



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 338 853**

② Número de solicitud: 200803220

⑤ Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **11.11.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **12.05.2010**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**12.05.2010**

⑰ Solicitante/s: **Instituto de Salud Carlos III  
c/ Sinesio Delgado, 6  
28029 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Fogeda Moreno, Marta;  
Echevarría Mayo, José Manuel;  
Avellón Calvo, Ana y  
Pozo Sánchez, Francisco**

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉔ Título: **Método y kit para la detección del virus de la hepatitis E (VHE).**

㉖ Resumen:

Método y kit para la detección del virus de la hepatitis E (VHE).

En la presente invención se describe una combinación de cebadores y un método para la detección molecular de las diferentes cepas circulantes del virus de la hepatitis E (VHE) en humanos y reservorios animales distribuidas geográficamente por todo el mundo. La amplificación del genoma del VHE se realiza mediante RT-PCRs anidadas donde los cebadores empleados amplifican dos fragmentos de las regiones ORF1 (Open Reading Frame) y ORF2 del genoma de este virus. Además, la presente invención incluye un kit con la combinación de los cebadores mencionados y otros componentes.

ES 2 338 853 A1

## DESCRIPCIÓN

Método y kit para la detección del virus de la hepatitis E (VHE).

5 En la presente invención se describe una combinación de cebadores y un método para la detección molecular de las diferentes cepas circulantes del virus de la hepatitis E (VHE) en humanos y reservorios animales distribuidas geográficamente por todo el mundo. La amplificación del genoma del VHE se realiza mediante RT-PCRs anidadas donde los cebadores empleados amplifican dos fragmentos de las regiones ORF1 (*Open Reading Frame*) y ORF2 del genoma de este virus. Además, la presente invención incluye un kit con la combinación de los cebadores mencionados y otros componentes.

### Estado de la técnica anterior

15 La hepatitis E es una enfermedad causada por el virus VHE. Este virus no se ha podido reconocer específicamente hasta fechas recientes. Aún cuando se trate, realmente, de un virus que estuvo en el pasado muy bien asentado en las poblaciones humanas del Viejo Mundo, lo cierto es que el VHE es hoy en día un agente que sólo circula en forma significativa en las regiones económicamente más deprimidas, en las que constituye una causa frecuente de brotes epidémicos de hepatitis vírica aguda. La infección por el VHE es endémica en el centro y sudeste de Asia, y ha causado epidemias en Oriente Próximo, en el norte y oeste de África, y en México. La vía de transmisión fecal-oral es la predominante, y la mayoría de las epidemias conocidas se han relacionado con el consumo de aguas contaminadas con materia fecal (Ippagunta *et al.* (2007) *J. Med. Virol.* 79(12): 1827-31). La mortalidad general es baja, pero aumenta muy significativamente en las mujeres embarazadas.

25 A día de hoy, puede postularse que, en la Europa occidental, el VHE es un agente zoonótico que circula en algunas especies de animales de granja, y que se transmite al ser humano con una frecuencia difícil de precisar y por efecto de circunstancias aún poco conocidas.

30 Las pruebas de laboratorio utilizadas para el diagnóstico de la infección por el VHE incluyen la inmunomicroscopía electrónica (IME), los ensayos serológicos para la identificación de anti-VHE de las clases IgM e IgG, y las técnicas moleculares para detección del ARN viral en heces y en suero.

La IME permite detectar partículas virales directamente en las heces del paciente infectado. Esta técnica es muy específica, pero es costosa, laboriosa y poco sensible, por lo que no se utiliza con fines de diagnóstico.

35 El desarrollo de pruebas serológicas sensibles para la detección de anti-VHE ha permitido un análisis más completo de la epidemiología de esta infección a escala mundial. El diagnóstico serológico de la infección aguda se realiza por detección de IgM específica mediante enzimoimmunoanálisis (EIA), que puede confirmarse mediante inmunoblot recombinante (IBR). Los estudios de prevalencia se llevan a cabo mediante la detección de anti-VHE de la clase IgG, que se realiza, también, mediante EIA con confirmación por IBR.

40 Con todo, el grado de concordancia entre los resultados que se obtienen por diferentes pruebas para detección de anti-VHE sobre un mismo grupo de muestras es bajo (Mast *et al.* (1997) *J. Infect. Dis.* 176(1): 34-40), y no está claro hasta qué punto las reactividades que se obtienen en las pruebas de EIA en las áreas no endémicas reflejan la presencia real de anticuerpos frente al virus. La reciente disponibilidad de métodos de IBR introduce un valioso instrumento de confirmación, y su uso ha demostrado ya que parte de las reactividades que se registran por EIA no son específicas.

45 La infección aguda por VHE puede también diagnosticarse mediante detección del ARN viral en heces y suero mediante procedimientos de amplificación genómica (patentes WO9919732, WO2001046696, JP2005102689 y CN1300771). Estas pruebas rinden resultados positivos entre 6 y 40 días, en este tipo de muestras, después de la exposición al virus, algunos días antes de que se observe la elevación de los niveles séricos de transaminasas y la aparición de los anticuerpos específicos. En ocasiones, estas técnicas de diagnóstico molecular rinden resultados positivos en casos que no se detectan mediante las de diagnóstico serológico, lo que abre la posibilidad de que estas últimas puedan no ser adecuadas para detectar infecciones por ciertas variantes del VHE. Por último, las técnicas de amplificación genómica facilitan, además del diagnóstico etiológico, un material útil para obtener otra información que la serología no puede facilitar, como es la identificación del genotipo viral involucrado en la infección y la posibilidad de realizar estudios filogenéticos que comparen entre sí las cepas procedentes de casos distintos.

En los virus cuyo material genético es ARN (como es el caso del VHE), los genomas se replican con una tasa de error varios órdenes de magnitud superior a la del ADN celular.

60 En la presente invención, a la hora de diseñar los cebadores degenerados para llevar a cabo la amplificación genómica, se han tenido en cuenta la gran variabilidad de cepas existentes en todo el mundo descritas desde 1987 hasta la fecha actual, incluyendo cepas representantes de los 4 genotipos descritos en humanos y animales, así como cepas de distinta procedencia geográfica para cada uno de ellos.

65 Esta es una importante diferencia con respecto a otros métodos que pudieran utilizar cebadores similares a los de la presente invención, ya que utilizar cebadores diseñados a partir de tan pocas secuencias, y sobre todo no actualizadas,

hace muy probable que algunas de las nuevas variantes que se generan a lo largo del tiempo puedan no ser detectadas con los métodos descritos hasta hoy.

### Explicación de la invención

5

En la presente invención se describe una combinación de cebadores y un método para la detección molecular de las diferentes cepas circulantes del virus de la hepatitis E (VHE) en humanos y reservorios animales distribuidas geográficamente por todo el mundo. La amplificación del genoma del VHE se realiza mediante RT-PCRs anidadas donde los cebadores empleados amplifican dos fragmentos de las regiones ORF1 (*Open Reading Frame*) y ORF2 del genoma de este virus. El diseño de los cebadores se ha basado en la creación de unos cebadores degenerados de las regiones ORF1/ORF2 del genoma del VHE. En el diseño de los cebadores se han tenido en cuenta las diferentes cepas circulantes del VHE descritas desde 1987 hasta la fecha actual, tanto en humanos como en los distintos reservorios animales detectados. Para ello se ha realizado un exhaustivo análisis de las secuencias depositadas en la base de datos de GenBank, identificando zonas conservadas en la ORF2 y zonas variables dentro de la región ORF1 que permiten una caracterización genotípica de la cepa de VHE detectada.

15

Por tanto, en el diseño de los cebadores se ha tenido en cuenta la gran variabilidad de cepas existentes en todo el mundo. Se han incluido cepas representantes de los 4 genotipos descritos en humanos, así como cepas de distinta procedencia geográfica para cada uno de ellos. En los virus cuyo material genético es ARN, los genomas se replican con una tasa de error varios órdenes de magnitud superior a la del ADN celular, lo que otorga a las poblaciones de estos agentes una elevada diversidad genética. Por otro lado, es importante señalar que las velocidades de evolución medidas en distintos virus de ARN están en el intervalo  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  sustituciones acumuladas en el ARN genómico por nucleótido y año. Esto es muy importante, ya que utilizar cebadores diseñados a partir de tan pocas secuencias, y sobre todo no actualizadas, hace muy probable que algunas de las nuevas variantes que se generan a lo largo del tiempo puedan no ser detectadas con los métodos descritos hasta hoy.

25

La presente invención permite por tanto, determinar la prevalencia del virus VHE en una muestra representativa de la población general, determinar el espectro clínico de la infección aguda en pacientes de entornos rurales y de zonas urbanas, evaluar el rendimiento del diagnóstico serológico y el diagnóstico molecular en la identificación de dichos casos, estudiar la presencia del VHE en granjas de ganado porcino y en muestras ambientales y obtener secuencias de todos los fragmentos y realizar estudios destinados a valorar sus relaciones filogenéticas.

30

Así pues, un primer aspecto de la presente invención es el uso de los cebadores directos SEQ ID NO: 1, SEO ID NO: 3, SEO ID NO: 5 y SEO ID NO: 7 y los cebadores reversos SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 8 para detectar el virus de la hepatitis E (VHE) en una muestra biológica aislada.

35

Un cebador es una secuencia de un oligonucleótido específico complementario a una secuencia nucleotídica diana que es capaz de hibridar con la secuencia nucleotídica diana y servir como punto de iniciación para una polimerización nucleotídica catalizada por ARN polimerasa, ADN polimerasa o transcriptasa reversa.

40

Para amplificar un fragmento por PCR, son necesarios dos cebadores, uno de ellos se unirá a la hebra molde (cebador directo) y el otro a la hebra complementaria (cebador reverso), en una posición que permita obtener, mediante sucesivas amplificaciones con una enzima ARN/ADN polimerasa termorresistente, un fragmento que pueda ser detectado y/o cuantificado. Un paso previo puede ser la retrotranscripción de la secuencia situada aguas arriba del cebador reverso mediante el empleo de una enzima retrotranscriptasa.

45

Los cebadores que forman parte de los usos descritos, han sido diseñados siguiendo criterios que se detallan en los ejemplos. En primer lugar se eligieron todas las cepas del virus descritas desde 1987 hasta la fecha actual. Después se seleccionaron las regiones del genoma viral que permitía la amplificación en todos los tipos de virus conocidos. Las dos regiones seleccionadas fueron la ORF1 y la ORF2 del genoma del VHE. La ORF1 codifica para las proteínas no estructurales de este virus (la metiltransferasa, la ARN polimerasa, la proteasa y la ARN helicasa), los cebadores de la presente invención están diseñados dentro de la región metiltransferasa, lo que permite la construcción de árboles filogenéticos robustos con la identificación del genotipo viral involucrado en la infección. La región ORF2 codifica para la proteína de la cápsida viral, la cual juega un papel muy importante en la evasión del sistema inmune y en la formación del virión. Para la elección de las zonas diana en la amplificación, se realizó un exhaustivo análisis de todo el genoma de este agente viral (7200 pares de bases), buscando siempre una zona altamente conservada como para cubrir todas las variantes naturales del agente (ORF2) y una zona conservada pero lo suficientemente variable (ORF1) que permitiera a su vez caracterizar genotípicamente las cepas circulantes. Las secuencias de los cebadores tienen nucleótidos degenerados en posiciones específicas que permiten detectar las diferentes cepas circulantes de VHE en humanos y reservorios animales distribuidas geográficamente por todo el mundo. En este primer aspecto de la invención podrían usarse cebadores con degeneraciones en otros sitios nucleotídicos diferentes de forma que hibridasen en la misma secuencia nucleotídica a los cebadores propuestos en la presente invención u otra distinta dentro de los ORF descritos en la presente invención, que permitiese amplificar fragmentos del ADN del VHE.

50

El VHE es un virus ARN de simetría icosaédrica, no envuelto y de, aproximadamente, 32-34 nm de diámetro. Ese genoma es un ARN monocatenario de polaridad positiva, con un tamaño de 7,2 kb. El VHE ha sido clasificado dentro de la familia *Hepeviridae*, según el último informe del Comité Internacional de Taxonomía Viral (2004), y es el único miembro del género *Hepevirus*.

65

## ES 2 338 853 A1

Mediante estos cebadores es posible detectar cepas del virus VHE que pertenecen a cualquiera de los cuatro genotipos conocidos: el genotipo 1 se subdivide en cinco subtipos e incluye cepas epidémicas características de algunas regiones endémicas, como la cepa prototipo aislada en Birmania y las cepas relacionadas de África y de otras regiones de Asia. El genotipo 2 presenta dos subtipos, e incluye el prototipo aislado en México y varias cepas detectadas de Nigeria. El genotipo 3 se subdivide en diez subtipos, presenta una distribución geográfica amplia, e incluye cepas de procedencia humana o porcina aisladas de casos autóctonos en Europa, EE.UU, Argentina y Nueva Zelanda. Por último, el genotipo 4 se subdivide en siete subtipos, e incluye cepas que proceden, sobretodo, de Extremo Oriente.

Mediante los cebadores de la presente invención es posible detectar el VHE en zonas endémicas como centro y sudeste de Asia, norte y oeste de África y en México. En los países no endémicos como España, se pueden usar para identificar aquellos casos no filiados (de origen desconocido) y poder caracterizar la procedencia de la cepa causante de la infección, es decir, saber si es importada o autóctona.

Este uso facilita, además del diagnóstico etiológico, un material útil para obtener otra información que la serología no puede facilitar, como es el genotipo viral involucrado en la infección y la posibilidad de realizar estudios filogenéticos que comparen entre sí las cepas procedentes de casos distintos.

Además, la presente invención permite la caracterización molecular de las cepas circulantes, ayudando en la investigación de los brotes epidémicos producidos por este virus. Estos cebadores pueden, por tanto, utilizarse en el estudio de patologías hepáticas de etiología desconocida (hepatitis agudas no filiadas), en estudios epidemiológicos, y en el terreno de la sanidad animal.

Otro aspecto de la presente invención es un método para la detección del virus de la hepatitis E (VHE) que comprende:

- a. obtener una muestra biológica y aislar sus ácidos nucleicos,
- b. amplificar de forma simultánea dos fragmentos de las regiones ORF1 y ORF2 del ácido nucleico del apartado (a) por medio del par de cebadores SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2 y del par de cebadores SEQ ID NO: 5/SEQ ID NO: 6,
- c. amplificar de forma simultánea dos fragmentos internos de los fragmentos obtenidos en el apartado (b) por medio del par de cebadores SEQ ID NO: 3/SEQ ID NO: 4 y del par de cebadores SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 8
- d. determinar la desviación de los apartados (b) y (c) con respecto a los controles.

La muestra biológica es aislada del cuerpo del mamífero para llevar a cabo el resto de pasos del método *in vitro*. La muestra puede proceder de un fluido fisiológico como sangre, plasma, suero, orina, muestras fecales y/o cualquier tejido celular procedente de un organismo. Preferentemente la muestra es suero o heces.

Para llevar a cabo la detección del virus VHE según se describe en el apartado (b) del método, se llevan a cabo amplificaciones que comprenden, al menos, la retrotranscripción del fragmento correspondiente del ARN del VHE seguida de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es decir, una RT-PCR. Así pues, también puede llevarse a cabo una RT-PCR cuantitativa o en tiempo real, o cualquier otra técnica en la que se requiera la combinación de cebadores descritos para llevar a cabo la amplificación.

El primer paso consiste en amplificar dos fragmentos de forma simultánea utilizando los pares de cebadores SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2 (cebador directo/cebador reverso) y SEQ ID NO: 5/SEQ ID NO: 6 (cebador directo/cebador reverso). En primer lugar se sintetiza una secuencia de ADN codificante (cDNA) de la región aguas arriba del lugar de hibridación del cebador reverso con el ARN mediante la reacción de retrotranscripción (RT). La síntesis de cDNA se realiza por medio de cualquier enzima (retrotranscriptasa; RT o transcriptasa reversa) que utiliza el ARN aislado de la muestra biológica y los cebadores reversos SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 6, que harán de iniciadores para obtener el cDNA de cadena simple o monocatenario complementario a la secuencia de ARN del virus VHE. El segundo lugar se obtienen fragmentos de ADN bicatenarios amplificados mediante PCR (de las siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) utilizando como molde el cDNA descrito y los pares de cebadores SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 5/SEQ ID NO: 6. Esta PCR se denomina RT-PCR. Para la síntesis del cDNA y las posteriores amplificaciones es necesaria la presencia de nucleótidos dNTPs, es decir, dATP, dTTP, dCTP y dGTP, ADN polimerasa termorresistente, cloruro de magnesio en una concentración determinada así como tampones que creen las condiciones físico-químicas adecuadas para el funcionamiento de todos los componentes y se consiga con ello la amplificación (ver ejemplos). De esta forma se obtiene una mezcla de reacción que contiene los fragmentos amplificados de las ORF1 y ORF2 (si la muestra contiene virus VHE) y sirve de molde para la segunda amplificación.

En el segundo paso, descrito en el apartado (c) del método, el ADN molde empleado es el producto de la reacción de PCR obtenido en el primer paso de la amplificación (apartado (b) del método). En este paso se emplean los pares de cebadores SEQ ID NO: 3/SEQ ID NO: 4 (cebador directo/cebador reverso) y SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 8

## ES 2 338 853 A1

(cebador directo/cebador reverso). Con estos cebadores se amplifican dos subfragmentos tomando como molde los dos fragmentos amplificados en la primera reacción de PCR. El par de cebadores SEQ ID NO: 3/SEQ ID NO: 4 amplifica un subfragmento del fragmento de ORF1 de un tamaño de 171 pares de bases, y SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 8 amplifica un subfragmento del fragmento del ORF2 de 220 pares de bases. Este tipo de PCR se conoce con el término PCR anidada donde el producto de una amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación con cebadores que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada.

Para determinar la detección del virus VHE es necesario medir la desviación de los apartados (b) y (c) con respecto a un control. En este caso, los controles son aquellas amplificaciones que proceden tanto de muestras en las que el virus del VHE se encuentra ausente (control negativo) como de muestras en las que se encuentra presente de forma certera (control positivo). La medida de la desviación de las amplificaciones obtenidas de las muestras problema respecto de los controles, puede llevarse a cabo mediante comparación de presencia o ausencia de bandas, así como también la medida de la intensidad de banda o la medida de la expresión puede llevarse a cabo mediante PCR en tiempo real o cuantitativa. Esta desviación puede ser atribuida a la presencia o ausencia del virus VHE en las muestras analizadas.

En una realización preferida del método, la muestra biológica aislada se obtiene de un mamífero. El mamífero se selecciona de la lista que comprende humanos o no humanos. Los mamíferos no humanos se seleccionan de la lista que comprende cerdo, jabalí, mangosta o primate.

Se ha demostrado que el virus VHE es transmitido no sólo por el agua (contaminada por las heces de estos animales) sino también por el consumo de alimentos contaminados con este agente viral. Por otra parte, puede tener un especial interés la realización de estudios epidemiológicos y/o estudios de experimentación básica en otros animales no domésticos como la mangosta o los primates como posibles reservorios zoonóticos del VHE.

En España, los estudios realizados en las granjas de ganado porcino muestran que el VHE está presente en la gran mayoría de ellas, que su prevalencia es muy elevada, y que la mayoría de los cerdos adquieren la infección dentro de los dos primeros meses de vida.

Además de haberse detectado el virus VHE en las granjas españolas de ganado porcino, se ha encontrado también en aguas residuales procedentes de entornos urbanos. Por otra parte, en esta clase de virus es frecuente la aparición de variantes virales con capacidad de cruzar la barrera entre especies e infectar nuevos hospedadores a los que pueden causar enfermedades.

Todo lo expuesto anteriormente tiene importantes implicaciones no sólo en la Salud Pública, sino también en la Salud Veterinaria. Por tanto, la detección de VHE en estos animales portadores del virus tiene una aplicación clara en la prevención de la infección tanto de animales como de humanos.

En otra realización preferida, el método incluye un control interno para evaluar la presencia de inhibidores de amplificación. Este control consiste en un ADN basado en la secuencia de un plásmido de secuencia conocida. Además, se incluyen los cebadores para la amplificación de un fragmento que permita comprobar, mediante las condiciones de amplificación descritas anteriormente, que la reacción de amplificación no ha sido inhibida. Preferiblemente los cebadores SEQ ID NO: 9 (Cebador directo. Cebador RTS para ADN quimérico) y SEQ ID NO: 10 (Cebador reverso. Cebador RTA para ADN quimérico) para la primera amplificación por PCR, SEQ ID NO: 11 (Cebador directo. Cebador NS3 para ADN quimérico) y SEQ ID NO: 12 (Cebador reverso. Cebador NA2 para ADN quimérico) para la segunda amplificación por PCR.

Otra realización preferida es el método que además permite determinar el genotipo del virus VHE mediante la RT-PCR anidada de la región ORF1. En este caso, para determinar el genotipo de la cepa de VHE detectada se procede con la secuenciación de los fragmentos amplificados mediante la RT-PCR anidada tal como se ha descrito en la presente invención, de la región ORF1. Las secuencias obtenidas pueden ser asignadas a un genotipo determinado mediante su comparación con las secuencias del VHE de las bases de datos disponibles.

Otra realización preferida más es el método descrito en los párrafos precedentes como herramienta para la monitorización de la evolución de la infección por el VHE, donde se realizan tomas de muestras seriales de mamíferos afectados. El análisis de la presencia o ausencia de los fragmentos esperados o del ascenso o del descenso de la cuantificación del ADN amplificado permite evaluar si la respuesta al tratamiento es negativa o positiva.

El procedimiento de monitorización comprende una serie de pasos que comienzan por la toma de muestras seriales. Se entiende por toma de muestras seriales a la extracción de las muestras biológicas mencionadas en la presente invención. La toma de muestras se realiza a diferentes tiempos desde que se administra el tratamiento, de forma que la amplificación de los fragmentos de los ORF1 y ORF2 del virus VHE en cada una de las muestras procedentes del mismo paciente, indican la eficacia del mismo. Así pues, una disminución de la desviación de los valores de amplificación respecto de un control, representado éste último, por ejemplo, por valores de amplificación en un mismo individuo, previos al tratamiento, supone que el tratamiento está surtiendo efecto en el sentido de disminuir la cantidad de virus VHE causantes de la hepatitis E. Este ejemplo no se limitaría únicamente al uso de este tipo de control.

## ES 2 338 853 A1

Otro aspecto de la presente invención es un kit para determinar el genotipo del VHE en una muestra biológica aislada mediante RT-PCR anidada de la región ORF1 que comprende, al menos, los cebadores SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3/SEQ ID NO: 4.

5 Mediante este kit se obtienen fragmentos de la región ORF1 amplificados mediante RT-PCR anidada que, tras ser secuenciados permiten la determinación del genotipo de VHE detectado, tal como se ha descrito en un párrafo precedente.

10 Otro aspecto más de la presente invención es un kit para la detección del virus VHE en una muestra biológica aislada mediante RT-PCR anidada que comprende, al menos, los cebadores directos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 7 y los cebadores reversos SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 8.

15 En este kit, podría usarse una combinación de cebadores con degeneraciones en otros sitios nucleotídicos diferentes de forma que los cebadores hibridasen en la misma secuencia nucleotídica u otra distinta dentro de los ORF descritos en la presente invención que permitiese amplificar fragmentos del ARN del VHE.

20 Además de los aspectos anteriores descritos, el kit podría incluir los reactivos necesarios para la amplificación por RT-PCR, ADN polimerasa, retrotranscriptasa, nucleótidos, u otros componentes. También podría incluir instrucciones para llevar a cabo la amplificación por medio de las condiciones adecuadas; temperatura de alineamiento, hibridación, elongación, número de ciclos de amplificación, etc.

25 Según una realización preferida, el kit para la detección del virus VHE se emplea para la monitorización de la respuesta a un tratamiento de hepatitis E, tal como se describe en un párrafo anterior.

30 En otra realización preferida, los kits anteriores comprenden además un control interno necesario para evaluar la presencia de inhibidores de amplificación. Este control consiste en un ADN basado en la secuencia de un plásmido de secuencia conocida. Además, se incluyen los cebadores para la amplificación de un fragmento que permita comprobar, mediante las condiciones de amplificación descritas anteriormente, que la reacción de amplificación no ha sido inhibida. Preferiblemente los cebadores SEQ ID NO: 9 (directo) y SEQ ID NO: 10 (reverso) para la primera amplificación por PCR, SEQ ID NO: 11 (directo) y SEQ ID NO: 12 (reverso) para la segunda amplificación por PCR.

35 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### 40 Descripción de las figuras

Fig 1. Muestra los resultados de la sensibilidad de las PCRs anidadas para las regiones ORF1 y ORF2 del VHE.

45 A) ORF1: banda de 171 pares de bases. B) ORF2: banda de 220 pb. Diluciones seriadas de 10 en 10 de la cepa de referencia del VHE SAR-55 (genotipo 1,  $10^{4.5}$  PID50/ml).

50 Fig. 2. Muestra los resultados obtenidos del análisis filogenético realizado con 13 secuencias obtenidas de los productos de PCR de la región ORF1.

El árbol filogenético fue construido con las secuencias obtenidas de los productos de amplificación de la región ORF1 del VHE (nucleótidos 26-197) junto con las secuencias depositadas en el GeneBank del mismo fragmento viral, de los genotipos 1, 2, 3 y 4.

55 Fig 3. Muestra los resultados de la especificidad del método.

60 A) ORF1 y B) ORF2. CN: control negativo; C+: control positivo de ORF1 para VHE (171 pares de bases); y control positivo de ORF2 para VHE (220 pb). CI: control interno (350 pb).

Panel de muestras testadas:

65 A: suero VHC positivo  
B: suero VHC positivo  
C: suero VHC positivo

*D:* suero VHC positivo

*E:* suero VHB positivo

5 *F:* suero VHB positivo

*G:* suero VHB positivo

10 *H:* suero VHB positivo

*I:* suero VHC positivo

*J:* suero VHB positivo

15 VHC: virus C de la hepatitis

VHB: virus B de la hepatitis.

20

### Ejemplos

A continuación se ilustra la invención mediante ejemplos que describen el diseño de los cebadores de la invención y el método para la detección de los diferentes genotipos del VHE.

25

#### Ejemplo 1

##### *Diseño de los cebadores de la invención*

30

##### *1.1. Elección de las cepas circulantes del VHE que se incluyen en el diseño de los cebadores*

Se incluyeron las diferentes cepas del VHE descritas desde 1987 hasta la fecha actual, detectadas tanto en humanos como en los distintos reservorios animales, pudiendo causar estas últimas, casos de zoonosis clínicamente indistinguibles.

35

##### *1.2. Selección de las regiones del genoma viral*

40

Tras un exhaustivo análisis del genoma del VHE, mediante el uso de programas informáticos de libre distribución, se eligieron dos regiones (ORF1/ORF2). La región ORF1 codifica la poliproteína no estructural, y permite la caracterización genotípica de la cepa de VHE detectada y la región ORF2, que codifica la proteína estructural, confirma la detección microbiológica de este patógeno.

45

##### *1.3. Secuencias de los cebadores*

50

Cada una de las regiones elegidas se analizó, posteriormente, con programas informáticos adicionales, localizando zonas de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud, cuya eficacia como cebadores para la amplificación fue estimada también empíricamente. En el diseño de los cebadores se degeneraron nucleótidos en posiciones específicas (en algunos casos, más de un nucleótido en una determinada posición). Estas degeneraciones nos permiten identificar las diferentes cepas circulantes de VHE en humanos y reservorios animales distribuidas geográficamente por todo el mundo. En todos los casos, la especificidad en cada una de las regiones identificadas como válidas para cebadores fue comprobada adicionalmente mediante comparación con bases de datos de secuencias de acceso público (GenBank) mediante software de acceso público (Blast).

55

60

Además, en la mezcla de reacción se incluyó un control interno que consiste en un ADN quimérico basado en la secuencia de un plásmido (Pozo F *et al.*, (2007) *J Clin Virol* 40: 224-228). así como los cebadores necesarios para la amplificación de un fragmento de 350 pares de bases, lo que nos proporciona un control de calidad para evaluar la presencia de inhibidores de amplificación en cada una de las muestras que se ensayen. Los cebadores para amplificar el control interno son los siguientes: SEQ ID NO: 9 (directo) y SEQ ID NO: 10 (reverso) para la primera amplificación por PCR, SEQ ID NO: 11 (directo) y SEQ ID NO: 12 (reverso) para la segunda amplificación por PCR.

65

## Ejemplo 2

*Muestras clínicas*

5 En la presente investigación, se realizó un estudio retrospectivo con las muestras de suero de 14 pacientes seleccionados de otro trabajo realizado anteriormente (Echevarría, (2006) *Med Clin* 126(6):234-6). Por un lado, estas muestras fueron previamente seleccionadas de un total de 129 muestras que se habían recibido en el laboratorio de hepatitis del Centro Nacional de Microbiología para ser diagnosticadas por VHE entre Enero del 2000 y Diciembre del 2004. Las 14 muestras analizadas presentaron anticuerpos IgG mediante enzimoimmunoanálisis (EIA) y seis de ellas mostraron anticuerpos IgM mediante inmunoblot recombinante (RIBA). Por otra parte, en estas 14 muestras analizadas, se incluyeron prospectivamente también, las muestras recibidas entre enero del 2007 a junio del 2008 para ser diagnosticadas por VHE, de un total de 81 muestras que llegaron en ese periodo de tiempo. En total 95 muestras de suero fueron incluidas en la investigación. En todas las muestras se estudió la presencia del ARN del VHE, como se describe más adelante.

15 Todos los pacientes en el momento de su ingreso presentaban síntomas y signos de hepatitis aguda cuando fueron atendidos en sus correspondientes hospitales. Otras posibles causas de daño hepático fueron descartadas en estos pacientes (intoxicación hepática por medicamentos, hepatitis autoinmune, infección por otros virus hepáticos A, B y C, infección por citomegalovirus e infección por Epstein-Barr).

## Ejemplo 3

*Detección de ARN-VHE*

25 Se desarrolló un nuevo diseño de cebadores para ser usados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el objeto de detectar el genoma del VHE. El objetivo de este nuevo diseño es poder detectar todas las nuevas variantes circulantes del VHE tanto en humanos como en los distintos reservorios animales detectados. Para lograr este objetivo se realizó un alineamiento de un total de 76 secuencias completas del genoma del VHE depositadas en el GenBank, tanto de humanos como de animales. El diseño del método se basó en la creación de unos cebadores degenerados de las regiones ORF1/ORF2 del genoma del VHE. La secuencia de nucleótidos de los cebadores se muestra en la Tabla 1. Para ello se llevó a cabo un exhaustivo análisis de las secuencias, identificando zonas conservadas en la ORF2 y zonas variables en ORF1 que permiten una caracterización genotípica de la cepa de VHE detectada. La composición de la mezcla de reacción, y la concentración relativa de los cebadores utilizados en la fase de amplificación, se han optimizado mediante ensayos experimentales hasta obtener los mejores parámetros de sensibilidad/especificidad.

35 El ARN del VHE fue extraído de un total de 100  $\mu$ l de suero con el extractor automático MagNA Pure (ROCHE, Mannheim, Germany). El ARN obtenido fue resuspendido en un buffer de elución a volumen final de 50  $\mu$ l y posteriormente guardado a -80°C hasta su utilización. La RT-PCR fue realizada con 5  $\mu$ l de extracto de ARN en un volumen final de 50  $\mu$ l. La mezcla de la reacción contiene 25  $\mu$ l de Master Mix (*Taq polymerase*: 50 U/ml; dNTPs: 400  $\mu$ M; MgCl<sub>2</sub>: 3 mM; Promega, Co., Madison, Wisconsin, USA), 1  $\mu$ l de la enzima AMV *Reverse Transcriptase* (Promega Co.), y 50 pmol de cada cebador. La reacción de PCR consiste en 39 ciclos de desnaturalización a 94°C por 35 seg, anillamiento a 51°C por 45 seg (ORF1 test), y a 48°C por 45 seg (ORF2 test), y una extensión a 72°C por 1 min, con una elongación final a 72°C por 7 min. La amplificación de la 2ª ronda de PCR (nested-PCR) fue realizado con 2  $\mu$ l de producto de PCR de la primera ronda de amplificación, y consistía en 29 ciclos de desnaturalización a 94°C por 35 seg, anillamiento a 48°C por 45 seg (ORF1 test), y a 50°C por 45 seg (ORF2 test), extensión a 72°C por 1 min, con una incubación final a 72°C por 7 min y 50 pmol de cada cebador.

50 La sensibilidad analítica de los ensayos de PCRs anidadas para ORF1 y ORF2 fueron calculadas con la cepa prototipo Sar-55 (Tsarev, 1992), la cual contenía un título infeccioso conocido de 10<sup>4.5</sup> dosis infecciosas en mono (PID50) por ml (proporcionado por el Dr. R Purcell, CDC, Atlanta, Georgia, USA) (Fig 1). Con esta cepa se realizaron diluciones seriadas en base de 10 en un buffer salino-fosfato. El ARN extraído de cada una de esas diluciones fue testado para cada ensayo. Además, se analizó la especificidad del método utilizando muestras de sueros de pacientes infectados con otros tipos de virus de hepatitis, el VHC y VHB, demostrando la amplificación de una banda de tamaño esperando solamente en aquellos controles positivos para VHE y no para el resto de muestras, tanto para la ORF1 como para la ORF2 (Fig 3).

60

65



# ES 2 338 853 A1

TABLA 1

*Cebadores degenerados empleados para la amplificación por RT-PCR anidada*

5

10

15

20

25

30

Cebador	Región	Sentido Amplificación	Secuencia	Posición en el genoma*
ORF1F	<b>ORF1</b>	Directo 1ªPCR	SEQ ID NO: 1	9-29
ORF1R	---	Reverso 1ªPCR	SEQ ID NO: 2	627-643
ORF1FN	---	Directo 2ªPCR	SEQ ID NO: 3	26-44
ORF1RN	---	Reverso 2ªPCR	SEQ ID NO: 4	178-197
ORF2F	<b>ORF2</b>	Directo 1ªPCR	SEQ ID NO: 5	6265-6285
ORF2R	---	Reverso 1ªPCR	SEQ ID NO: 6	7069-7085
ORF2FN	---	Directo 2ªPCR	SEQ ID NO: 7	6314-6331
ORF2RN	---	Reverso 2ªPCR	SEQ ID NO: 8	6515-6534

\* La posición de los nucleótidos está numerada de acuerdo con la cepa del virus de Méjico. La secuencia SEQ ID NO: 4 contiene un nucleótido n que es una Inosina.

Ejemplo 4

35 *Genotipado de VHE*

Los productos de PCR positivos de la amplificación de la región ORF1 del VHE fueron secuenciados. Se secuenciaron de forma directa ambas cadenas con el kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), usando el secuenciador ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas se ensamblaron con el programa SeqMan Lasergene 7.0. Para el alineamiento de las secuencias se usó el programa Clustal X método de BioEdit 7.0.9. El árbol filogenético (Fig 2) fue realizado con el MEGA versión.4.0 program (Tamura K *et al.*, (2007) *Mol Biol Evol* 24: 1596-9), y las distancias con el método *Neighbor-Joining* (N-J) Kimura 2-parámetros con 1.000 réplicas.

En resumen, en la presente invención se ha desarrollado un nuevo método para la detección del virus de la hepatitis E (VHE), probándose en 95 muestras de suero correspondientes a pacientes que presentaban cuadros clínicos de hepatitis aguda no A-C (Tabla 2). Esta metodología permitió identificar 13 casos de hepatitis aguda producida por este agente viral, de un total de 95 muestras testadas.

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

TABLA 2

*Genotipos y marcadores de infección por VHE, identificados en las muestras de pacientes españoles con hepatitis aguda no-A-C*

Caso	Provincia	Origen	Año	Viaje	Anti-HEV IgG	Anti-HEV IgM	PCR ORF1	PCR ORF 2	HEV genotipo
1	Ceuta	Africa	2000	? <sup>b</sup>	Pos	Pos	Neg	Neg	Nd
2	Ceuta <sup>a</sup>	Africa <sup>b</sup>	2001	? <sup>b</sup>	Pos	Pos	Pos	Pos	1
3	Huelva	Local	2001	No	Pos	Pos	Pos	Pos	3
4	Sevilla	Local	2003	India	Pos	Pos	Pos	Pos	1
5	Mallorca	Local	2004	Bangladesh	Neg	Neg	Pos	Pos	1
6	Madrid	Local	2007	Vietnam	Pos	Pos	Pos	Pos	4
7	Valladolid	Local	2007	No	Neg	Neg	Pos	Pos	3
8	Alicante	Local	2007	No	Neg	Neg	Pos	Pos	3
9	Vizcaya	Local	2007	India	Pos	Pos	Pos	Pos	1
10	Guipúzcoa	Local	2007	No	Pos	Pos	Pos	Pos	3
11	Madrid	Local	2008	India	Pos	Pos	Pos	Pos	1
12	Guipúzcoa	Local	2008	No	Pos	Pos	Pos	Pos	3
13	Guipúzcoa	Local	2008	No	Neg	Pos	Pos	Pos	3
14	Guipúzcoa	Local	2008	India	Pos	Pos	Pos	Pos	1

a) Ciudad de España del norte de África; b) País de origen y nacimiento desconocido

Nd: no determinado;

La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos de la comparación de las técnicas serológicas y el método diseñado para la detección del ARN viral del VHE en las regiones ORF1/ORF2. De las 95 muestras estudiadas solamente 13 fueron positivas al VHE por PCR en ambas regiones del genoma (ORF1/ORF2). Cinco casos (1-5) pertenecían al estudio retrospectivo y los restantes ocho corresponden al estudio prospectivo. Los anticuerpos (Anti-VHE IgM) se analizaron en todas las muestras encontrándose solamente en 11 de ellas. Uno de los pacientes estudiados era un inmigrante de origen Africano que fue atendido en los servicios sanitarios de España, concretamente en la ciudad de Ceuta. Los 12 pacientes restantes eran españoles y residentes en este país. Seis de ellos tenían antecedentes de viajes internacionales con síntomas después de la vuelta del mismo, de estos, cuatro de ellos habían vuelto de la India, uno de Bangla Desh y el otro de Vietnam. El paciente que había vuelto de Bangla Desh tuvo resultados discordantes en cuanto al diagnóstico del mismo con la combinación de las técnicas serológicas y moleculares. Por técnicas de inmunoblot recombinante (RIBA) fue negativo y sin embargo el ARN viral del VHE fue detectado en el suero del paciente en ambas PCRs (ORF1/ORF2). Cuando secuenciamos y analizamos el producto obtenido en la PCR anidada de la región ORF1, se comprobó que se trataba del genotipo 1, que es el que circula en esa región. Se han resaltado en azul los seis casos autóctonos detectados en España, correspondientes al genotipo 3, como posibles casos de zoonosis.

De estas 13 secuencias, seis correspondieron al genotipo 1, seis al genotipo 3 y una al genotipo 4. Las cepas de genotipo 1 correspondieron al inmigrante de origen Africano y dos viajeros que venían de la India y Bangla Desh. Las cepas de genotipo 3 correspondieron a muestras de seis pacientes que no tenían antecedentes de viajes a zonas endémicas del VHE en su historial clínico. El único genotipo 4 encontrado correspondió al paciente que procedía de Vietnam.

Según se muestra en la Fig 2, los casos 7, 8 y 10 (pertenecientes al año 2007) se agruparon juntos con una homología de secuencias del 99,2% entre ellas. Esto estaría indicando que en ese año la misma cepa de VHE estaba circulando en distintas provincias de España (Valladolid, Alicante y San Sebastián).

Así pues, los resultados obtenidos de los estudios moleculares realizados, revelaron la existencia de siete casos importados de hepatitis aguda por VHE. De estos siete casos importados, seis de ellos eran de genotipo 1 y correspondían a pacientes con antecedentes de viaje a zonas endémicas de este genotipo (India), y a un paciente de origen Africano que residía en Ceuta. El otro caso importado pertenecía al genotipo 4, y se trataba de un paciente Madrileño que había estado recientemente en Vietnam.

El hallazgo del genotipo 3 en muestras de seis pacientes españoles con hepatitis aguda, que no tenían antecedentes de viajes a zonas endémicas por este agente viral, confirmó que el origen de estas infecciones era autóctono.

## ES 2 338 853 A1

El genotipo 3 se ha encontrado en humanos y cerdos, así como en varias especies de animales salvajes de Europa y América del Norte (principalmente el Jabalí) (de Deus N *et al.*, (2008). *Vet Microbiol*; 129: 163-170; Kaci S *et al.*,(2008). *Vet Microbiol*: 128: 380-385) y en aguas urbanas (Clemente-Casares P *et al.*, (2003). *Emerg Infect Dis*: 9: 448-454).

5

Hoy en día se postula que la hepatitis aguda por VHE en los países desarrollados es una enfermedad de baja incidencia y de origen zoonótico. Para confirmar el origen zoonótico de esta enfermedad se deberían realizar estudios filogenéticos entre las secuencias obtenidas de humanos y de animales.

10

Los resultados de este trabajo mediante métodos moleculares, confirmaron que el virus de la hepatitis E está circulando en España, encontrándose cepas autóctonas (genotipo 3), así como la existencia de otras cepas VHE de origen importado, correspondientes al genotipo 1 y 4.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 338 853 A1

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de los cebadores directos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 7 y los cebadores reversos SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 8 para detectar el virus de la hepatitis E (VHE) en una muestra biológica aislada.
- 10 2. Método para la detección del virus VHE que comprende:
- a. obtener una muestra biológica y aislar sus ácidos nucleicos,
  - b. amplificar de forma simultánea dos fragmentos de las regiones ORF1 y ORF2 del ácido nucleico del apartado (a) por medio del par de cebadores SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2 y del par de cebadores SEQ ID NO: 5/SEQ ID NO: 6,
  - 15 c. amplificar de forma simultánea dos fragmentos internos de los fragmentos obtenidos en el apartado (b) por medio del par de cebadores SEQ ID NO: 3/SEQ ID NO: 4 y del par de cebadores SEQ ID NO: 7/SEQ ID NO: 8 y
  - 20 d. determinar la desviación de los apartados (b) y (c) con respecto a un control.
- 25 3. Método según la reivindicación 2 donde la muestra biológica se obtiene de un mamífero.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3 donde se incluye un control interno para evaluar la presencia de inhibidores de amplificación.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 que además permite determinar el genotipo del virus VHE mediante la RT-PCR anidada de la región ORF1.
- 30 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, para la monitorización de la respuesta a un tratamiento de hepatitis E.
- 35 7. Kit para determinar el genotipo del VHE en una muestra biológica aislada mediante RT-PCR anidada de la región ORF1 que comprende, al menos, los cebadores SEQ ID NO: 1/SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3/SEQ ID NO: 4.
- 40 8. Kit para la detección del virus VHE en una muestra biológica aislada mediante RT-PCR anidada que comprende, al menos, los cebadores directos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 7 y los cebadores reversos SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 8.
- 45 9. Kit según la reivindicación 8 para la monitorización de la respuesta a un tratamiento de hepatitis E.
- 50 10. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 que comprende, además, el control interno para evaluar la presencia de inhibidores de amplificación.
- 55
- 60
- 65

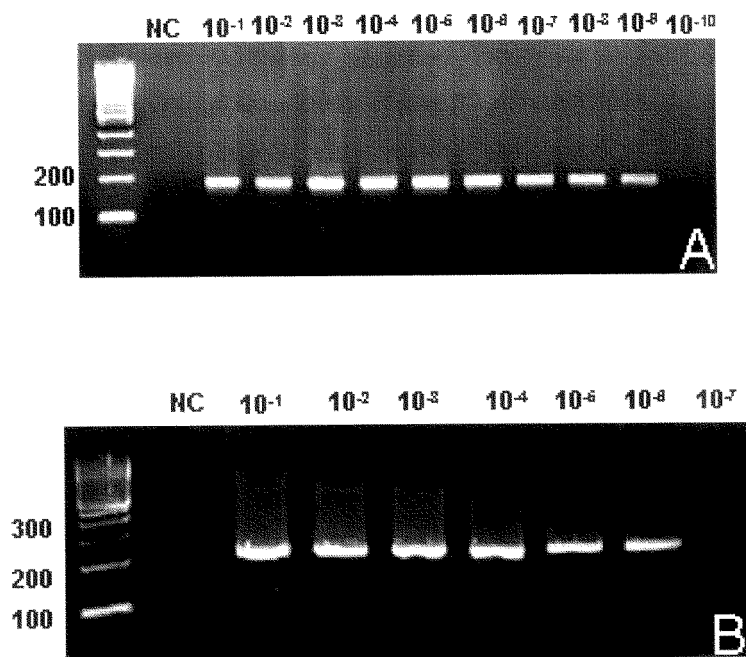


FIG. 1

ES 2 338 853 A1

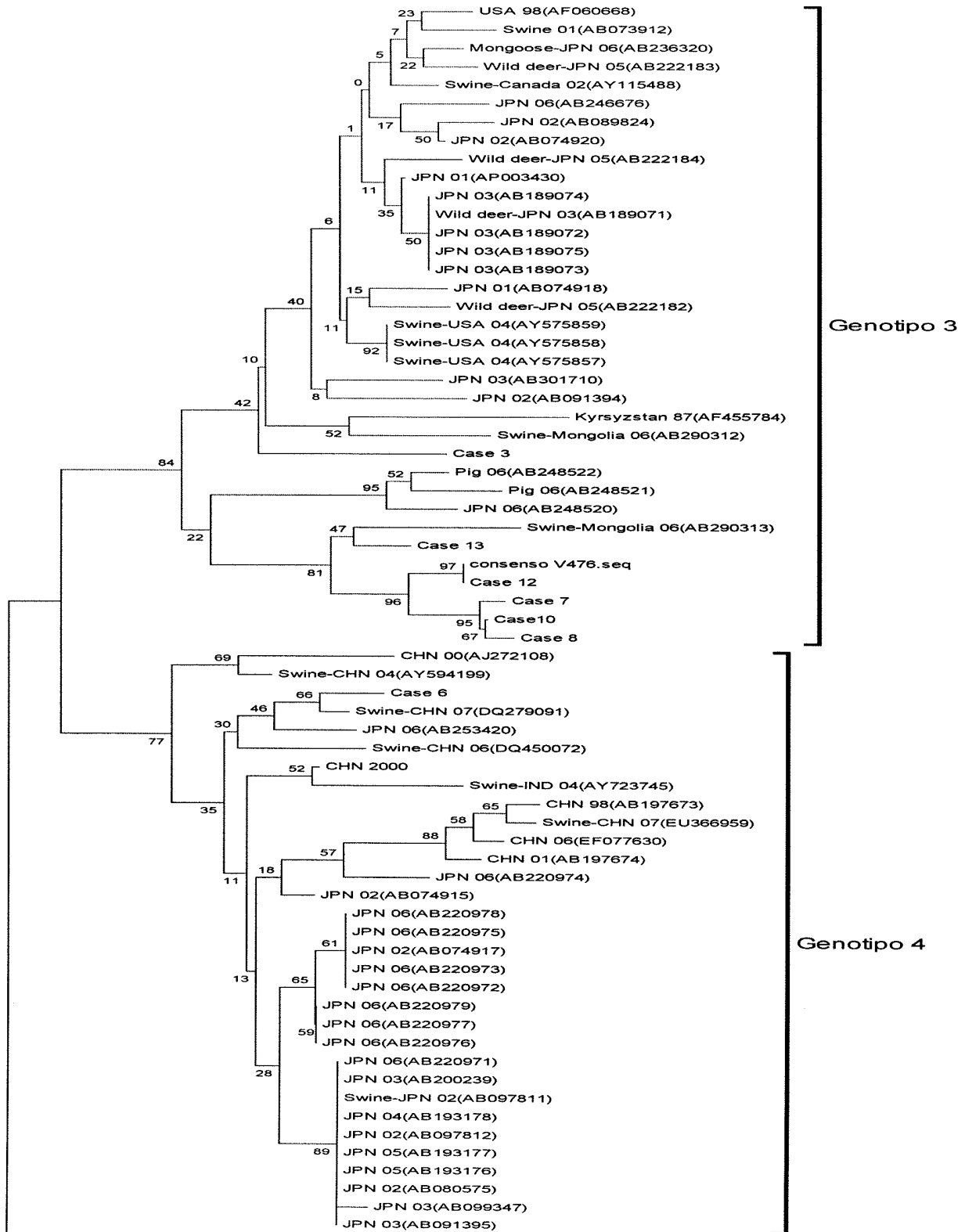


FIG. 2A

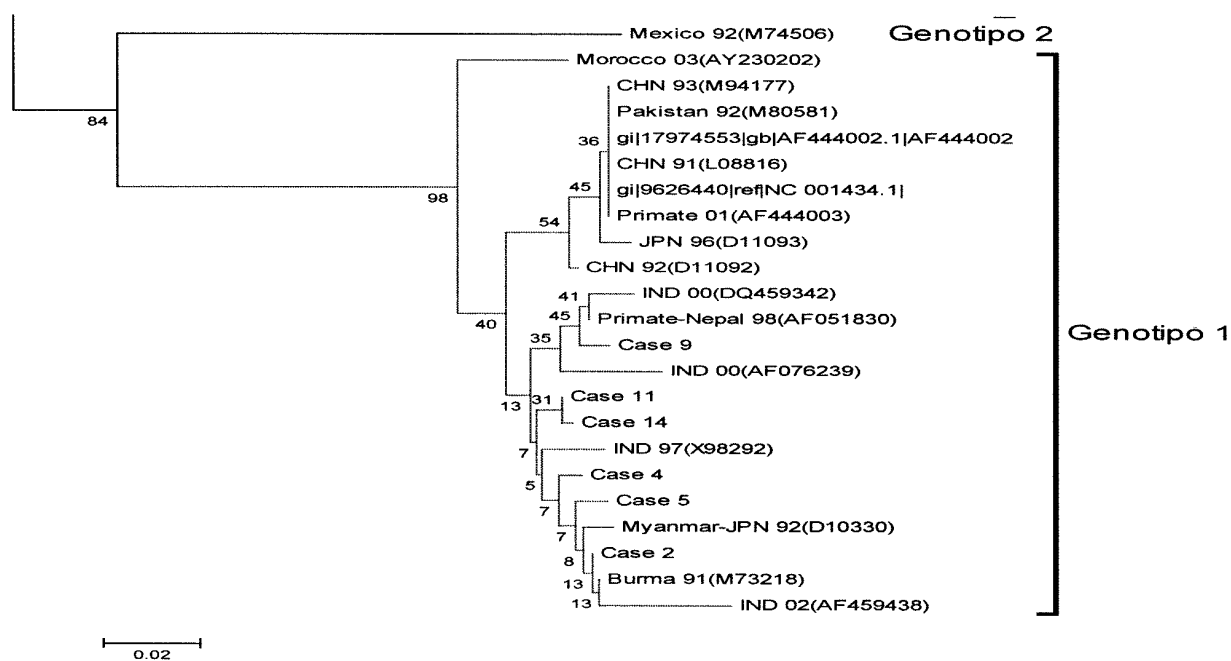
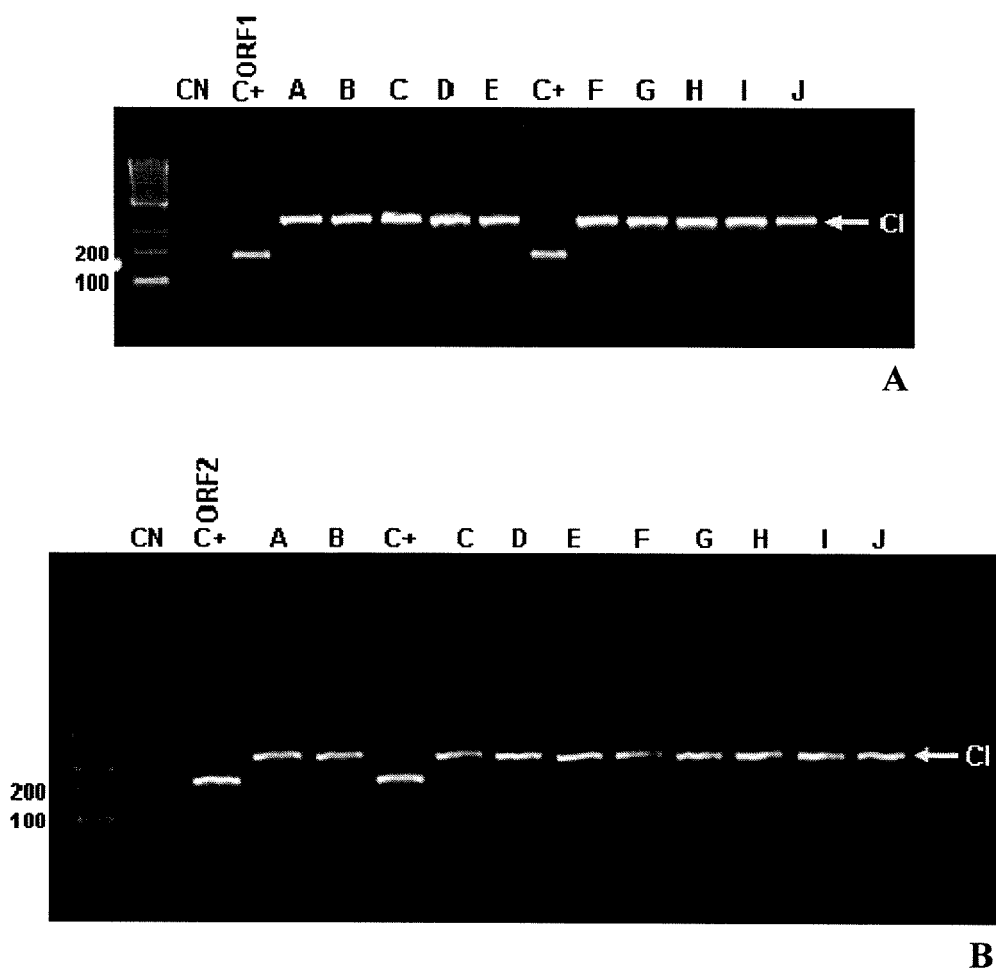


FIG. 2B



**FIG. 3**



# ES 2 338 853 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Instituto de salud Carlos III

5 <120> Método y kit para la detección del virus de la Hepatitis E (VHE)

<130> 1613.5

10 <160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

15 <211> 21

<212> DNA

<213> Hepatitis E virus

20 <400> 1

**ccaycagtty athaaggctc c**  
          **21**

25 <210> 2

<211> 17

<212> DNA

<213> Hepatitis E virus

30 <400> 2

**taccavcgct gracrtc**  
          **17**

35 <210> 3

<211> 19

<212> DNA

40 <213> Hepatitis E virus

<400> 3

45       **ctcctggcrt yacwactgc**  
          **19**

<210> 4

<211> 20

50 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Secuencia con nucleótido modificado

<220>

60 <221> misc\_feature

<222> (12)..(12)

<223> n es i

65

## ES 2 338 853 A1

<400> 4  
ggrtgrttcc anarvacyc  
20

5  
<210> 5  
<211> 21  
<212> DNA  
10 <213> Hepatitis E virus

<400> 5  
gacagaattr atttcgtcgg c  
15 21

<210> 6  
<211> 19  
20 <212> DNA  
<213> Hepatitis E virus

<400> 6  
25 ccgrgtttta ccyacctc  
19

<210> 7  
30 <211> 18  
<212> DNA  
<213> Hepatitis E virus

35 <400> 7  
gtcgytcr g ccaatggc  
18

40 <210> 8  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Hepatitis E virus

45 <400> 8  
garagccaha rmacatcatt  
20

50 <210> 9  
<211> 22  
<212> DNA  
55 <213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Cebador RTS para ADN quimérico

60 <400> 9  
gcttgggcgt gtctcaaaat ct  
22

65 <210> 10  
<211> 22

## ES 2 338 853 A1

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Cebador RTA para ADN quimérico

<400> 10

10 **gtcgccacgg ttgatgagag ct**  
22

<210> 11

15 <211> 17

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Cebador NS3 para ADN quimérico

<400> 11

25 **cgtaatggct ggcctgt**  
17

<210> 12

30 <211> 18

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Cebador NA2 para ADN quimérico

<400> 12

40 **gtaatgctct gccagtgt**  
18

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 338 853

② Nº de solicitud: 200803220

③ Fecha de presentación de la solicitud: 11.11.2008

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12Q 1/68 (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 20030049601 A1 (GEORGE G SCHLAUDER) 13.03.2003, ejemplos 2,12-15; reivindicaciones 22-23,35-36.	1-10
X	YOUCHUN WANG et al. "A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis" Journal of General Virology , vol 80, paginas 169-177 1999 pagina 170.	1-10
A	US 6432408 B1 (XIANG-JIN MENG) 13.08.2002, columna 12, líneas 24-49; secuencia 7; columnas 10-11.	1-10
A	WO 0168921 A2 (INVESTIGEN) 20.09.2001, reivindicaciones 51,59,61; secuencia 63.	1-10
A	JP 2005102689 A (MITSUBISHI KAGAKU BIO CLINICAL) 21.04.2005, resumen.	1-10
A	CN 1300771 A (CHINESE MEDICINE AND BIOLOGIC PROD APPRAIS) 27.06.2001, resumen.	1-10
A	EP 1400588 A1 (KABUSHIKI KAISHA TOSHIBA) 24.03.2004, reivindicaciones.	1-10
A	GEORGE G. SCHLAUDER "Novel hepatitis E virus (HEV) isolates dorm Europe: Evidence for additional Genotypes of HEV" Journal of Medical Virology vol 57, pag. 243-251 1999.	1-10
A	XIANG-JIN MENG "A novel virus of swine is closely related to human hepatitis E virus" Proc. Natl. Acad. Sci. vol 94, pag. 9860-9865 1997.	1-10

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

24.02.2010

Examinador

A. Santos Díaz

Página

1/5



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 338 853

② Nº de solicitud: 200803220

③ Fecha de presentación de la solicitud: 11.11.2008

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12Q 1/68 (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	JAMES C. ECKER "A hepatitis virus E variante from the US: molecular characterization and transmission in cynomolgus macaques" Journal of general Virology , col 80, pag. 681-690 1999.	1-10

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

24.02.2010

Examinador

A. Santos Díaz

Página

2/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.02.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-10	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones 1-10	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión:**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

**1. Documentos considerados:**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US2003049601	13-03-2003
D02	US6432408	13-08-2002
D03	WO0168921	20-09-2001

Observaciones sobre documentos:

**1. NOVEDAD (Art. 6.1 LP)**

Ninguno de los documentos citados describe el uso conjunto de los cebadores descritos en las reivindicaciones 1, 2 y 8 para la detección del virus de la hepatitis E.

Tampoco se describe el uso de las dos parejas de cebadores del kit de la reivindicación 7.

Por lo tanto las reivindicaciones 1-10 cumplen el requisito de novedad

**2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP)**

2.1 El problema a resolver por la presente invención según las reivindicaciones 1, 2, 7 y 8 puede considerarse como el diseño de cebadores alternativos para la detección del virus de la hepatitis E y la identificación de distintos genotipos. Se utilizan 2 o 4 pares cebadores degenerados a partir de secuencias de las zonas ORF1 y ORF2 y se realiza una amplificación utilizando la técnica de PCR anidada.

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

D01 describe el uso de 4 pares de cebadores para la detección del virus de la hepatitis E. Estos cebadores se diseñan a partir de secuencias de las mismas regiones diana ORF1 y ORF 2, en su diseño se degeneran varios nucleótidos para poder identificar diversas cepas de hepatitis E que afectan a humanos y a animales. Se llevan a cabo PCRs anidadas de ORF1 y de ORF2. Las secuencias de algunos de los cebadores utilizados coinciden con las de las reivindicaciones (D01 párrafo 134, ejemplos, 7, 11, 14 y 15 reivindicaciones 21-23, 35-36). El uso del cebador SEQ 5 se describe también en D02 (SEQ7) y D03 (SEQ 31)

El diseño de cebadores para dianas conocidas es una técnica ampliamente utilizada que se realiza mediante programas informáticos. La selección de una determinada secuencia dentro de una misma región diana ya utilizada para el diseño de cebadores para la misma enfermedad no puede considerarse inventiva sino presenta un efecto técnico sorprendente.

La diferencia entre las reivindicaciones 1, 2, 7 y 8 y D01 sería por lo tanto el uso de cebadores alternativos que se diseñan a partir de las mismas dianas ya utilizadas habitualmente en la detección del virus de la hepatitis E por un método ya conocido sin que ningún ejemplo comparativo muestre un efecto técnico sorprendente.

Por lo tanto las reivindicaciones 1, 2, 7 y 8 no presentan actividad inventiva según establece el artículo 8.1.

2.2 Según el razonamiento de 2.1 ni el método de detección del virus de la hepatitis E de las reivindicaciones dependientes 3-6, ni los Kits de las reivindicaciones dependientes 9-10 presentan características técnicas que en combinación con características de alguna de las reivindicaciones de las que dependen impliquen una actividad inventiva.