por HSV más seria es la encefalitis. La encefalitis es frecuentemente una infección diseminada en recién nacidos que se puede adquirir durante o después del nacimiento; y una infección en adulto afecta el lóbulo temporal del cerebro. Actualmente, el diagnóstico definitivo es mediante biopsia de cerebro y cultivo para aislar el HSV. El diagnóstico serológico, particularmente del HSV en el fluido cerebroespinal (CSF), no es suficientemente sensible o específico, y toma mucho tiempo de uso en decisiones que involucran elecciones para intervención terapéutica temprana de la encefalitis. La terapia temprana de pacientes con encefalitis, antes de necrosis hemorrágica irreversible del cerebro, ha terminado en resultados mejorados. Adicionalmente, debido a la alta morbilidad y mortalidad de infantes que tienen infección de herpes neonatal, y debido a que muchos casos de infección HSV neonatal se pueden evitar por corte por cesárea, el diagnóstico de la infección materna antes del parto es muy importante. En razón a que los cultivos de la madre toman días o semanas antes del parto no predicen bien si la madre puede ser sintomática al momento del parto, un ensayo rápido, sensible, y específico para detectar el HSV en fluidos corporales o secreciones es deseable como un medio para monitorear la infección, y posteriormente, determinar la necesidad de la corte por cesárea.

Adicionalmente, existen muchos casos en los que saber si la infección se origina por HSV-1 o HSV-2. Debido a que el HSV-1 y HSV-2 comparten antígenos, es difícil la diferenciación serológica. Distinguir entre la infección originada por el HSV-1 y HSV-2 puede ser importante debido a la sensibilidad a la terapia antivírica que puede variar con el serotipo. Identificar el serotipo también puede proporcionar información para pronóstico. Por ejemplo, las infecciones genitales originadas por el HSV-1 probablemente ocurren menos que aquellas infecciones originadas por el HSV-2.

### *Oligonucleótidos y ácido nucleico del HSV*

Todos los Virus herpes simplex tienen un genoma de ADN bicatenario lineal y todos replican en el núcleo de células infectadas en donde la expresión génica viral durante la replicación ocurre como una cascada ordenada. Los genes expresados durante la replicación vírica se organizan en el genoma en una forma muy específica, existen pocos genes, translapantes, muy pocos genes de corte y empalme, y elementos reguladores (por ejemplo, promotores) están inmediatamente en la dirección cinco prima de los marcos de lectura abiertos. Todos los virus herpes conocidos tienen tres clases de genes principales,  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ , que tienen el mismo patrón temporal básico de expresión durante el estilo de vida vírico.

Los genes alfa, también denominados genes tempranos inmediatos, se expresan muy temprano después de la infección y la expresión de cada gen alfa no requiere ningún otro gen vírico o producto génico. Los productos de los genes alfa están involucrados predominantemente en la regulación de la expresión génica vírica. Los genes beta (tardíos) se expresan solo después que los genes alfa debido a que su expresión depende de la presencia de uno o más productos génicos alfa que actúan como activadores transcripcionales para regular en forma ascendente la expresión de los genes beta. Los productos de los genes beta son principalmente enzimas involucradas en el metabolismo y la síntesis de ácido nucleico vírico. Los datos de análisis de secuencia han mostrado que los genes beta representan un número limitado de genes en los genomas de todos los virus herpes simplex que se han estudiado y que los genes beta son altamente conservados dentro de la familia herpesvirus. Los genes gama (tardío) se expresan principalmente ( $\gamma 1$ ) o exclusivamente ( $\gamma 2$ ) luego de la síntesis de ADN vírico los productos génicos gama son componentes típicamente estructurales de la visión.

Los genomas completos de HSV-1 y HSV-2 humano se han secuenciado (véase, por ejemplo, Nos de acceso GenBank NC 001806 y NC 001798, respectivamente). Se han identificado muchos de los genes HSV esenciales e importantes, y se puede utilizar en métodos de reacción de cadena de polimerasa (PCR) tal como aquellos descritos por la presente invención para detectar HSV. Por ejemplo, en HSV-1 existen catorce genes que han clasificado como genes beta: UL2, UL5, UL8, UL9, UL12, UL23, UL29, UL30, UL39, UL40, UL42, UL50, UL52, y UL53 (Roizman *et al.*, Herpes Simplex Virus and Their Replication, Raven Press, Ltd. NY, pp 1795-1841, 1990). Estos genes codifican respectivamente, una glicosidasa de ADN uracilo, una helicasa de ADN, un componente del complejo helicas/primasa de ADN, un origen de proteínas de unión de replicación de ADN, un ADN exonucleasa, una cinasa nucleosida, una proteína de unión de ADN monocatenaria, una polimerasa de ADN, una sub unidad grande de reductasa de ribonucleótido, una sub unidad pequeña de reductasa de ribonucleótido, una proteína de unión de ADN bicatenaria que actúa como un factor de procesamiento de polimerasa, un dUTPasa, una primasa, y una proteína cinasa. Todos menos una de estas enzimas, la proteína cinasa, se ha mostrado que está involucrada en el metabolismo del ADN o que está directamente involucrada en la síntesis del DNA vírico.

Basados en paradigmas de alineación de secuencia de proteína predicha y de ADN estándar se ha determinado que el HSV-2 tiene homólogos para cada uno de los catorces genes beta HSV-1 (Davison *et al.*, J. Gen. Virol. 67:1759-1816 1986). Por ejemplo, el gen UL39 del HSV-1 codifica la subunidad grande de ribonucleótido reductasa (RR), una enzima de dos subunidades involucradas en la generación de desoxiribonucleósida trifosfatos. La subunidad grande de ribonucleótido reductasa del HSV-1, también conocida como RR1 o ICP6, tiene 38% de homología en la porción de terminación N y 93% de homología en la porción de termina C de la proteína HSV-2 correspondiente, ICP10, que se codifica por el gen UL39 del HSV-2. (Nikas *et al.* PROTEINS: Structure, Function, y Genetics 1:376-384, 1986).

Métodos de la descripción se puede utilizar para detectar HSV y para diferenciar entre HSV-1 y HSV-2 al amplificar la molécula de ácido nucleico que codifican, por ejemplo, polimerasa de ADN del HSV y/o Timidina cinasa HVS (TK). Las moléculas de ácido nucleico HSV diferentes de aquellas ejemplificadas aquí (por ejemplo, diferentes de aquellas que codifican la polimerasa de ADN del HSV o TK) también que se pueden utilizar para detectar HSV en una muestra y son conocidas por aquellos expertos en la técnica. Las secuencias de ácido nucleico que codifican la polimerasa de ADN de HSV-1 y HSV-2 están disponibles (véase, por ejemplo, Nos. de Acceso GenBank. X04771 y M16321, respectivamente), como son las secuencias de ácido nucleico que codifica el TK del HSV-1 y HSV-2 (véase, por ejemplo, Nos. de Acceso GenBank. AF 303108 y X01712, respectivamente). La molécula de ácido nucleicos que codifican la polimerasa ADN de HSV-1 y ADN del HSV-2 presentan aproximadamente 73% de identidad de secuencia, aunque la molécula de ácido nucleico se codifica en TK del HSV-1 y HSV-2 presentan aproximadamente 77% de identidad de secuencia. Específicamente, los cebadores y sondas para amplificar y detectar moléculas de ácido nucleico de polimerasa de ADN del HSV se proporcionan por la invención, como son los cebadores y sondas para amplificar y detectar la molécula de ácido nucleico TK del HSV.

Los cebadores que amplifica las moléculas de ácido nucleico HSV, por ejemplo, polimerasa de ADN del HSV o TK, se pueden diseñar utilizando, por ejemplo, un programa de computador tal como OLIGO (Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, CO). Características importantes cuando se diseñan oligonucleótidos para ser utilizados como cebadores de amplificación incluyen, pero no se limitan a, un producto de amplificación de tamaño apropiado para facilitar la detección (por ejemplo, mediante electroforesis), temperaturas de fusión similar para los miembros de un par de cebadores, y la longitud de cada cebador (es decir, los cebadores necesarios son suficientemente largos para hibridar con la especificidad de secuencia y para iniciar la síntesis pero no tan largos que se reduzca la fidelidad durante la síntesis de oligonucleótido). Para diseñar cebadores que amplifican la polimerasa de ADN que codifica las moléculas de ácido nucleico o TK de ambos HSV-1 y HSV-2, se seleccionan objetivos de cebador dentro de la polimerasa de ADN del HSV que codifica la molécula de ácido nucleico o TK del HSV que son idénticas en secuencia entre el HSV-1 y HSV-2. Típicamente, los cebadores de oligonucleótido son 8 a 50 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, o 50 nucleótidos de longitud). “Cebadores de polimerasa de ADN del HSV” y “cebadores TK del HSV” como se utilizan aquí se refieren un cebador es de oligonucleótido que hibridan específicamente a secuencias de ácido nucleico que codifican la polimerasa de ADN del HSV y el TK del HSV, respectivamente, e inicia la síntesis de estos bajo condiciones apropiadas.

Diseñar oligonucleótidos para ser utilizados como sondas de hibridación se pueden desempeñar en una forma similar al diseño de cebadores, aunque los miembros de un par de sondas hibridan preferiblemente a un producto de amplificación dentro de no más de 5 nucleótidos de cada uno en la misma cadena tal manera que pueda ocurrir FRET (por ejemplo, dentro de no más de 1, 2, 3, o 4 nucleótidos uno del otro). Este grado de separación mínimo trae típicamente los grupos funcionales fluorescente respectivos en proximidad suficiente de tal manera que pueda ocurrir FRET. Se entiende, sin embargo, que otras distancias de separación (por ejemplo, 6 o más nucleótidos) son posibles dado que los grupos funcionales fluorescentes se posicionan aproximadamente relativamente uno junto al otro (por ejemplo, con un brazo ligador) de tal manera que pueda ocurrir FRET. Adicionalmente, las sondas se pueden diseñar para hibridar objetivos que contienen una mutación o polimorfismo, permitiendo por lo tanto la detección diferencial del HSV (por ejemplo, HSV-1 vs. HSV-2) basado en la hibridación absoluta de pares diferentes de sondas que corresponde a las especies a ser distinguidas o temperaturas de fusión diferenciales entre, por ejemplo, miembros de un par de sondas y cada producto de amplificación que corresponde a las especies a ser distinguidas (por ejemplo, HSV-1 y HSV-2). Como con los cebadores de oligonucleótido, las sondas de oligonucleótido tienen usualmente similares temperaturas de fusión, y la longitud de cada sonda debe ser suficiente para que ocurra la hibridación específica de secuencia pero no ocurre tan larga que se reduzca la fidelidad durante la síntesis. las sondas de Oligonucleótido son 8 a 50 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, o 50 nucleótidos de longitud).

Las construcciones de la invención incluyen vectores que contienen una molécula de ácido nucleico HSV, por ejemplo, Polimerasa ADN o TK, o un fragmento de los mismos. Se pueden utilizar construcciones de la invención, por ejemplo, como molécula de ácido nucleico plantilla de control. Los vectores adecuados para uso en la presente invención están disponibles comercialmente y/o producidos mediante métodos de tecnología ADN recombinante de rutina en la técnica. Las moléculas de ácidos nucleico que codifican la polimerasa de ADN del HSV o TK del HSV se pueden obtener, por ejemplo, mediante síntesis química, que dirige la clonación del HSV, o mediante amplificación PCR. Una polimerasa de ADN del HSV o molécula de ácido nucleico TK del HSV o fragmentos de los mismos se pueden ligar operablemente a un promotor o otro elemento regulador tal como una secuencia mejoradora, un elemento de respuesta o un elemento inducible que modula la expresión de la polimerasa de ADN del HSV o otra molécula de ácido nucleico TK del HSV. Como se utiliza aquí, ligado operablemente se refiere a conectar un promotor y/o otros elementos reguladores a una molécula de ácido nucleico que codifica una polimerasa de ADN del HSV o TK del HSV en tal una forma con el fin de permitir y/o da la expresión de la polimerasa de ADN del HSV o molécula

de ácido nucleico TK del HSV. Un promotor que normalmente no dirige la expresión de la polimerasa de ADN del HSV o TK del HSV se puede utilizar para dirigir la transcripción de la polimerasa ADN o de ácido nucleico TK del HSV utilizando, por ejemplo, una polimerasa vírica, una polimerasa bacteriana, o una polimerasa de ARN eucariótica. Alternativamente, La polimerasa de ADN del HSV o El promotor natural TK del HSV se puede utilizar para dirigir la transcripción de una polimerasa de ADN del HSV o ácido nucleico de TK del HSV, respectivamente. Adicionalmente, la conexión operablemente se puede referir a una conexión apropiada entre una polimerasa de ADN del HSV o elemento regulador promotor del TK del HSV y una secuencia de codificación heteróloga en tal una forma que permite la expresión de la secuencia de codificación heteróloga.

Las construcciones adecuadas para uso en los métodos de la invención incluyen típicamente, en adición a TK del HSV o polimerasa de ADN del HSV que codifican moléculas de ácido nucleico, secuencias de ácido nucleico que codifican un marcador seleccionable (por ejemplo, un gen de resistencia antibiótica) para seleccionar las construcciones deseadas y/o transformantes, y un origen de replicación. La elección de los sistemas de vectores depende usualmente de varios factores, que incluyen pero no se limitan a, la elección de células anfitrionas, eficiencia de replicación, selectividad, infusibilidad, facilidad de recuperación.

Las construcciones de la invención que contienen molécula de ácido nucleico que codifican la polimerasa de ADN del HSV o TK del HSV se pueden propagar en una célula anfitriona. Como se utilizan aquí, el término célula anfitriona significa que incluye procariotes y eucariotes tal como células de levadura, de plantas y de animales. Los anfitriones procarióticos pueden incluir *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis*. Los anfitriones eucarióticos incluyen levaduras tal como *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Pichia pastoris*, células de mamíferos tal como células COS o células de ovario de hámster chino (CHO), células de insectos, y células de plantas tal como *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum*. Una construcción de la invención se puede introducir en una célula anfitriona utilizando cualquiera de la técnica comúnmente conocidas por aquellos expertos en el arte. Por ejemplo, precipitación de fosfato de calcio, electroporación, choque térmico, lipofección, microinyección, y transferencia de ácido nucleico mediado por víricos son métodos comunes para introducir ácidos nucleico en célula anfitrionas. Adicionalmente, se puede suministrar directamente ADN desnudo a las células (véase, por ejemplo, Patente Estadounidenses Nos. 5,580,859 y 5,589,466).

#### Reacción de cadena de polimerasa (PCR)

Las Patentes Estadounidenses Nos. 4,683,202, 4,683,195, 4,800,159, y 4,965,188 describen técnicas PCR convencionales. El PCR emplea típicamente dos cebadores de oligonucleótido que une a una plantilla ácido nucleico seleccionada (por ejemplo, ADN o ARN). Los cebadores útiles en la presente descripción incluyen oligonucleótidos capaces de actuar con un punto de iniciación de la síntesis de ácido nucleico dentro de moléculas de ácido nucleico que codifican la polimerasa de ADN del HSV o TK del HSV. Un cebador se puede purificar a partir de un digesto de restricción mediante métodos convencionales, o se puede producir sintéticamente. El cebador es preferiblemente monocatenario para máxima eficiencia en la amplificación, pero el cebador ser bicatenario. Los cebadores bicatenarios se desnaturalizan primero, es decir, se tratan para separar las hebras. Un método para desnaturalizar ácido nucleico bicatenarios es mediante calor.

El término "polimerasa termoestable" se refiere a una enzima de polimerasa que es estable al calor, es decir, la enzima cataliza la formación de de productos de extensión de cebador complementarios con una plantilla y no se desnaturaliza irreversiblemente cuando se someten a temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para efectuar la desnaturalización de ácidos nucleico de plantilla bicatenaria. Generalmente, la síntesis se inicia en el extremo 3' cada cebador y procede en la dirección 5' a 3' a lo largo de la hebra de plantilla. Se ha aislado la polimerasa termoestables de *Thermus flavus*, *T. ruber*, *T. thermophilus*, *T. aquaticus*, *T. lacteus*, *T. rubens*, *Bacillus stearothermophilus*, y *Methanothermobacter fervidus*. No obstante, las polimerasas que no son termoestables también se pueden emplear en ensayos PCR dado que la enzima se repone.

Si ácido nucleico de plantilla es bicatenario, es necesario separar dos hebras antes que se puedan utilizar como una plantilla en PCR. La separación de hebras se puede lograr mediante cualquier método de desnaturalización adecuado que incluye medios físicos, químicos o enzimáticos. Un método para separar las hebras de ácido nucleico involucra calentar el ácido nucleico hasta que sea predominantemente desnaturalizado (por ejemplo, más del 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% desnaturalizados). Las condiciones de calentamiento necesarias para desnaturalizar ácido nucleico plantilla dependerán, por ejemplo, de la concentración de sal del amortiguador y la longitud y composición de nucleótido de los ácidos nucleico que se desnaturalizan, pero típicamente varían de aproximadamente 90°C a aproximadamente 105°C durante un tiempo que depende de características de reacción tal como temperatura y la longitud del ácido nucleico. La desnaturalización se desarrolla típicamente durante aproximadamente 30 seg a 4 min.

Si el ácido nucleico bicatenario se desnaturaliza por calor, a la mezcla de reacción se le permite enfriarse a temperatura que promueve la hibridación de cada cebador con su secuencia de ácido nucleico objetivo. Temperatura para hibridación es usualmente de aproximadamente 35°C a aproximadamente 65°C. Los tiempos de hibridación pueden ser de aproximadamente 10 segs a aproximadamente 1 min. La mezcla de reacción se ajusta luego a una temperatura en la que la actividad de la polimerasa se promueve o se optimiza, es decir, una temperatura suficiente para que ocurra extensión del cebador hibridado y para generar productos complementarios con la plantilla de ácido nucleico. La temperatura debe ser suficiente para sintetizar un producto de extensión de cada cebador que se hibrida a un plantilla de

## ES 2 344 594 T3

ácido nucleico, pero no debe ser tan alta con el fin de desnaturalizar un producto de extensión de su plantilla complementaria (por ejemplo, temperatura para extensión varía generalmente de aproximadamente 40° a 80°C). Los tiempos de extensión pueden ser de aproximadamente 10 segs a aproximadamente 5 mins.

Los ensayos PCR pueden emplear ácido nucleico de plantilla tal como ADN o ARN, que incluyen ARN mensajero (mARN). Ácido nucleico plantilla no necesita ser purificado; este puede ser una fracción menor de una mezcla compleja, tal como ácido nucleico HSV contenidas en células humanas. El ADN o ARN se puede extraer de una muestra biológica tal como un hisopo ocular, especímenes genitales, especímenes dérmicos, prueba de Papanicolaus, fluido amniótico, y fluido cerebroespinal mediante técnicas de rutina tal como aquellas descritas en Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications (Persing *et al.* (eds), 1993, American Society for Microbiology, Washington D.C). Los ácidos nucleicos plantillas se pueden obtener de cualquier número de fuentes, tal como plásmidos, o fuentes naturales que incluyen bacteria, levaduras, virus, organelos, u organismos mayores tal como plantas o animales.

Los cebadores de oligonucleótido se combinan con reactivos PCR bajo condiciones de reacción que incluyen extensión de cebadores. Por ejemplo, las reacciones de extensiones de cadena incluyen generalmente 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% (p/v) gelatina, 0.5-1.0 µg de ADN de plantilla desnaturalizado, 50 pmoles de cada cebador de oligonucleótido, 2.5 U de polimerasa Taq, y 10% DMSO. Las reacciones contienen usualmente 150 a 320 mM cada una de dATP, dCTP, dTTP, dGTP, o uno o más análogos de los mismos.

Las hebras sintetizadas nuevamente forman una molécula bicatenaria que se pueden utilizar en etapas siguientes de la reacción. Las etapas de separación de hebras, hibridación, y alargamiento se pueden repetir tan frecuentemente como se necesite para producir la cantidad necesaria de productos de amplificación que corresponden a la molécula de ácido nucleico HSV objetivo. Los factores limitantes en la reacción son las cantidades de los cebadores, enzima termol estable, y trifosfatos nucleósidos presente en la reacción. Las etapas de ciclo (es decir, desnaturalización, hibridación, y extensión) se repiten preferiblemente por lo menos una vez. El número de etapas de ciclo dependerán, por ejemplo, de la naturaleza de la muestra. Si la muestra es una mezcla compleja de ácido nucleico, se requerirán más etapas de ciclo para amplificar suficiente la secuencia objetivo para detección. Generalmente, la etapa de ciclo se repite por lo menos aproximadamente 20 veces, pero se puede repetir tanto como 40, 60, o aún 100 veces.

### Transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET)

La tecnología FRET (véase, por ejemplo, Patente Estadounidenses Nos. 4,996,143, 5,565,322, 5,849,489, y 6,162,603) se basa en el concepto de que cuando un donante y un grupo funcional fluorescente aceptor correspondiente se posicionan dentro de una cierta distancia uno del otro, tiene lugar la transferencia de energía entre los dos grupos funcionales que se puede visualizar o detectar de otra forma y/o cuantificar. Dos sondas de oligonucleótidos, cada una contienen un grupo funcional fluorescente, pueden hibridar a un producto de amplificación en posiciones particulares determinadas mediante la complementariedad de las sondas de oligonucleótidos con la secuencia de ácido nucleico del objetivo HSV. Luego de la hibridación de las sondas de oligonucleótidos con el producto de amplificación en las posiciones adecuadas, se genera una señal FRET. Las temperaturas de hibridación pueden variar de aproximadamente 35°C a aproximadamente 65°C durante aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 1 minuto.

Se puede llevar a cabo análisis fluorescente con un sistema de microscopio epifluorescente de conteo de fotones (que contiene el espejo dicróico apropiado y filtros para monitorear la emisión fluorescente en el rango particular), un sistema fotomultiplicador de conteo de fotones o un fluorómetro. La excitación para iniciar la transferencia de energía se puede llevar a cabo con un láser de ion argón, una lámpara de arco de mercurio (Hg) de alta intensidad, una fuente de luz de fibra óptica, u otra fuente de luz de alta intensidad filtrada apropiadamente para excitación en el rango deseado.

Como se utilizan aquí con respecto a los grupos funcionales fluorescentes aceptores correspondientes y donantes, "correspondientes" se refiere a un grupo funcional fluorescente aceptor que tienen un espectro emisión que traslapa el espectro de excitación del grupo funcional fluorescente donante. La longitud de onda máxima del espectro de emisión del grupo funcional fluorescente aceptor debe ser de por lo menos 100 nm más que la longitud de onda máxima del espectro de excitación del grupo funcional fluorescente donante. De acuerdo a lo anterior, se puede producir una transferencia de energía eficiente no radiactiva entre ellos.

Los grupos funcionales aceptores correspondientes y donantes fluorescentes se seleccionan generalmente para (a) transferencia de energía Förster de alta eficiencia; (b) un largo cambio de Stokes final (>100 nm); (c) cambio de emisión tan lejos como sea posible en la porción roja del espectro visible (>600 nm); y (d) cambio de emisión a una longitud de onda mayor que la emisión fluorescente de agua Raman producida por excitación en la longitud de onda de excitación del donante. Por ejemplo, un grupo funcional fluorescente donante se puede seleccionar de tal manera que este tiene su excitación máxima cerca a una línea láser (por ejemplo, helio-Cadmio 442 nm o Argón 488 nm), un coeficiente de alta extinción, un rendimiento alto de quantum, y una buena sobre posición de su emisión fluorescente con el espectro de excitación del grupo funcional fluorescente aceptor correspondiente. Un grupo funcional fluorescente aceptor correspondiente se puede seleccionar de tal manera que este tiene un alto coeficiente de extinción, un alto rendimiento de quantum, una buena sobre posición de su excitación la emisión del grupo funcional fluorescente donante, y la emisión en la parte roja del espectro visible (>600 nm).



Los grupos funcional fluorescente donante representativos que se pueden utilizar con varios grupos funcionales fluorescente aceptores en tecnología FRET incluyen fluoresceína, Amarillo Lucifer, B-ficoeritrina, 9-acridineisotiocianato, Amarillo Lucifer VS, ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatostilbeno-2,2'-disulfónico, 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcoumarina, succinimidil 1-pirenebutirato, y derivados de ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatostilbeno-2,2'-disulfónico. Los grupo funcional fluorescente aceptores representativos, que dependen del grupo funcional fluorescente donante utilizado, incluyen LC<sup>TM</sup>-Red 640, LC<sup>TM</sup>-Red 705, Cy5, Cy5.5, cloruro sulfonilo, B Lissamine rhodamina, tetrametil rhodamina isotiocianato, rhodamina x isotiocianato, eritrosina isotiocianato, fluoresceína, pentaacetato dietilenotriamina o otros quelatos de iones Lantanida (por ejemplo, Europio, o Terbio). Se pueden obtener Grupos funcionales fluorescente aceptores y donantes, por ejemplo, de Molecular Probes (Junction City, OR) o Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Los grupos funcionales fluorescentes aceptores y donantes pueden se pueden adherir al oligonucleótido de sonda apropiado a través de un brazo conector. La longitud del brazo conector es importante, ya que los brazos conectores afectaran la distancia entre el donante y los grupos funcionales fluorescentes aceptores. La longitud de un brazo conector para el propósito de la presente invención es la distancia en Angstroms (Å) de la base del nucleótido del grupo funcional fluorescente. En general, un brazo conector es de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 Å. El brazo conector puede ser de la clase descrita en WO 84/03285. La WO 84/03285 también describe métodos para unir brazos conectores a una base de nucleótido particular, y también para unir grupos funcionales fluorescente a un brazo conector.

Un grupo funcional fluorescente aceptor tal como LC<sup>TM</sup>-Red 640-NHS-éster se pueden combinar con C6-fosforamiditas (disponible de ABI (Foster City, CA) o Glen Research (Sterling, VA)) para producir, por ejemplo, LC<sup>TM</sup>-Red 640- Fosforamidita. Los conectores utilizados frecuentemente para acoplar un grupo funcional fluorescente donante tal como fluoresceína a un oligonucleótido incluyen conectores tiourea (derivados FITC-, por ejemplo, fluorescein-CPG de Glen Research o ChemGene (Ashland, MA)), ligadores de amida (derivados de fluorescein-NHS-éster-, tal como fluorescein-CPG de BioGenex (San Ramon, CA)), o 3'- amino-CPG que requiere acoplamiento de una fluorescein-NHS-éster después de síntesis de oligonucleótido.

### 30 *Detección del virus del herpes simplex*

El cultivo celular es el método diagnóstico "estándar dorado" actual para la detección del HSV de fuentes genitales y dérmicas, que producen índices de detección que excede típicamente el 30%. El HSV se replica óptimamente en cultivos de células diploide de fibroblasto. Las modificaciones a las técnicas de cultivo celular estándar reducen el tiempo de diagnóstico de 24 a 48 h post-inoculación, pero requieren el uso complementario de cultivos de células de tubo convencional para alcanzar finalmente la sensibilidad diagnostica máxima. De manera similar, los intentos en dirigir la detección del HSV de espécimen clínicos mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) y aglutinación de látex, sonda de ácido nucleico, y métodos de anticuerpo de fluorescente fallan generalmente cuando se presentan bajos títulos de HSV en especímenes utilizados para inoculación en cultivos celulares.

Varios estudios recientes ha indicado el potencial para la detección incrementada de infecciones por de HSV mediante PCR comparado con la detección de antígeno o métodos de cultivo celular, particularmente en CSF. Sin embargo, la implementación de rutina de las técnicas de amplificación de ácido nucleico en laboratorios clínico para espécimen dérmicos, genitales, y otros no ha sido practico debido a asuntos de contaminación de portadores del amplicón, falsos positivos; falsos negativos, y métodos de detección de producto PCR técnicamente complicados. Los métodos proporcionados por la invención son altamente específicos y sensibles y contienen un atapa dada por PCR en tiempo real que hace el diagnóstico clínico de rutina del HSV factible.

La presente invención proporciona métodos para detectar la presencia o ausencia de HSV en una muestra biológica de un individuo. Este método evita problemas de contaminación de la muestra, falsos negativos, falso positivos y proporciona la ventaja adicional de ser capaz de distinguir el HSV-1 de HSV-2. El método incluye desarrollar por lo menos una etapa clínica, que incluye primero poner en contacto la muestra biológica con un par de cebadores de polimerasa de ADN del HSV para producir un producto de amplificación de polimerasa de ADN del HSV si una molécula de ácido nucleído que codifica la polimerasa de ADN del HSV está presente en la muestra. Cada uno de los cebadores polimerasa de ADN del HSV hibrida a un objetivo dentro de o adyacente a una molécula de ácido nucleico de polimerasa de ADN del HSV de tal manera que por lo menos una porción de cada producto de amplificación contiene la secuencia de ácido nucleico que codifica la polimerasa de ADN del HSV. Más importante, el producto de amplificación debe contener las secuencias de ácido nucleico que son complementarios con sondas de polimerasa de ADN del HSV. Cada etapa de ciclo incluye adicionalmente poner en contacto la muestra con un par de sondas de polimerasa de ADN del HSV. De acuerdo con este método la invención, un miembro del par de sondas de polimerasa de ADN del HSV se etiquetan con un grupo funcional fluorescente donante y el otro se etiquetan con un grupo funcional fluorescente aceptor correspondiente. La presencia o ausencia de FRET entre el grupo funcional fluorescente donante de la primer sonda de polimerasa de ADN del HSV y el grupo funcional fluorescente aceptor correspondiente de la segunda sonda de polimerasa de ADN del HSV se detectan luego de la hibridación de las sondas del producto de amplificación de polimerasa de ADN del HSV. Se pueden desarrollar múltiples ciclos de amplificación y etapas de hibridación, y se puede desarrollar en un termociclador.

## ES 2 344 594 T3

Los métodos descritos anteriormente para detectar HSV en una muestra biológica utilizando molécula de ácido nucleico que codifican polimerasa de ADN del HSV como una plantilla también se puede desarrollar utilizando moléculas de ácido nucleico que codifica TK del HSV como una plantilla. Tal un método utiliza cebadores TK del HSV y TK del HSV. En la mayoría de los casos, los métodos de la descripción proporcionan específica suficiente de tal manera que solo se requiere un único objetivo para diagnóstico (por ejemplo, ya sea polimerasa de ADN del HSV o TK del HSV). Si se desea, detectar un segundo ácido nucleico plantilla se puede utilizar como una prueba confirmatoria.

Como se utiliza aquí, “amplificación” se refiere al proceso de sintetizar múltiples moléculas de ácido nucleico que son complementarios con una o ambas hebras de una molécula de ácido nucleico plantilla (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico que codifican polimerasa de ADN del HSV o TK del HSV). La amplificación de una molécula de ácido nucleico incluye típicamente desnaturalizar el ácido nucleico plantilla, los cebadores de hibridación al ácido nucleico plantilla a una temperatura que está por debajo de la temperatura de fusión de los cebadores, y alargar enzimáticamente los cebadores para generar un producto de amplificación. La amplificación requiere típicamente la presencia de trifosfatos de desoxiribonucleósidos, una enzima de polimerasa de ADN (por ejemplo, Platinum® Taq) y un amortiguador apropiado y/o co-factores para actividad óptima de la enzima polimerasa (por ejemplo, MgCl<sub>2</sub> y/o KCl).

Si ocurre la amplificación de ácido nucleico de HSV y se produce un producto de amplificación, la etapa de hibridar resultados en una señal detectable basada en FRET entre los miembros del par de sondas. Como se utilizan aquí, “hibridación” se refiere a la hibridación de sondas para un producto de amplificación. Las condiciones de hibridación incluyen típicamente una temperatura que está por debajo de la temperatura de fusión de las sondas pero que evita la hibridación no específica de las sondas.

De manera general, la presencia de FRET indica la presencia de HSV en la muestra biológica, y la ausencia de FRET indica la ausencia de HSV en la muestra biológica. Las muestras biológicas representativas que se pueden utilizar en la práctica de los métodos de la invención incluyen especímenes dérmicos, especímenes genitales, hisopos oculares, ensayos de Papanicolaus, fluido amniótico o fluido cerebroespinal. Las muestras biológicas se procesan generalmente (por ejemplo, mediante métodos de extracción de ácido nucleico conocidos en la técnica) para liberar ácido nucleico del HSV o algunos casos, la muestra biológica se puede en contacto directamente con componentes de reacción PCR y los oligonucleótidos apropiados.

Un resultado FRET positivo indica la presencia de ácido nucleico del HSV que se ve en la muestra biológica. De acuerdo con este método la presente invención, la presencia de FRET dentro de 50 ciclos (por ejemplo, dentro de 40 ciclos, 37 ciclos, 30 ciclos, 20 ciclos o 10 ciclos) indica la presencia de ácido nucleico HSV en la muestra y se asocia usualmente con una infección por HSV en el individuo examinado. Sin embargo, la presencia de ácido nucleico HSV en una muestra biológica pueden no correlacionarse necesariamente con una infección HSV en el individuo, como descritos aquí, más del 95% de los individuos examinados con LightCycler™ PCR en el que se detecta FRET dentro de 37 ciclos utilizando las moléculas de ácido nucleico HSV que codifican polimerasa de ADN fueron positivos para una infección por HSV basado en un ensayo PCR LightCycler™ confirmatorio utilizando TK que codifica las moléculas de ácido nucleico del HSV. Así, las muestras en las que se detectan FRET dentro de 37 ciclos se reportan como positivas para infección por HSV. La especificidad de los métodos se reduce ligeramente cuando se detecta FRET después de 37 ciclos. Por ejemplo, la ausencia de FRET antes de 38 ciclos sugiere que la muestra se debe probar de nuevo o cultivar utilizando métodos convencionales a discreción del médico principal. Como se describe aquí, la presencia de FRET después de 39 ciclos de reporta como una infección de HSV negativa. El número de las etapas de ciclo requeridas para detección exacta del HSV es dependiente de las condiciones de ciclo (por ejemplo, amortiguadores, temperaturas, y cebadores y sondas).

Un resultado negativo indica la ausencia de ácido nucleico HSV detectable en el espécimen presentado para análisis, pero no niega la posibilidad de la presencia de organismos en cantidades muy pequeñas. En el caso de un resultado negativo, puede ser benéfico estudiar especímenes adicionales o alternos. En el caso de un resultado negativo, el médico principal del paciente debe tomar la decisión de si o no volver a hacer la prueba al paciente basado en la gráfica clínica total. La recolección de espécimen inadecuada, retrasos en transporte, condiciones de transporte inapropiadas, a uso de ciertos hisopos para recolección (cambio de aluminio o alginato de calcio) todas son condiciones que pueden afectar el éxito y/o la exactitud del resultado de la prueba.

El análisis de la curva de fusión es una etapa adicional que se puede incluir en un perfil de ciclo. El análisis de la curva de fusión se basa en el hecho de que en la fusión de ADN a una temperatura característica denominada temperatura de fusión (T<sub>m</sub>), que se define como la temperatura en la que la mitad de los duplexos de ADN se han separado en hebras sencillas. La temperatura de fusión del ADN depende principalmente de su composición de nucleótidos. Así, las moléculas de ADN ricas en nucleótidos G y C tienen un mayor T<sub>m</sub> que aquellas que tienen una abundancia de nucleótidos A y T. Al detectar la temperatura en la que se pierden las sondas, se puede determinar la temperatura de fusión de las sondas. De manera similar, al detectar la temperatura en la que se genera las sondas, se puede determinar la temperatura de hibridación de las sondas. La temperatura de fusión de las sondas de polimerasa de ADN del HSV las sondas TK del HSV de producto de amplificación respectivo pueden confirmar la presencia del HSV-1 y/o HSV-2 y se pueden utilizar para distinguir entre el HSV-1 y/o HSV-2 en la muestra.

Dentro de cada serie de termociclador, se ciclizan también las muestras de control. Las muestras de control positivo puede amplificar la plantilla de ácido nucleico de control del HSV (a diferencia de la polimerasa de ADN del HSV o plantilla TK del HSV) utilizando, por ejemplo, probadores de control y sendas de control. Las muestras de control positivo también se pueden amplificar, por ejemplo, una construcción de plásmido de control que contiene polimerasa de ADN del HSV o ácido nucleico TK del HSV. Tal un plásmido de control se puede amplificar internamente (por ejemplo, dentro de cada muestra biológica) o en una serie de muestra separada lado a lado con las muestras de los pacientes. Cada serie de termociclador también debe incluir un control negativo, que por ejemplo, le falte el ácido nucleico plantilla del SDV. Tales controles son indicadores del éxito o falla de la amplificación, hibridación o reacción FRET. Por lo tanto, las reacciones de control pueden determinar fácilmente, por ejemplo la capacidad de los secadores para hibridar con la especificidad de consecuencia y para iniciar la elongación, así como también la capacidad de las sondas para hibridar con especificidad de secuencia y para que ocurra FRET.

En una realización, los métodos de la invención incluyen etapas para evitar la contaminación. Por ejemplo, un método enzimático que utiliza glicosilasa ADN uracilo se describe en las patentes Estadounidenses números 5,035,996, 5,683,896 y 5,945,313 Para reducir o eliminar la contaminación entre una serie de termociclador y la siguiente. Adicionalmente, las prácticas consistentes de laboratorio estándar y los procedimientos son deseables cuando se desarrollan los métodos de la invención. Los procedimientos y las prácticas de contención incluyen, pero no se limitan a áreas de trabajo separadas para diferentes etapas de un método, cabinas de contención, puntas de pipetas de filtro de barrera y pipetas de desplazamiento de aire dedicadas. Las prácticas y los procedimientos de contención consistentes por el personal son necesarios para exactitud en un diagnóstico de laboratorio que maneja muestras clínicas.

Los métodos PCR convencionales que utilizan tecnología FRET se pueden utilizar para practicar los métodos de la invención. En una realización, se utiliza un instrumento LightCycler™. Una descripción detallada del sistema LightCycler™ y tiempo real y monitoreo en línea del PCR se pueden encontrar en <http://biochem.roche.com/lightcycler>. La siguiente solicitud de patente describe PCR en tiempo real como se utiliza la tecnología LightCycler™: WO 97/4607, WO 97/46714 y WO 97/46712. El instrumento LightCycler™ es un ciclizador térmico rápido combinado con un fluorómetro de micro volumen que utiliza ópticas. Esta técnica de termo ciclo rápido utiliza cubetas de vidrio como recipientes de reacción para el calentamiento y enfriamiento de la cámara de reacción se controla al alternar el aire caliente y ambiente. Debido a la baja masa del aire y alta relación al área de superficie con el volumen de las cubetas, se puede alcanzar índice de intercambio de temperatura muy rápidos dentro de cámara térmica de la LightCycler™. La adición de tintes fluorescentes seleccionados a los componentes de reacción permite al PCR ser monitoreado en tiempo real y en línea. Adicionalmente, las cubetas sirven como elementos ópticos para recolección de señal (similar a fibras ópticas de vidrio), concentrar la señal en la punta de cada cubeta. El efecto es el monitoreo fluorescente e iluminación de las muestras de micro volumen.

El carrusel LightCycler™ que aloja las cubetas se puede remover del instrumento. Por lo tanto las muestras se pueden cargar al exterior del instrumento (en una sala limpia PCR, por ejemplo). Adicionalmente, esta característica permite al carrusel de muestra ser limpiado y esterilizado fácilmente. El fluorómetro, como parte del aparato LightCycler™, tiene fuente de luz. La luz emitida se filtra y enfoca mediante un lente de iluminación sobre la parte superior de cada cubeta. La luz fluorescente emitida de las muestras se enfoca luego mediante los mismos lentes, se pasa a través de un espejo dicrómico, se filtra apropiadamente y se enfocan en foto híbridos que recolectan datos. La unidad óptica disponible actualmente en el instrumento LightCycler™ (Roche Molecular Biochemicals. Catalog No. 2 011 468) incluye tres filtros de paso de banda (530 nm, 640 nm, y 710 nm), que proporciona detección de tres colores y varias opciones de adquisición de fluorescencia. Las opciones de recolección de datos incluyen monitoreo una vez por etapa de ciclo, adquisición de muestra única completamente continua para análisis de curva de fusión, muestreo continuo (que ni la frecuencia de muestreo es dependiente del número de muestras) y/o medición en forma de tapas de todas las muestras después de definido el intervalo de temperatura.

El LightCycler™ se puede operar utilizando una estación de trabajo de PC que puede utilizar un sistema operativo Windows NT. Las señales de las muestras se obtienen como las posiciones de máquina de las cubetas secuencialmente sobre la unidad óptica. El software puede visualizar las señales de fluorescencia en tiempo real inmediatamente después de cada medición. El tiempo de adquisición fluorescente es 10-100 mseg. Después de cada etapa de ciclo, se pueden actualizar continuamente una visualización cuantitativa del número de ciclo vs. fluorescencia para todas las muestras. Los datos generados se pueden almacenar para análisis adicional.

Un formato de tecnología FRET común utiliza dos sondas de hibridación como se describió anteriormente. Cada sonda se puede etiquetar con un grupo funcional fluorescente diferente y se designan generalmente para hibridar en proximidad cercana uno al otro en una molécula de ADN objetivo (por ejemplo, un producto de amplificación). Un grupo funcional fluorescente donante, por ejemplo, fluoresceína, se excita a 470 nm mediante la fuente de luz del instrumento LightCycler™. Durante el FRET, la fluoresceína transfiere su energía a un grupo funcional fluorescente aceptor tal como LightCycler™-Red 640 (LC™-RED 640) o LightCycler™-Red 705 (LC™-RED 705). El grupo funcional fluorescente aceptor emite luego luz de una longitud de onda mayor, que se detecta por el sistema de detección óptico del instrumento LightCycler™. El FRET eficiente solo puede tener lugar cuando los grupos fluorescentes están en proximidad local directa y cuando el espectro de emisión del grupo funcional fluorescente donante se superpone con el espectro de absorción del grupo funcional fluorescente aceptor la intensidad de la señal emitida se puede correlacionar con el número de moléculas de ADN objetivo original (por ejemplo, el número del genoma HSV).

Otro formato de tecnología FRET utiliza la tecnología TaqMan® para detectar la presencia o ausencia de un producto de amplificación, y por lo tanto, la presencia o ausencia de HSV. La tecnología TaqMan® utiliza una sonda de hibridación mono catenaria etiquetada con dos grupos funcionales fluorescentes. Cuando un primer grupo fluorescente se exista con luz de una longitud de onda adecuada, se transfiere la energía absorbida a un segundo grupo funcional fluorescente de acuerdo con los principios del FRET. El segundo grupo funcional fluorescente es generalmente una molécula extinguidora. Durante la etapa de hibridación de la reacción PCR, la sonda de hibridación etiquetada se une al ADN objetivo (es decir, el producto de amplificación) y se degrada mediante la actividad exonucleasa 5' a 3' de la polimerasa Taq durante la posterior fase de elongación. Como un resultado, el grupo funcional fluorescente excitado y el grupo funcional extinguidor se llegan a separar espacialmente uno del otro. Como una consecuencia, luego de la excitación del primer grupo funcional fluorescente en la ausencia del extinguidor, la emisión de fluorescencia del primer grupo funcional fluorescente se puede detectar. Por vía de ejemplo, un ABI PRISM®7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA) utiliza tecnología TaqMan® y es adecuado para desarrollar los métodos descritos aquí para detectar el HSV. La información sobre la amplificación PCR y la detección utilizando un sistema ABI PRISM®770 se puede encontrar en <http://www.appliedbiosystems.com/products>.

Otro formato de tecnología FRET utiliza tecnología beacon molecular para detectar la presencia o ausencia de un producto de amplificación, y por lo tanto, la presencia o ausencia del HSV. La tecnología beacon molecular utiliza una sonda de hibridación etiquetada con un primer grupo funcional fluorescente y un segundo grupo función fluorescente. El segundo grupo funcional fluorescente es generalmente un extinguidor y las etiquetas fluorescentes se ubican típicamente en cada extremo de la sonda. La tecnología beacon molecular utiliza un oligonucleótido de sonda que tiene secuencias que permiten la formación de estructuras secundarias (por ejemplo, una horquilla). Como un resultado de la formación de la estructura secundaria dentro de la sonda, ambos grupos funcionales fluorescentes están en una proximidad espacial cuando la sonda está en la solución. Después de la hibridación, a los ácidos nucleicos objetivo (es decir, productos de amplificación), la estructura secundaria de la sonda se interrumpe y los grupos funcionales fluorescentes legan a separarse uno del otro de tal manera que después de la excitación con luz de una longitud de onda, la emisión del primer grupo funcional fluorescente se puede detectar.

Como una alternativa a la detección utilizando tecnología FRET, un producto de amplificación se puede detectar utilizando un tipo de unión al ácido nucleico tal como un tinte de unión de ADN fluorescente (por ejemplo, SYBRGreenI® or SYBRGold® (Molecular Probes)). Luego de la interacción con el ácido nucleico, tales tintes de unión de ADN fluorescente emiten una señal de fluorescencia después de excitación con luz a una longitud de onda adecuada. Un tinte de unión de ácido nucleico tal como un tinte de intercalación también se puede utilizar. Cuando se utilizan tintes de unión de ácido nucleico, usualmente se desarrolla análisis de curva de fusión para confirmación de la presencia del producto de amplificación.

Se entiende que la presente invención no se limita por la configuración de uno o más instrumentos disponibles comercialmente.

#### *Artículos de fabricación*

La descripción proporcional adicionalmente artículos para artículos de fabricación para detectar en HSV. Un artículo de fabricación de acuerdo con la presente invención puede incluir cebadores y sondas utilizados para detectar SDV, junto con material de empaque adecuado. Los cebadores y sondas representativas para detección del HSV son capaces de hibridar las moléculas de ácido nucleico que codifican polimerasa de ADN del HSV o TK de HSV. Los métodos para disipar los cebadores y sondas se describen aquí, y se proporcionan ejemplos representativos de cebadores y sondas que hibridan a ácidos nucleico que codifican polimerasa de ADN del HSV o TK del HSV.

Los artículos de fabricación de la descripción también pueden incluir uno o más grupos funcionales fluorescentes para etiquetar las sondas o alternativamente, las sondas suministradas con el equipo se pueden etiquetar. Por ejemplo, un artículo de fabricación puede incluir un grupo funcional fluorescente donante una de las sondas de polimerasa de ADN del HSV o las sondas TK del HSV y un grupo funcional fluorescente aceptor para etiquetar las otras sondas de polimerasa de ADN del HSV o sondas TK del HSV, respectivamente. Se proporcionan aquí ejemplos de grupos funcionales fluorescentes donantes de FRET adecuados y grupos funcionales fluorescentes aceptables correspondientes.

Ante los artículos de fabricación de la descripción también pueden contener una etiqueta de paquete que tiene instrucciones allí para utilizar los cebadores de polimerasa de ADN del HSV y sondas o los cebadores TK del HSV y sondas para detectar el HSV en una muestra biológica. Tal un inserto de paquete puede contener adicionalmente instrucciones allí para utilizar cebadores de polimerasa de ADN del HSV y sondas o cebadores TK del HSV y sondas para distinguir entre el HCV-1 y HSV-2 dentro de la misma muestra biológica. Los artículos de fabricación pueden incluir adicionalmente reactivos para llevar a cabo los métodos descritos aquí (por ejemplo, amortiguadores, enzimas de polimerasa, cofactores, o agentes para evitar la contaminación). Tales reactivos pueden ser específicos para uno de los instrumentos disponibles comercialmente descritos aquí.

Se hará la descripción adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### 5 Especímenes y ensayo Shell Vial

10 Especímenes de hisopos de genital (n=160) dérmico (n=38) y ocular (n=2) de pacientes que se sospecha tienen infección por HSV se extraen en volúmenes de 2-ml de medio libre de suero, y los volúmenes de extracto de espécimen se dividen en dos alícuotas iguales. Si cada una de dos cultivos celulares MRC-5 Shell vial reciben 0.2 ml de inóculo de una alícuotas. Los frascos se centrifugan, se encubren durante la noche a 36°C, y se tiñen mediante prueba de inmunofluorescencia indirecta como se describió anteriormente (Gleaves *et al.*, 1985, J. Clin. Microbiol., 21:29-32)

### Ejemplo 2

#### 15 Extracción de ácido nucleico

Se extraen ácidos nucleicos de un volumen de 0.2 ml de extracto libre de suero de hisopos de especímenes de genital, dérmico, ocular mediante procedimiento IsoQuick (Gleaves *et al.*, 1985, J. Clin. Microbiol., 21:29-32) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La muestra y un volumen igual de amortiguador de lisis se colocan en un tubo micro centrífugo de 1.5 ml. Un volumen de 700  $\mu$  de matriz de extracción y un volumen de 400  $\mu$  de amortiguador de extracción se agregan al tubo, y el tubo se centrifuga durante 5 min a 13,000 rpm (Eppendorf Model 5417C; Fisher; Eden Prairie, MN). La capa acusa superior se coloca en un tubo fresco y se agrega acetato de sodio (1/10 volumen) y 2  $\mu$  de cada uno de glicógeno y alcohol isopropílico. Luego se centrifuga el tubo durante 10 min a 13,000 rpm (Eppendorf Model 5417C). El alcohol se vierte y se agregan 2 volúmenes de 70% de etanol; el tubo se centrifuga durante 5 min a 13,000 rpm (Eppendorf Model 5417C). El etanol se aspira del tubo y el glóbulo se re suspende en 60  $\mu$  de agua libre de RNase.

### 30 Ejemplo 3

#### LightCycler™ utilizando polimerasa de ADN que codifica ácido nucleico del SDV

Los cebadores y sondas que vean a la polimerasa de ADN que codifica el ácido nucleico del HSV se muestran en la tabla 1. Se etiqueta una sonda en el extremo 3' con fluoresceína, aunque la segunda sonda se etiqueta en el extremo 5' con LC™-RED 640. La señal emitida es proporcional a la cantidad de productos PCR específica. Se utilizan diez diluciones de 10 veces de un plásmido que contiene una porción del gen polimerasa ADN de HSV para determinar la sensibilidad del ensayo LightCycler™. 20 copias genómicas del HSV se pueden detectar con el ensayo LightCycler™.

40 TABLA 1

Cebadores y sondas que hibridan a la polimerasa de ADN que codifica ácido nucleico del HSV

Tipo	tamaño de producto (bp)	Frecuencias (5' → 3')	SEQ ID NO:
Cebador	215	gctcgagtgcgaaaaacgttc	1
Cebador	215	cggggcgctcggtaac	2
Sonda (grupo A)		gcgcaccagatccacgcccttgatgagc	3
Sonda (grupo A)		cttgccccgcagatgacgcc	4
Sonda (grupo B)		gtacatcggcgtcatctcggggcaag	5
Sonda (grupo B)		tgctcatcaaggcgtggatctggtgc	6

Para el ensayo, se agrega una alícuota de 5  $\mu$  de ácido nucleico extraído a 15  $\mu$  de mezcla de TCR en cada capilar de reacción. Un control diferente de plantilla recibe 15  $\mu$  de mezcla de reacción con 5  $\mu$  de agua. Se optimiza una mezcla maestra para LightCycler™ y contiene lo siguiente: una concentración de 0.2 mM de cada uno de los trifosfatos de desoxirribonucleósido (50 mM KCl, 10 mM TrisCl [pH 8.3]), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.7 PM de cebadores de polimerasa de ADN, 0.025% de albúmina de suero bovino, 2% de dimetil sulfoxido, 0.2  $\mu$ M de sonda de polimerasa de ADN probada con fluoresceína, 0.2  $\mu$ M de sonda de polimerasa etiquetada 640-LC-Red y 0.03 U de Platinum® Taq (Perkin-Elmer Corp.; Branchburg, NJ) por ml. Y los extractos de espécimen se centrifugan en el capilar para facilitar la mezcla. Todos los capilares se sellan y se corre el programa de polimerasa de ADN del HSV LightCycler™. Las muestras experimentan 45 ciclos de: desnaturalización a aproximadamente 95°C seguida inmediatamente por hibridación de cebador al ácido nucleico plantilla durante aproximadamente 10 segs a aproximadamente 62°C, y elongación de hebras sintetizadas nuevamente a aproximadamente 72°C durante aproximadamente 12 segs. Se procesan un total de 28 especímenes, que incluyen los controles en una única serie.

## Ejemplo 4

*Curva de fusión para análisis del genotipo del HSV*

Se diseñan sondas de hibridación para ser complementarias con el HSV-2, y se detectan diferencias de secuencia entre el SDV-2 y el HSV-1 mediante análisis de curva de fusión. El análisis de curva de fusión se desarrolla luego de amplificación LightCycler™ partiendo a 54°C, la temperatura en la cámara térmica se eleva lentamente a 95°C y se mide y la fluorescencia a intervalos frecuentes. Las diferencias de frecuencia entre las sondas y el producto de amplificación de polimerasa de ADN resultan en cambios en la temperatura de fusión. Las temperaturas de fusión que se detectan (66.7°C para HSV-1 y 74.7°C para HSV-2). El análisis de las curvas de fusión de las sondas y de el producto de amplificación llevo a cabo utilizando el software LightCycler™ suministrado con el instrumento.

## Ejemplo 5

*PCR LightCycler™ utilizando timidina cinasa (TK) que codifica ácido nucleico HSV*

Especímenes que producen PCR-positivos PCR LightCycler™, resultados negativos Shell Vial, se resuelven como muestras positivas reales para ADN de HSV al utilizar cebadores y sondas que hibridan al TK que codifica al ácido nucleico del HSV.

TABLA 2

*Cebadores y sondas que hibridan al TK que codifica el ácido nucleico del HSV*

Tipo	Tamaño de producto (bp)	Frecuencias (5' → 3')	SEQ ID NO:
Cebador	335	cacgctctgcgggttatataga	7
Cebador	335	ttgttatctggcgctmgtcatt	8
Sonda		cgcgcgacgatatcgtctacgtac	9
Sonda		cgagccgatgacttactggcaggtg	10
r=a o g: m=a o c			

Cualquier resultado positivo que utiliza ácido nucleico de polimerasa de ADN como plantilla que permanece cuestionable para infección (por ejemplo, detección FRET a 38 ciclos) se re amplifica utilizando ácido nucleico TK como una plantilla.

La mezcla maestra LightCycler™ para amplificación de la secuencia de ácido nucleico TK contiene lo siguiente 0.2 mM de concentración de cada uno de desoxiribonucleósido trifosfato (50 mM KCl, 10 mM TrisCl [pH 8.3]), 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1.0 de cebadores TK, 0.025% de albúmina de suero bovino, 3% de sulfóxido de dimetilo, 0.2 μM de sonda TK etiquetada con fluoresceína, 0.2 μM de sonda TK etiquetada Rojo 640LC, y 0.03 U de Platinum®Taq (Perkin-Elmer Corp., Branchburg, N.J.) por ml. Cada tubo de reacción recibe 45 μl de mezcla de reacción más 5 μl de plantilla. Un control no plantilla solo recibe 50 μl de mezcla de reacción. Las muestras experimentan 45 ciclos de: desnaturalización a aproximadamente 95°C seguida inmediatamente por hibridación de cebadores para el ácido nucleico de plantilla durante aproximadamente 15 segs a aproximadamente 60°C, y elongación de las hebras nuevamente sintetizadas a aproximadamente 72°C durante aproximadamente 12 segs.

## Ejemplo 6

*Sensibilidades de método*

El HSV se detecta en 88 (44%) de 200 especímenes. Un total de 69 (43%) de 160 especímenes genitales y 18 (47%) de 38 especímenes dérmicos que son positivos para el ADN del HSV. Solo se prueban dos especímenes circulares produciendo un resultado positivo. Un total de 69 especímenes fueron positivos para detección del HSV mediante ensayo LightCycler™ y ensayo Shell Vial. Diecinueve especímenes adicionales se identificaron como HSV positivos por el ensayo LightCycler™ (número total de especímenes positivos, 88). No hubo especímenes para los que el ensayo Shell vial resultara positivo y los resultados LightCycler™ fueron negativos (especificidad, 100%). De los 19 resultados discrepantes (negativo por ensayo Shell vial pero positivo por ensayo LightCycler™), se confirman todos como positivos para ADN del HSV mediante un protocolo LightCycler™ utilizando TK como una plantilla.

## ES 2 344 594 T3

Los especímenes positivos para ambos ensayos Shell vial y LightCycler™ (n=69) se detectan por PCR en un promedio de 26 de ciclos (rango, 18 a 37 ciclos). Especímenes discrepantes (n=19) son positivos después de un promedio de 33 ciclos mediante ensayo LightCycler™ (rango 24 a 40 ciclos). El índice acumulado de detección de 69 especímenes con resultados concordantes alcanza el 100% después de 37 ciclos PCR, pero 81% mediante el ciclo 28, mientras que 19 especímenes con resultados discrepantes requiere 40 ciclos PCR para alcanzar resultados positivos para todas las muestras, y solo 26% de estas muestras se detectan mediante el ciclo 28. Por lo tanto, como se espera, los especímenes positivos para ambos ensayos Shell vial y PCR LightCycler™ aparentemente tienen mayores números de copia de ADN del HSV que aquellos especímenes detectados exclusivamente por el ensayo LightCycler™. Estos resultados se confirman experimentalmente en esa menor disolución de una suspensión de producto PCR producido por ADN plantilla del HSV en un ciclo anterior y en proporción directa a diluciones concentradas 10 veces menor del genoma vírico.

Las ondas diseñadas para detectar polimorfismos de nucleótidos en dos pares base del producto de 215-bp de PCR LightCycler™ identificado correctamente el genotipo (HSV-1 o HSV-2) mediante análisis de curva de fusión de 66 de 69 especímenes, mientras que la diferenciación de anticuerpo monoclonal de los dos genotipos mediante el ensayo Shell vial fue menos exacto. De los 19 especímenes con resultados discrepantes analizados por PCR dirigido al KT del HSV, 14 fueron HSV-2 y 5 fueron HSV-1. El ensayo LightCycler™ da resultados de genotipos concordantes para 18 de 19 especímenes (95%). La curvas de fusión de los cuatro especímenes con resultados discrepantes (HSV-1 o HSV-2) traslapados y no producen patrones distintivos que proporcionan diferenciación visual fácil de dos genotipos.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar la presencia o ausencia del virus herpes simplex (HSV) en una muestra biológica de un individuo, dicho método comprende:

Desarrollar por lo menos una etapa de ciclo, en donde dicha etapa de ciclo comprende una etapa de amplificación y una etapa de hibridación, en donde dicha etapa de amplificación comprende poner en contacto dicha muestra con un par de cebadores de polimerasa del HSV para producir un producto de amplificación de polimerasa de ADN del HSV y una polimerasa de ADN del HSV que codifica la molécula de ácido nucleico está presente en dicha muestra, en donde dicha etapa de hibridación comprende poner en contacto dicho producto de amplificación de polimerasa de ADN del HSV con un par de sondas de polimerasa de ADN del HSV, en donde los miembros de dicho par de sondas de polimerasa de ADN del HSV hibridan dentro de no más de 5 nucleótidos uno del otro,

En donde una primera sonda de polimerasa de ADN del HSV de dicho par de sondas de polimerasa de ADN del HSV se etiqueta con un grupo funcional fluorescente donante y en donde una segunda sonda de polimerasa de ADN del HSV de dicho par de sondas de polimerasa de ADN del HSV se etiqueta con un grupo funcional fluorescente al sector correspondiente, y detectar la presencia o ausencia de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) entre dicho grupo funcional fluorescente donante y dicho grupo funcional fluorescente al sector correspondiente,

En donde la presencia de FRET es indicadora de la presencia del HSV en dicha muestra biológica, y en donde la ausencia de FRET es indicadora de la ausencia del HSV en dicha muestra biológica y en donde dicha primera sonda de polimerasa de ADN del HSV comprende la secuencia 5'-GCG CAC CAG ATC CAC GCC CTT GAT GAG C-3' (SEQ ID NO:3), y en donde dicha segunda sonda de polimerasa de ADN del HSV comprende la secuencia 5'-CTT GCC CCC GCAGAT GAC GCC-3' (SEQ ID NO:4).

2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho par de sondas de polimerasa de ADN del HSV comprenden una primer cebador de polimerasa de ADN del HSV y un segundo cebador de polimerasa de ADN del HSV, en donde dicha primera polimerasa de ADN del HSV comprende la secuencia 5'-GCT CGA GTG CGA AAA AAC GTT C-3' (SEQ ID NO:1), y en donde dicho segundo cebador de polimerasa de ADN del HSV comprende la secuencia 5'-CGG GGC GCT CGG CTA AC-3' (SEQ ID NO:2).

3. El método de la reivindicación 1, en donde los miembros de dicho par de sondas de polimerasa de ADN del HSV hibridan dentro de no más de dos nucleótidos uno del otro.

4. El método de la reivindicación 1, en donde los miembros de dicho par de sondas de polimerasa de ADN del HSV hibridan dentro de no más un nucleótidos uno del otro.

5. El método de la reivindicación 1, en donde dicho grupo funcional fluorescente donante es fluoresceína.

6. El método de la reivindicación 1, en donde dicho grupo funcional fluorescente aceptor se selecciona del grupo que consiste de LC-Red 640, LC-Red705, Cy5, y Cy5.5.

7. El método de la reivindicación 1, en donde dicha etapa de detección comprende excitar dicha muestra biológica a una longitud de onda absorbida mediante dicho grupo funcional fluorescente donante y visualizar y/o medir la longitud de onda emitida por dicho grupo funcional fluorescente aceptor.

8. El método de la reivindicación 1, en donde dicha etapa de detección comprende cuantificar dicho FRET.

9. El método de la reivindicación 1, en donde dicha etapa de detección se desarrolla después de cada etapa de ciclo.

10. El método de la reivindicación 1, en donde dicha etapa de detección se desarrolla en tiempo real.

11. El método de la reivindicación 1, en donde dicho producto de amplificación de polimerasa de ADN del HSV difiere en secuencia entre el HSV-1 y el HSV-2 mediante por lo menos un nucleótido.

12. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente determinar la temperatura de fusión entre una o ambos de dichas sondas de polimerasa de ADN del HSV y dicho producto de amplificación de polimerasa de ADN del HSV, en donde dicha temperatura de fusión confirma dicha presencia o dicha ausencia de dicho HSV.

13. El método de la reivindicación 12, en donde dicha temperatura de fusión distingue entre el HSV-1 y el HSV-2.

14. El método de la reivindicación 1, en donde la presencia de dicho FRET dentro de 10 ciclos es indicador de la presencia de una infección por HSV en dicho individuo.

15. El método de la reivindicación 1, en donde la presencia de dicho FRET dentro de 20 ciclos es indicador de la presencia de una infección por HSV en dicho individuo.



## ES 2 344 594 T3

16. El método de la reivindicación 1, en donde la presencia de dicho FRET dentro de 30 ciclos es indicador de la presencia de una infección por HSV en dicho individuo.

17. El método de la reivindicación 1, en donde la presencia de dicho FRET dentro de 37 ciclos es indicador de la presencia de una infección por HSV en dicho individuo.

18. El método de la reivindicación 1, en donde la ausencia de dicho FRET dentro de 37 ciclos es indicador de la ausencia de una infección por HSV en dicho individuo.

19. El método de la reivindicación 1, en donde la presencia de dicho FRET dentro de 40 ciclos es indicadora de la presencia de una infección por HSV en dicho individuo.

20. El método de la reivindicación 1, en donde la presencia de dicho FRET dentro de 50 ciclos es indicador de la presencia de una infección por HSV en dicho individuo.

21. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente: evitar la amplificación de un ácido nucleico contaminante.

22. El método de la reivindicación 21, en donde dicha prevención comprende desarrollar dicha etapa de amplificación en la presencia de uracilo.

23. El método de la reivindicación 22, en donde dicha prevención comprende adicionalmente tratar dicha muestra biológica con glicosilato de ADN-uracilo antes de una primera etapa de amplificación.

24. El método de la reivindicación 1, en donde dicha muestra biológica se selecciona del grupo que consiste de un isótopo ocular, un espécimen genital un espécimen dérmico, una prueba de Papanicolau, un ácido amniótico y fluido cerebro espinal.

25. El método de la reivindicación 1, en donde dicha etapa de ciclo se desarrolla en una muestra de control.

26. El método de la reivindicación 25, en donde dicha muestra control comprende dicha porción de dicha molécula de ácido nucleico que codifica dicha polimerasa de ADN del HSV.

27. El método de la reivindicación 1, en dicha etapa de ciclo utiliza un par de cebadores de control y par de sondas de control, y en donde dichos cebadores de control y dichas sondas de control son diferentes de dichos cebadores de polimerasa de ADN del HSV y dichas sondas de polimerasa de ADN del HSV, respectivamente, en donde se produce un producto de amplificación de control si la plantilla de control está presente en dicha muestra, en donde dicha sonda de control hibrida a dicho producto de amplificación de control.

28. Un equipo, que comprende:

Un par de cebadores de polimerasa de ADN del HSV,

Un par de sondas de polimerasa de ADN del HSV, y

Un grupo funcional fluorescente donante y un grupo funcional aceptor correspondiente,

En donde dicha primera sonda de polimerasa de ADN del HSV comprende la secuencia 5'-GCG CAC CAG ATC CAC GCC CTTGAT GAG C-3' (SEQ ID NO:3), y en donde dicha segunda sonda de polimerasa de ADN del HSV comprende la secuencia 5'-CTT GCC CCC GCA GAT GAC GCC-3' (SEQ ID NO:4).

29. El equipo de la reivindicación 28, en donde dicho par de cebadores de polimerasa de ADN del HSV comprende un primer cebador de polimerasa de ADN del HSV y un segundo cebador de polimerasa de polimerasa de ADN del HSV, en donde dicho primer cebador de polimerasa de ADN del HSV comprende la secuencia 5'-GCT CGA GTG CGA AAA AAC GTT C-3' (SEQ ID NO:1), y en donde dicho segundo cebador de polimerasa de ADN del HSV comprende la secuencia 5'-CGG GGC GCT CGG CTAAC-3' (SEQ ID NO:2).

30. El equipo de la reivindicación 28, en donde dicho par de sondas de polimerasa de ADN del HSV se etiquetan con dicho grupo funcional fluorescente donante y dicho grupo funcional aceptor correspondiente.

31. El método la reivindicación 1, en donde dicha amplificación en la presencia de una sonda de polimerasa del HSV emplea una enzima de polimerasa que tiene actividad exonucleasa 5' a 3'.

32. El método la reivindicación 31, en donde dichos grupos funcionales fluorescentes aceptores y a donantes están entre no más de 5 nucleótidos uno del otro en dicha sonda.

33. El método la reivindicación 32, en donde dicho grupo funcional fluorescente aceptor es un extinguidor.