

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la  
Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
14 de mayo de 2020 (14.05.2020)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional  
**WO 2020/094907 A1**

(51) Clasificación internacional de patentes:  
C12Q 1/686 (2018.01)

**Publicada:**

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2019/070764

(22) Fecha de presentación internacional:  
08 de noviembre de 2019 (08.11.2019)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P201831080 08 de noviembre de 2018 (08.11.2018) ES

(71) Solicitante: **SERVICIO ANDALUZ DE SALUD**  
[ES/ES]; Avda. de la Constitución, 18, 41071 Sevilla (ES).

(72) Inventores: **RIVERO JUAREZ, Antonio**; SERVICIO ANDALUZ DE SALUD, Avda. de la Constitución, 18, 41071 SEVILLA (ES). **FRIAS CASAS, Manuel Mario**; SERVICIO ANDALUZ DE SALUD, Avda. de la Constitución, 18, 41071 SEVILLA (ES). **RIVERO ROMAN, Antonio**; SERVICIO ANDALUZ DE SALUD, Avda. de la Constitución, 18, 41071 SEVILLA (ES).

(74) Mandatario: **FUSTER, Gustavo**; Paseo de la Castellana, 140, Planta 3. Edificio Lima, 28046 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: METHOD FOR DIAGNOSING HEPATITIS E (HEV)

(54) Título: MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE LA HEPATITIS E (VHE)

(57) Abstract: The invention relates to a method and a diagnostic kit or device, comprising new primers and a probe, which permits real-time gene amplification of the hepatitis E virus (HEV) in an isolated biological sample.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a un método y un kit o dispositivo de diagnóstico, con nuevos cebadores y sonda, que permite la amplificación genómica en tiempo real del virus de la Hepatitis E (HVE) en una muestra biológica aislada.

WO 2020/094907 A1

1  
DESCRIPCIÓN

Método de diagnóstico de la Hepatitis E (VHE).

5

**CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se encuentra dentro del campo de la Biotecnología y de la medicina. Particularmente, se refiere a un nuevo método y un kit o dispositivo de diagnóstico que permite  
10 la amplificación genómica en tiempo real del virus de la Hepatitis E (HVE) en una muestra biológica aislada.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15 La infección por el virus de la hepatitis E (VHE) es la principal causa mundial de hepatitis aguda de origen viral [Kamar N et al. Hepatitis E. Lancet 2012; 30: 2477-2488]. Existen 4 genotipos virales (1, 2, 3, 4) con capacidad infectiva a humanos [Kamar N et al. Hepatitis E. Lancet 2012; 30: 2477-2488, Hoofnagle JH, Nelson KE, Purcell RH. Hepatitis E. New Engl J Med 2012; 367: 1237-44]. Debido a su carácter zoonótico, en los últimos años se han descrito nuevos  
20 genotipos y subtipos virales (genotipos 5, 6 y 7) con capacidad infectiva al ser humano [Smith DB, et al., J Gen Virol. 2016 Mar;97(3):537-42. doi: 10.1099/jgv.0.000393, Smith, D.B., et al. (2014). J. Gen. Virol. 95: 2223–2232]. El VHE se transmite principalmente por vía fecal-oral (persona o animal) y por la ingestión de agua y alimentos contaminados (sobre todo de origen porcino o de caza mayor) [Kamar N et al. Hepatitis E. Lancet 2012; 30: 2477-2488, Hoofnagle  
25 JH, Nelson KE, Purcell RH. Hepatitis E. New Engl J Med 2012; 367: 1237-44]. De esta forma, se han descrito varios brotes epidémicos en diferentes países europeos asociados al consumo de alimentos derivados de estos animales [Lee, G.H., et al. (2016). Gastroenterology. 150(2):355-7.e3]. En ese sentido, este equipo de innovación demostró mediante análisis filogenético la transmisión zoonótica de VHE por consumo de carne de jabalí contaminada  
30 sugiriendo que esta especie es una importante vía de transmisión [Rivero-Juárez, A., et al. (2017). Zoonoses Public Health. doi: 10.1111/zph.12343]. Además, recientemente nuestro grupo ha comunicado la presencia de VHE en leche materna en el curso de la infección aguda por VHE que permite especular sobre la potencial transmisión del VHE mediante la lactancia o el consumo de leche procedente de animales infectados [Rivero-Juarez A et al., Clin Infect Dis.  
35 2016 Jun 1;62(11):1464].

Las manifestaciones clínicas de la infección por el virus de la hepatitis E por genotipos 3 ó 4 son muy variables abarcando desde formas subclínicas, hasta cuadros sintomáticos (a veces

graves) como hepatitis aguda, síndrome de Guillain-Barré, amiotrofia neurálgica, mielitis aguda, meningoencefalitis, parálisis facial de Bell, enfermedad renal (glomerulonefritis membranosa proliferativa), pancreatitis aguda, trombocitopenia y anemia aplásica [Dalton HR, et al., Nat Rev Neurol. 2016; 12: 77-85]. Además, la infección aguda por el VHE puede incidir de forma desfavorable en el curso clínico de algunas comorbilidades, como sucede con las hepatopatías crónica, en las que se asocia a una mayor tasa de descompensación hepática y muerte, o en pacientes inmunodeprimidos, donde la enfermedad puede evolucionar a formas crónicas con progresión rápida de la fibrosis hepática y desarrollo de cirrosis [Kumar Acharya, S., et al., J Hepatol 2007; 46: 387-94.]. Por todo ello, dadas las múltiples vías de transmisión de esta enfermedad, y dado el creciente número de casos reportados en Europa en los últimos años, la Hepatitis E es considerada como un importante problema de Salud Pública en Europa.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/en/>], anualmente ocurren 20 millones de infecciones por VHE, más de tres millones de casos sintomáticos y 57.000 muertes relacionadas con hepatitis E. Las mujeres embarazadas, los receptores de trasplantes, las personas con enfermedad hepática subyacente y los infectados con el VIH son las poblaciones con mayor riesgo de sufrir complicaciones por la infección por VHE y por tanto son los grupos de población especialmente tributarios a un programa de prevención y diagnóstico precoz de la enfermedad. En la actualidad, no existen métodos estandarizados para el diagnóstico de la infección por VHE. El diagnóstico indirecto a través de la detección de anticuerpos mediante estudio serológico es el procedimiento más comúnmente utilizada. Sin embargo, el diagnóstico serológico de la infección por el VHE presenta diversas e importantes limitaciones que un obstáculo para su utilización en la práctica clínica habitual. En primer lugar, la sensibilidad y especificidad de los distintos métodos serológicos comercializados son muy variables [Drobeniuc J, et al. Clin Infect Dis. 2010 Aug 1;51(3):e24-7]. En segundo lugar, las técnicas serológicas no permiten discriminar entre infecciones pasadas e infecciones crónicas. En tercer lugar, su utilidad en el diagnóstico de pacientes inmunodeprimidos es muy limitada debido a la ausencia o retraso en la producción de anticuerpos. Y por último, las técnicas serológicas no son útiles para el diagnóstico de infección aguda en estadios precoces donde aún no se ha producido seroconversión.

El diagnóstico molecular mediante PCR es un método de diagnóstico directo con gran sensibilidad y especificidad para diagnosticar infección por VHE. Sin embargo, las técnicas comercializadas actualmente presentan limitaciones que pueden provocar resultados falsamente negativos que pueden tener importantes consecuencias en el pronóstico de los pacientes. Entre estas limitaciones son especialmente destacables:

1.- la incapacidad de amplificar genotipos con demostrada capacidad infectiva a humanos como es el genotipo 3ra, y

2.- la baja sensibilidad para detectar el genotipo 3f, el más frecuente de los genotipos del VHE aislados en nuestro medio [3, 4, Adlhoch C, et al., J Clin Virol. 2016 Sep;82:9-16. doi: 10.1016/j.jcv.2016.06.010. Epub 2016 Jun 23].

Las consecuencias e implicaciones que tienen estas limitaciones de la técnica sobre el retraso diagnóstico y el pronóstico de los pacientes son obviamente muy importantes. Por tanto, es necesario desarrollar nuevos métodos y kits de diagnóstico de la VHE.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1.** Gradiente de temperatura óptima de *annealing*.

**Figura 2.** Determinación de la concentración óptima de primer.

**Figura 3.** Comparación con concentraciones superiores.

**Figura 4.** Concentración óptima de sonda.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han desarrollado y optimizado una técnica de diagnóstico molecular del VHE mediante PCR que cubre las deficiencias de los procedimientos diagnósticos comercializados en la actualidad. Dicha técnica tiene gran impacto en la práctica clínica habitual y el pronóstico de los pacientes infectados por el VHE, ya que reducirá sustancialmente la posibilidad de falsos negativos de las técnicas actualmente en uso.

La técnica propuesta presenta una alta especificidad y sensibilidad para el diagnóstico molecular de la infección por el VHE. En comparación con los kits comerciales disponibles actualmente para el diagnóstico de la infección por el VHE, la técnica de la invención presenta las siguientes mejoras:

- RealStar HEV RT-PCR assay (Altona Diagnostic; Hamburgo, Alemania): Este método de diagnóstico especifica en su ficha técnica que posee un límite de detección de 310 UI/mL. Sin embargo, este límite de detección ha sido sólo testado con la cadena

estándar de la OMS correspondiente al genotipo 1a (PEI code 6329/10). Además, se ha demostrado que la sensibilidad de la técnica disminuye significativamente hasta en un 33% cuando se analizan infecciones por VHE con cargas virales bajas producidas por genotipo 3f (el de mayor prevalencia en nuestro medio) [Abravanel *et al.*, 2013. *J Clin Microbiol.* Jun;51(6):1913-6]. Por último, no se especifica su límite de detección de otros genotipos virales en su ficha técnica [https://www.altona-diagnostics.com/tl\_files/downloads/B%20-%20neue%20Manuals%20ab%20Februar%202017/MAN-271010-EN-S02\_HEV%20RTPCR%20Kit%201.0\_WEB.pdf].

- HepatitisE@ceeramtools Kit (Ceeram; La chapelle-sur-Erdre, Francia): Este método de diagnóstico especifica en su ficha técnica que detecta en torno 1 a 10 copias sin embargo no define la concentración de la misma (10 copias/uL o 10 copias/mL) y tampoco especifica con que cadena estándar se ha testado el límite de detección. Además, la sensibilidad disminuye significativamente cuando se analizan infecciones por VHE con cargas bajas producidas por los genotipos 3c (reducción del 16%), 3e (reducción del 83%) y 3f (reducción del 33%) [Abravanel *et al.*, 2013. *J Clin Microbiol.* Jun;51(6):1913-6]. Además, no se especifica su capacidad de detección de otros genotipos virales en su ficha técnica [28].
- AmpliCube HEV RT-PCR kit (Mikrogen; Neuried, Alemania): Este método de diagnóstico especifica en su ficha técnica que tiene un límite de detección de 36,13 UI/mL. Sin embargo, este límite sólo ha sido testado con la cadena estándar de la OMS correspondiente al genotipo 1a (PEI code 6329/10). Además, no se especifica su capacidad de detección de otros genotipos virales en su ficha técnica [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Hepatitis\_E\_Virus\_Food\_4489312.pdf].

Por todo ello, la técnica desarrollada en esta invención mejorara notablemente la capacidad diagnóstica del VHE respecto al resto de técnicas usadas en la actualidad. Una de las mejoras proporcionadas por el método propuesto respecto a los métodos comerciales disponibles radica en que tiene capacidad de detectar la totalidad de las 11 cadenas estándar de VHE de la OMS: 1a (8567/13), 1a (8568/13s), 1e (8569/13), 3b (8570/13), 3c (8571/13), 3e (8572/13), 3f (8573/13), 3ra (8574/13s), 4c (8575/13), 4g (8576/13), 2a (8577/13s). Ello permite determinar el límite de detección para cada uno de esos genotipos y subtipos. Además, presenta un límite de detección de 21.86 UI/mL, lo que supone que sea la técnica con mayor sensibilidad.

Por tanto, un **primer aspecto** de la invención se refiere a un juego de cebadores nucleotídicos, de ahora en adelante juego de cebadores nucleotídicos de la invención, de secuencia SEQ ID NO. 1 y SEQ ID NO: 2.

- 5 SEQ ID NO. 1 es el primer forward, de ahora en adelante primer cebador de la invención, de secuencia:

5'-RGTRGTTTCTGGGGTGAC-3'

- 10 SEQ ID NO: 2. es el primer reverse, de ahora en adelante segundo cebador de la invención, de secuencia:

5'-AKGGRTTGGTTGGRTGA-3'

- 15 Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a una sonda nucleotídica de secuencia SEQ ID NO: 3. Más preferiblemente la sonda nucleotídica de la invención está marcada.

SEQ ID NO: 3

Sonda marcada: 5'-FAM-TGAYTCYCARCCCTTCGC-TAMRA-3'

- 20 Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a un método *in vitro* de diagnóstico de la infección por VHE en un individuo que comprende:

a) obtener un producto de amplificación del virus a partir de una muestra biológica aislada de dicho individuo usando juego de cebadores nucleotídicos de la invención, y  
b) cuantificar el producto de amplificación obtenido en el paso (a) mediante una sonda de la invención.

- 25 En el contexto de esta invención, el término "sonda" se refiere a una molécula que puede distinguir de manera detectable entre moléculas diana que difieren en su estructura o secuencia nucleotídica. La detección se puede realizar de varias formas diferentes según el tipo de sonda utilizada y el tipo de molécula diana. Así, por ejemplo, la detección puede  
30 basarse en la discriminación de los niveles de actividad de la molécula diana, pero preferiblemente se basa en la detección de la unión específica. Los ejemplos de dicha unión específica incluyen la unión de anticuerpos y la hibridación de la sonda de ácido nucleico. Así, por ejemplo, las sondas pueden incluir sustratos enzimáticos, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, y preferiblemente sondas de hibridación de ácidos nucleicos. Las sondas pueden  
35 ser de entre 10 y 200 nucleótidos, más preferiblemente, de entre 12 y 50 nucleótidos, y aún más preferiblemente del número de nucleótidos de las sondas de la invención.

El término "cebador", como se usa en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido que es capaz de actuar como un punto de inicio de la síntesis de polinucleótidos a lo largo de una cadena complementaria en determinadas condiciones. Tales condiciones incluyen la presencia de cuatro nucleótidos trifosfatos o análogos de nucleósidos y uno o más agentes para la polimerización, como la ADN polimerasa y/o la transcriptasa inversa, en un tampón apropiado ("tampón" incluye sustituyentes que son cofactores o que afectan al pH), fuerza iónica, etc.), y a una temperatura adecuada. Un cebador debe ser lo suficientemente largo para identificar la secuencia específica a sintetizar en las condiciones indicadas. Los cebadores son secuencias nucleotídicas cortas, aproximadamente de 15-24 nucleótidos de longitud que se pueden alinear con una hebra diana gracias a la complementariedad de bases para formar un híbrido entre el cebador y la hebra diana.

Los ácidos nucleicos se extraen de la muestra mediante procedimientos conocidos por los expertos y disponibles comercialmente, como por ejemplo, pero sin limitarnos, los sistemas QIAcube (QIAgen, Hilden Alemania), MagNA Pure (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza), Maxwell (Promega, Madison, Wisconsin, EEUU), KingFisher (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU), entre otros.

En el contexto de la presente invención se entiende "extracto de ARN/ADN", cuando tras someter la muestra biológica a un procedimiento de extracción, separación, purificación o clonación de ácidos nucleicos, entre otros, se obtiene como resultado ya sea en seco, en solución, unido o no a otras moléculas, adherido o no a diversas sustancias o lechos, materia en la que el ARN/ADN se encuentra en mayor proporción relativa respecto al resto de moléculas presentes, en comparación con la muestra biológica de partida.

En el contexto de la presente invención se entiende por "pareja de cebadores" o "*primer pair*", al conjunto de dos cebadores que, empleados en una misma reacción de amplificación o PCR, permiten obtener múltiples copias de una secuencia diana. Cada uno de los cebadores hibrida con la secuencia diana, de manera que se amplifica la secuencia de nucleótidos acotada mediante cada pareja de cebadores. La extensión de los cebadores durante los ciclos de PCR determina la multiplicación exponencial  $2^N$  de la secuencia de nucleótidos acotada por los cebadores, siendo N el número de ciclos de la reacción PCR.

Una "muestra biológica aislada" incluye, pero sin limitarnos a, células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia.

El término "individuo", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos. El término "individuo" no pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier edad, sexo y condición física.

5 En una realización preferida de este aspecto de la invención la detección por VHE se realiza mediante PCR, y más preferiblemente mediante qRT-PCR.

10 En una realización preferida de este aspecto de la invención la/s retrotranscriptasa/s tienen un rango de actuación de al menos entre 1 pg y 2 µg.

La RT-PCR en tiempo real (PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real) es un importante desarrollo de la tecnología de PCR que permite la detección y medición confiables de los productos generados durante cada ciclo de proceso de PCR. Esta técnica se hizo  
15 posible después de la introducción de una sonda oligonucleotídica que fue diseñada para hibridar dentro de la secuencia diana. La escisión de la sonda durante la PCR debido a la actividad nucleasa 5' de la Taq polimerasa se puede usar para detectar la amplificación del producto específico del objetivo.

20 El término "PCR" corresponde a las siglas de reacción en cadena de la polimerasa mediante la cual se pueden obtener millones de copias de las regiones de ADN deseadas. Se caracteriza por el empleo de parejas de cebadores que acotan la región de la que se realizarán millones de copias, lo que también se conoce como "amplificar ADN" durante la PCR. La PCR está compuesta por un número determinado de ciclos, compuestos a su vez por tres fases en las  
25 que las hebras de ADN se separan, se unen los cebadores y se elongan las nuevas hebras de ADN. En cada ciclo, si la eficiencia de la reacción es del 100% se produce un crecimiento exponencial de los fragmentos de ADN objeto de la amplificación.

En el caso de la invención, el término "RT-PCR" corresponde a las siglas de reacción en  
30 cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa. Es una variante de PCR y también se usa para generar una gran cantidad de copias de ADN (amplificación). En la RT-PCR, sin embargo, una hebra de ARN es retrotranscripta en ADN complementario (ADNc) usando una enzima llamada transcriptasa inversa, y el resultado, se amplifica en una PCR tradicional. La amplificación exponencial mediante PCR en Transcripción Reversa supone una técnica  
35 altamente sensible, que puede detectar un número de copias de ARN muy bajo. Puede utilizarse como método de detección molecular de genes y para estudiar el genoma de virus de ARN como los retrovirus. Otro de sus usos se relaciona con la cuantificación de la expresión génica, mediante la combinación de esta técnica con el análisis de Northern blot. Una de las

características más importantes es que en el proceso de RT-PCR, el ADNc generado ya no lleva los intrones que sí tendría el ADN original. De este modo, al expresar el ADNc producto de la RT-PCR, se generará un ARNm formado exclusivamente por exones.

- 5 El término "oligonucleótido" hace referencia a la secuencia de bases de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster, habitualmente no mayores de 50 nucleótidos.

Las "condiciones de amplificación" o "condiciones de extensión" se refieren indistintamente a condiciones bajo las cuales una polimerasa puede añadir nucleótidos al extremo 3' de un polinucleótido. Dichas condiciones de amplificación o extensión son muy conocidas en la técnica (Sambrook y Russell, 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, 1987-2007, John Wiley & Sons.)

- 15 Por "virus" en esta memoria, se entienden todos los agentes infecciosos microscópicos acelulares que solo pueden multiplicarse dentro de las células de otros organismos.

El VHE es un virus ssRNA, de cadena positiva, especie *Orthohepevirus A*, del género *Orthohepevirus*, Familia *Hepeviridae*.

20

#### KIT O DISPOSITIVO DE LA INVENCION Y USOS

- Otro **aspecto** de la invención se refiere a un kit o dispositivo de diagnóstico, de ahora en adelante kit o dispositivo de diagnóstico de la invención, que comprende un juego de  
25 cebadores nucleotídicos de la invención y/o una sonda de la invención.

El kit de la invención puede incluir controles positivos y/o negativos. El kit además puede contener, sin ningún tipo de limitación, tampones, soluciones de extracción de proteínas, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc.

30

Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo los métodos de la invención.

35

*USOS MÉDICOS DE LA INVENCION*

Otro **aspecto** de la invención se refiere a un cebador de secuencia SEQ ID NO. 1 para su uso como medicamento

5

Otro **aspecto** de la invención se refiere a un cebador de secuencia SEQ ID NO. 2 para su uso como medicamento

10

Otro **aspecto** de la invención se refiere a una sonda nucleotídica de secuencia SEQ ID NO: 3 para su uso como medicamento.

Otro **aspecto** de la invención se refiere al kit o dispositivo de diagnóstico de la invención para su uso el diagnóstico de la infección por VHE en un individuo.

15

El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales. En concreto se refiere a los cebadores y sondas de la invención empleados para el diagnóstico de la infección por VHE en un individuo.

20

SEQ ID NO. 1 es el primer forward, de ahora en adelante primer cebador de la invención, de secuencia:

5'-RGTRGTTTCTGGGGTGAC-3'

25

SEQ ID NO: 2. es el primer reverse, de ahora en adelante segundo cebador de la invención, de secuencia:

5'-AKGGRTTGGTTGGRTGA-3'

Otro aspecto de la invención se refiere a un cebador de secuencia SEQ ID NO. 1

30

SEQ ID NO. 1 es el primer forward, de ahora en adelante primer cebador de la invención, de secuencia:

5'-RGTRGTTTCTGGGGTGAC-3'

35

Otro aspecto de la invención se refiere a un cebador de secuencia SEQ ID NO. 2

SEQ ID NO: 2. es el primer reverse, de ahora en adelante segundo cebador de la invención, de secuencia:

5'-AKGGRTTGGTTGGRTGA-3'

## MEDIOS AUTOMATIZADOS DE LA INVENCION

Otro **aspecto** de la invención se refiere a un medio de almacenamiento legible por un ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador  
5 lleve a cabo los pasos del método de la invención.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el medio de almacenamiento legible comprende al menos una secuencia comprendida en cualquiera de las sondas de la invención.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención que comprende oligonucleótidos o microarreglos de canal único diseñados a partir de al menos una secuencia conocida o un ARNm comprendida cualquiera de las sondas de la invención.

Otro **aspecto** de la invención se refiere a una señal transmisible que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos del método de la invención.

Así, por ejemplo, las secuencias de oligonucleótidos pueden ser construidas en la superficie un chip mediante el elongamiento secuencial de una cadena en crecimiento con un sólo nucleótido utilizando fotolitografía. Así, los oligonucleótidos son anclados por el extremo 3' mediante un método de activación selectiva de nucleótidos, protegidos por un reactivo fotolábil, mediante la incidencia selectiva de luz a través de una fotomáscara. La fotomáscara puede ser física o virtual.

La síntesis *in situ* sobre un soporte sólido (por ejemplo, vidrio), podría hacerse mediante tecnología chorro de tinta (ink-jet), lo que requiere sondas más largas. Los soportes podrían ser, pero sin limitarse, filtros o membranas de NC o nylon (cargadas), silicio, o Portas de vidrio para microscopios cubiertos con aminosilanos, polilisina, aldehídos o epoxy. La sonda es cada una de las muestras del chip. El target es la muestra a analizar: RNA mensajero, RNA total, un fragmento de PCR, etc.

Una secuencia de ácido nucleico o polinucleótido puede comprender las cinco bases que aparecen biológicamente (adenina, guanina, timina, citosina y uracilo) y/o bases distintas de las cinco que aparecen biológicamente. Estas bases pueden servir para distintos propósitos, por ejemplo, para estabilizar o desestabilizar la hibridación; para estimular o inhibir la degradación de la sonda; o como puntos de unión para restos detectables o restos de apantallamiento. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede contener uno o más restos de base

modificados, no estándar, derivatizados, incluyendo, pero sin limitarse a, N<sup>6</sup>-metil-adenina, N<sup>6</sup>-terc-butil-bencil-adenina, imidazol, imidazoles sustituidos, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1- metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético, wybutoxosina, pesudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo (es decir, timina), éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w, 2,6-diaminopurina, y 5-propinil pirimidina. Otros ejemplos de restos de bases modificados, no estándar, o derivatizados pueden encontrarse en las Patentes de EEUU Nos. 6.001.611; 5.955.589; 5.844.106; 5.789.562; 5.750.343; 5.728.525; y 5.679.785. Además, una secuencia de ácido nucleico o polinucleótido puede comprender uno o más restos de azúcares modificados incluyendo, pero sin limitarse a, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y una hexosa.

Otro **aspecto** de la invención se refiere a un programa de ordenador almacenado en el medio legible por un ordenador de la invención, que comprende código de software adaptado para llevar a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

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. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## EJEMPLOS DE LA INVENCION

### Desarrollo de los cebadores y la sonda

5

Esta etapa consiste en la identificación de la secuencia de los primers pangenotípicos mediante técnicas *in silico*. Se ha seleccionado la región ORF3 como diana para el desarrollo de estos primers, puesto que ésta ha sido identificada como la zona ideal para el desarrollo de técnicas de diagnóstico molecular por su bajo perfil de mutaciones entre genotipos/subtipos virales.

10

En la Tabla 1 se muestran las secuencias de las cepas víricas estándar del virus de la hepatitis E con capacidad infectiva a humanos y animales. En rojo se resalta la zona de unión de los primers convencionales utilizados hoy en día en la cuantificación del virus y en naranja la zona de unión de la sonda. Resaltado en amarillo se destaca las mutaciones de las diferentes cepas víricas comparándola con el genotipo 3a, estándar de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (GenBank accession number: AB630970). De esta forma se identifica una secuencia específica de primers con la inclusión de bases degeneradas. Dichas secuencias de primers y sonda pangenotípicos serían:

15  
20

Primer forward: 5'-RGTRGTTTCTGGGGTGAC-3'

Primer reverse: 5'-AKGGRTTGGTTGGRTGA-3'

Sonda marcada: 5'-FAM-TGAYTCYCARCCCTTCGC-TAMRA-3'

Posteriormente, mediante BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool), se ha comprobado la especificidad de la región amplificada por estas secuencias para el virus de la Hepatitis E, sin obtener ninguna secuencia homóloga o con un nivel de similitud superior al 70%.

25

### Desarrollo de la técnica en laboratorio.

Este apartado consiste en la realización de pruebas en el laboratorio de cara al desarrollo de la técnica propuesta.

30

#### *Optimización de condiciones de termociclado*

Se realizó un gradiente de temperatura de 7 puntos, comprendidos entre 51°C y 61°C durante 40 ciclos de amplificación. Este proceso se llevó a cabo mediante qRT-PCR en un termociclador CFX Connect (Biorad; California, EEUU). Se utilizó el kit de QIAGEN OneStep

35

RT-PCR (Qiagen; Hilden, Alemania) junto con los *primers* y sonda propuestos. Este kit presenta las siguientes especificaciones técnicas:

- Mix con dos retrotranscriptasas distintas (SensiScript y OmniScript), con un rango de actuación entre 1 pg y 2 µg; por lo tanto, muestra muy alta sensibilidad.
- Polimerasa Hot-Start que produce amplificaciones extremadamente específicas.
- Buffer de PCR dual-cation que favorece la mayor especificidad en un amplio rango de temperaturas de annealing, a la vez que impide la inhibición de la PCR por las retrotranscriptasas y que inactiva las RNasas. Permite la amplificación de RNA desde 1 pg a 2 µg.

Para la realización de esta prueba se utilizó como muestra problema la cadena estándar de la Organización Mundial de la Salud (OMS), suministrada por Paul-Ehrlich-Institut (code 6329/10), y correspondiente al genotipo 3a con una concentración de 250.000 UI/mL. La temperatura óptima de alineamiento obtenida con este experimento fue de **57.1°C** (Figura 1)

| Genotipo | Referencia GenBank | Inicio secuencia | Secuencia (70bp)                                                      | Primer Estandarizado | Nuevos Primers |
|----------|--------------------|------------------|-----------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------|
| 3a (OMS) | AB630970           | 5304             | GCTGGTTTCCTGGGTTGACAGGGTTGATTCCTGAGGCTTGG CCTCCCTATATTCATCCACCAACCCCT | ✓                    | ✓              |
| 4A       | M7318              | 5261             | GCTGGTTTCCTGGGTTGACAGGGTTGATTCCTGAGGCTTGG AATCCCTATATTCATCCACCAACCCCT | ✓                    | ✓              |
| 1B       | D11092             | 5261             | GCTGGTTTCCTGGGTTGACAGGGTTGATTCCTGAGGCTTGG AATCCCTATATTCATCCACCAACCCCT | ✓                    | ✓              |
| 1C       | X98292             | 5260             | GCTGGTTTCCTGGGTTGACAGGGTTGATTCCTGAGGCTTGG AATCCCTATATTCATCCACCAACCCCT | ✓                    | ✓              |
| 1D       | AY130102           | 5259             | GCTGGTTTCCTGGGTTGACAGGGTTGATTCCTGAGGCTTGG AATCCCTATATTCATCCACCAACCCCT | ✓                    | ✓              |
| 1E       | AY204877           | 5220             | GCTGGTTTCCTGGGTTGACAGGGTTGATTCCTGAGGCTTGG AATCCCTATATTCATCCACCAACCCCT | ✓                    | ✓              |
| 1F       | JF443721           | 5261             | GCTGGTTTCCTGGGTTGACAGGGTTGATTCCTGAGGCTTGG AATCCCTATATTCATCCACCAACCCCT | ✓                    | ✓              |
| 2        | M74506             | 5231             | GCTGGTTTCCTGGGTTGACAGGGTTGATTCCTGAGGCTTGG AATCCCTATATTCATCCACCAACCCCT | ✓                    | ✓              |
| 3A       | AF082843           | 5285             | GCTGGTTTCCTGGGTTGACAGGGTTGATTCCTGAGGCTTGG CCTCCCTATATTCATCCACCAACCCCT | ✓                    | ✓              |
| 3B       | AF083430           | 5287             | GCTGGTTTCCTGGGTTGACAGGGTTGATTCCTGAGGCTTGG CCTCCCTATATTCATCCACCAACCCCT | ✓                    | ✓              |
| 3C       | F1705359           | 5286             | GCTGGTTTCCTGGGTTGACAGGGTTGATTCCTGAGGCTTGG CCTCCCTATATTCATCCACCAACCCCT | ✗                    | ✓              |
| 3E       | AE248521           | 5289             | GCTGGTTTCCTGGGTTGACAGGGTTGATTCCTGAGGCTTGG CCTCCCTATATTCATCCACCAACCCCT | ✓                    | ✓              |
| 3F       | AB369837           | 5269             | GCTGGTTTCCTGGGTTGACAGGGTTGATTCCTGAGGCTTGG CCTCCCTATATTCATCCACCAACCCCT | ✓                    | ✓              |
| 3G       | AF485784           | 5271             | GCTGGTTTCCTGGGTTGACAGGGTTGATTCCTGAGGCTTGG CCTCCCTATATTCATCCACCAACCCCT | ✓                    | ✓              |
| 3H       | JQ013794           | 5217             | GCTGGTTTCCTGGGTTGACAGGGTTGATTCCTGAGGCTTGG CCTCCCTATATTCATCCACCAACCCCT | ✓                    | ✓              |
| 3I       | F1990000           | 5261             | GCTGGTTTCCTGGGTTGACAGGGTTGATTCCTGAGGCTTGG CCTCCCTATATTCATCCACCAACCCCT | ✗                    | ✓              |
| 3J       | AY115468           | 5302             | GCTGGTTTCCTGGGTTGACAGGGTTGATTCCTGAGGCTTGG CCTCCCTATATTCATCCACCAACCCCT | ✓                    | ✓              |
| 4A       | AB197673           | 5300             | GCTGGTTTCCTGGGTTGACAGGGTTGATTCCTGAGGCTTGG CCTCCCTATATTCATCCACCAACCCCT | ✗                    | ✓              |
| 4B       | DQ279391           | 5297             | GCTGGTTTCCTGGGTTGACAGGGTTGATTCCTGAGGCTTGG CCTCCCTATATTCATCCACCAACCCCT | ✗                    | ✓              |
| 4C       | AB074915           | 5286             | GCTGGTTTCCTGGGTTGACAGGGTTGATTCCTGAGGCTTGG CCTCCCTATATTCATCCACCAACCCCT | ✓                    | ✓              |
| 4D       | AY272108           | 5296             | GCTGGTTTCCTGGGTTGACAGGGTTGATTCCTGAGGCTTGG CCTCCCTATATTCATCCACCAACCCCT | ✓                    | ✓              |
| 4E       | AY23745            | 5302             | GCTGGTTTCCTGGGTTGACAGGGTTGATTCCTGAGGCTTGG CCTCCCTATATTCATCCACCAACCCCT | ✓                    | ✓              |
| 4F       | AB230974           | 5302             | GCTGGTTTCCTGGGTTGACAGGGTTGATTCCTGAGGCTTGG CCTCCCTATATTCATCCACCAACCCCT | ✓                    | ✓              |
| 4G       | AB108537           | 5283             | GCTGGTTTCCTGGGTTGACAGGGTTGATTCCTGAGGCTTGG CCTCCCTATATTCATCCACCAACCCCT | ✓                    | ✓              |
| 4H       | GU119961           | 5303             | GCTGGTTTCCTGGGTTGACAGGGTTGATTCCTGAGGCTTGG CCTCCCTATATTCATCCACCAACCCCT | ✓                    | ✓              |
| 4I       | DQ450072           | 5299             | GCTGGTTTCCTGGGTTGACAGGGTTGATTCCTGAGGCTTGG CCTCCCTATATTCATCCACCAACCCCT | ✗                    | ✓              |
| 3ra      | F1906895           | 5344             | GCTGGTTTCCTGGGTTGACAGGGTTGATTCCTGAGGCTTGG CCTCCCTATATTCATCCACCAACCCCT | ✗                    | ✓              |
| 5        | AB573435           | 5305             | GCTGGTTTCCTGGGTTGACAGGGTTGATTCCTGAGGCTTGG CCTCCCTATATTCATCCACCAACCCCT | ✗                    | ✓              |
| 6        | AB502441           | 5303             | GCTGGTTTCCTGGGTTGACAGGGTTGATTCCTGAGGCTTGG CCTCCCTATATTCATCCACCAACCCCT | ✗                    | ✓              |
| 7        | KJ496143           | 5286             | GCTGGTTTCCTGGGTTGACAGGGTTGATTCCTGAGGCTTGG ACTCCCTATATTCATCCACCAACCCCT | ✗                    | ✓              |
| 8        | KJ307867           | 5297             | GCTGGTTTCCTGGGTTGACAGGGTTGATTCCTGAGGCTTGG ACTCCCTATATTCATCCACCAACCCCT | ✓                    | ✓              |

**Tabla 1.** Secuencia de los genotipos y mutaciones en comparación con el genotipo 3a standard de la OMS. El check en verde indica los genotipos detectados con los diferentes métodos de PCR utilizados en los diferentes laboratorios, mientras que una cruz roja indica los genotipos no detectados.

Una vez obtenida la temperatura óptima de annealing, las condiciones óptimas de termociclado se recogen en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Condiciones de termociclado

| Retrotranscripc<br>ión | Desnaturalizac<br>ión de ADN y<br>activación<br>polimerasa | Amplificación (45 ciclos) |                       |                          |
|------------------------|------------------------------------------------------------|---------------------------|-----------------------|--------------------------|
|                        |                                                            | Desnaturalizac<br>ión     | Alineamient<br>o      | Extensión                |
| 30 minutos<br>a 50°C   | 15 minutos<br>a 95°C                                       | 10 segundos<br>a 95°C     | 30 segundos<br>a 57°C | 20<br>segundos<br>a 60°C |

## 5 Concentración óptima de primers y sonda marcada

Los *primers* y sonda, suministrado por la casa comercial Integrated DNA Thecnology (IDT) y purificados mediante técnica *desalting*, se reconstituyeron a una concentración de 20uM y la sonda marcada a 15uM.

10

Se establecieron tres concentraciones distintas de primers dentro de los límites aconsejados por el fabricante (0,5-1 uM). De esta forma, comprobamos el rendimiento de los *primers* a las concentraciones de 0,25 uM, 0,5 uM, y 1 uM, mediante replicas. Los resultados obtenidos mostraron un mejor rendimiento con la concentración de 1 uM (Figura 2). Las pruebas fueron realizadas con una dilución 1/10 de la cadena estándar de la OMS.

15

Posteriormente fueron probadas concentraciones superiores (1,5 uM y 1,75 uM) pero el rendimiento fue subóptimo comparado con 1 uM (Figura 3).

20

Así mismo se determinó la concentración óptima para la sonda, siendo la concentración óptima 0,45 uM (Figura 4).

## Determinación del template óptimo y límite de detección para la reacción.

25

Con el objetivo de obtener el menor límite de detección posible y de esta forma la posibilidad de detectar muestras con baja carga viral, se determinó el volumen de *template*. Para ello se realizaron determinaciones con un volumen creciente de *template*, en este caso, 5, 10, 15, 20 y 25 uL de la cadena estándar de la OMS partiendo de una dilución 1/512, correspondiente a 976,5 UI/mL. En la tabla 3 se detallan las replicas positivas para cada uno de los *templates* utilizados.

30

| Concentración<br>(UI/mL) | Volumen Template |       |       |       |       |
|--------------------------|------------------|-------|-------|-------|-------|
|                          | 5 uL             | 10 uL | 15 uL | 20 uL | 25 uL |
| 976,5                    | 16/16            | 16/16 | 16/16 | 16/16 | 16/16 |
| 488,2                    | 15/16            | 16/16 | 16/16 | 16/16 | 16/16 |
| 244,1                    | 10/16            | 16/16 | 16/16 | 16/16 | 16/16 |
| 122                      | 10/16            | 16/16 | 16/16 | 16/16 | 16/16 |
| 61                       | 9/16             | 13/16 | 15/16 | 16/16 | 16/16 |
| 30,5                     | 4/16             | 5/16  | 4/16  | 13/16 | 16/16 |
| 15,25                    | 3/16             | 3/16  | 5/16  | 9/16  | 11/16 |
| 7,62                     | 0/16             | 0/16  | 0/16  | 3/16  | 5/16  |
| 3,81                     | 0/16             | 0/16  | 0/16  | 0/16  | 1/16  |

**Tabla 3.** Replicas para cada uno de los *templates* utilizados en distintas concentraciones de la cadena estándar de la OMS.

- 5 El límite de detección de la técnica para cada uno de los *templates* utilizados es el siguiente (Tabla 4).

| Cantidad de <i>template</i> | Límite de detección (95% IC) |
|-----------------------------|------------------------------|
| 5 uL                        | 439,34 (285,34-1.225,13)     |
| 10 uL                       | 74,16 (60,8-101,09)          |
| 15 uL                       | 64,9 (53,1-88,53)            |
| 20 uL                       | 35,78 (28,83-51,39)          |
| 25 uL                       | 21,86 (17,38-34,30)          |

**Tabla 4.** Límite de detección para cada cantidad de template empleada.

- 10 Ante estos resultados y para optimizar la detección de muestras con una carga viral muy baja se recomienda que el volumen de *template* utilizado sea de **25 uL**. El límite de detección con este volumen de *template* es de **21,86 UI/mL**, calculado mediante análisis Probit

- 15 **Determinación límite mínimo de cuantificación de la técnica y diseño de una curva patrón.**

Posteriormente, se realizó una RT-PCR para establecer el límite de cuantificación. Además, se diseñó una curva patrón con la cadena de la OMS anteriormente

mencionada. Esta prueba consistió en una qRT-PCR de 18 puntos de dilución con un factor de dilución de 1:2. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

| Dilución | UI/mL   | CQ    |
|----------|---------|-------|
| 1/1      | 500,000 | 29,50 |
| 1/2      | 250,000 | 29,87 |
| 1/4      | 125,000 | 30,37 |
| 1/8      | 62,500  | 31,09 |
| 1/16     | 31,250  | 32,01 |
| 1/32     | 15,625  | 33,31 |
| 1/64     | 7,812.5 | 33,30 |
| 1/128    | 3,906.2 | 34,47 |
| 1/256    | 1,953.1 | 36,10 |
| 1/512    | 976.5   | NA    |
| 1/1024   | 488.2   | 39,03 |
| 1/2048   | 244.1   | 39,31 |
| 1/4096   | 122     | 39,01 |
| 1/8192   | 61      | 41,40 |
| 1/16384  | 30.5    | NA    |
| 1/32868  | 15.25   | 41,78 |
| 1/65536  | 7.62    | 41,24 |
| 1/131072 | 3.81    | NA    |

**Tabla 5.** qRT-PCR realizada para el diseño de la curva patrón y la determinación del límite de cuantificación de la técnica.

### Sensibilidad en panel de cadenas virales estándar de la OMS

En este paso se verificó la sensibilidad de la técnica frente al panel de cadenas estándar de la OMS suministrado por Paul-Ehrlich-Institut (código 8578/13). Este panel contiene 11 muestras positivas para VHE que incluyen los siguientes genotipos y subtipos virales: 1a (8567/13), 1a (8568/13s), 1e (8569/13), 3b (8570/13), 3c (8571/13), 3e (8572/13), 3f (8573/13), 3ra (8574/13s), 4c (8575/13), 4g (8576/13), 2a (8577/13s). La información adicional de este panel se especifica en la Tabla 6.

| Cadena  | Genotipo | Naturaleza | Media carga viral (UI/mL)<br>IC95% | Min<br>(UI/mL) | Max<br>(UI/mL) |
|---------|----------|------------|------------------------------------|----------------|----------------|
| 8567/13 | 1a       | plasma     | 436 (165-1.148)                    | 27             | 12.589         |
| 8568/13 | 1a       | fecal      | 17.782 (7.413-42.657)              | 3.548          | 288.403        |
| 8569/13 | 1e       | plasma     | 1.778 (812-3.890)                  | 251            | 65.565         |
| 8570/13 | 3b       | plasma     | 15.848 (13.182-19.054)             | 6.309          | 37.153         |
| 8571/13 | 3c       | plasma     | 2.511 (1.862-3.388)                | 630            | 7.585          |
| 8572/13 | 3e       | plasma     | 3.162 (2.290-4.365)                | 977            | 10.471         |
| 8573/13 | 3f       | plasma     | 6.918 (3.981-11.748)               | 251            | 138.038        |
| 8574/13 | 3ra      | fecal      | 95.499 (53.703-173.780)            | 22.387         | 7.585.77       |
| 8575/13 | 4c       | plasma     | 11.748 (6.606-20.417)              | 1.071          | 234.422        |
| 8576/13 | 4g       | plasma     | 5.888 (3.090-10.964)               | 1.348          | 112.201        |
| 8577/13 | 2a       | fecal      | 263.026 (125.892-549.540)          | 1.862          | 1.258.92       |
| s       |          |            |                                    |                | 5              |

**Tabla 6.** Panel de cadenas estándar de la OMS.

En la Figura 4 puede observarse como la técnica fue capaz de detectar todos los genotipos presentes en este panel de 11 genotipos.

Posteriormente se realizaron 10 replicas para cada uno de los genotipos de este panel y de esta forma obtendríamos una media Cq. Con esta media y la curva patrón diseñada en el apartado 2.4., obtendríamos la carga viral de cada uno de los genotipos para esta técnica propuesta (Tabla 7).

| Genotipo    | Media Cq | Carga viral PanHEVnotypic |
|-------------|----------|---------------------------|
| 1a          | 37,22    | 520                       |
| 1a (fecal)  | 32,12    | 42.720                    |
| 1e          | 35,51    | 2.320                     |
| 3b          | 32,60    | 28.240                    |
| 3c          | 36,02    | 1.480                     |
| 3e          | 36,06    | 1.440                     |
| 3f          | 33,99    | 8.520                     |
| 3ra (fecal) | 29,29    | 448.840                   |
| 4c          | 33,32    | 15.200                    |
| 4g          | 35,57    | 2.200                     |
| 2a (fecal)  | 29,17    | 1.523.960                 |

**Tabla 7.** Valores de Cq y de carga viral obtenidos utilizando la técnica desarrollada en el proyecto para diferentes genotipos virales suministrados por la OMS.

- 5 Ninguna de las cargas virales obtenidas por la técnica propuesta está por debajo del mínimo obtenido por la OMS. Incluso algunos genotipos son detectados con una carga viral superior al máximo obtenido por la OMS.

#### Capacidad de detección de la técnica de cadenas sintéticas víricas de genotipos emergentes

Para comprobar la capacidad de detección del procedimiento sobre genotipos virales emergentes (genotipos 5, 6, 7 y 8) se realizó la síntesis de un fragmento consistente con la región ORF3 de los mismos por parte de la empresa IDT. Las cadenas y secuencias sintetizadas fueron:

Genotipo 5 (Genbank: AB573435): 339pb

5' atgccaccatgcgccctagggctatttgcgtgctgctgctgcttctgcctatgttggccgcgccaccggccggccagt  
cgtctggccgccgtcgcgggcggtgtagcggtgtaggtggttctggggtgaccgggtgactctcagcccttc  
gccctcccctatattaccaaccaaccccttgcacccgataccatcgctgcaaccgggactggagctcgtctcggca  
gtcagcccgctccacttggtccgctggcgcatcagaccagcgccccccgctgcctccgctgtagatctaccca  
accggggcttcgccgttga3'

Genotipo 6 (Genbank: AB602441): 33bp

5' atgccaccatgctgcttagggctgtattgctgctgttctctatgcttctgcctatgctgcccgcgccaccggccgggtcagc  
cgtctgattacagattacagagcgggcggttccggaggtggttctggggtgaccgggtgactctcagcccttcgccctccc

ctatattcacccaaccaaccccttgcacccgatgtttccacttcgattacagattacacccgcgcacggcaggcagcccgt  
ccactcggctccgcctggcgcgaccagtcccagcgccctccgcctctgcacgtcgtagacctaccccagctggggctt  
cgccgttga3´

5 Genotipo 7 (Genbank: KJ496143): 342bp

5´atgggtacacatgcgcccctcgggctatgttgccttgctcttgcctatgctgcccgcgccaccggccggtca  
gtcgtctggccgtcgccgtggcgccgcagcggcggtccggcggtggttctggggtgacagggttgattctcagccctt  
cgactcccctatattcatccaaccaacccattcgccgtgatgtctccgcagcatccaggctctgggactggccttcgcca  
atcgggcccgaccactcgggtaccgcttggcgtgaccaatcccagcgcccccccgctccactcgccgcccgatctgccccca  
10 tccggggctgcgccgtga3´

Genotipo 8 (Genbank: KX387867): 342bp

5´atgggtacatcatgtgcactcgggctgtattgttgccttgctcttgcctatgctgcccgcgccaccggccggtcag  
ccgtctggccgccgtcgtggcgccgcagcggcggtccggcggtggttctggggtgaccgggttgattctcagcccttc  
15 gcactcccctatattcatccaaccaaccccttgcgcagacatcacctctcatccggggctgggtctgcacctcgccagc  
catcccgaccactcgggtaccgcttggcgcgaccaatcccagcgcccccgccgtccactcgtcgccgatctgccccgc  
tggggcagcgccgttaa3´

20 Como control de síntesis se empleo la secuencia de la cadena de genotipo 1a  
(8567/13) del panel de la OMS. Las secuencias se reconstituyeron a la concentración  
recomendada por el fabricante (10ng/uL). En la Figura 5 puede observarse como la  
técnica fue capaz de detectar todos los genotipos sintéticos.

## REIVINDICACIONES

- 1.- Un juego de cebadores nucleotídicos de secuencia SEQ ID NO. 1 y SEQ ID NO: 2.
- 5 2.- Una sonda nucleotídica de secuencia SEQ ID NO: 3.
- 3.- Un método *in vitro* de diagnóstico de la infección por VHE en un individuo que comprende:
  - a) obtener un producto de amplificación del virus a partir de una muestra biológica
  - 10 aislada de dicho individuo usando los cebadores según la reivindicación 1, y
  - b) cuantificar el producto de amplificación obtenido en el paso (a) mediante una sonda según la reivindicación 2.
- 4.- El método de diagnóstico según la reivindicación 3, donde la detección por VHE se
- 15 realiza mediante qRT-PCR.
- 5.- El método de diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones 3-4, donde la/s retrotranscriptasa/s tienen un rango de actuación de al menos entre 1 pg y 2 µg.
- 20 6.- Un kit o dispositivo de diagnóstico que comprende un juego de cebadores nucleotídicos según la reivindicación 1 y/o una sonda según la reivindicación 2.
- 7.- El uso del kit o dispositivo de diagnóstico según la reivindicación anterior para el diagnóstico de la infección por VHE en un individuo.
- 25 8.- Un cebador de secuencia SEQ ID NO. 1 para su uso como medicamento.
- 9.- Un cebador de secuencia SEQ ID NO. 2 para su uso como medicamento.
- 30 10.- Una sonda nucleotídica de secuencia SEQ ID NO: 3 para su uso como medicamento.
- 11.- El cebador según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, y/o la sonda según la reivindicación 10, para su uso en el diagnóstico de la infección por VHE en un
- 35 individuo.

DIBUJOS

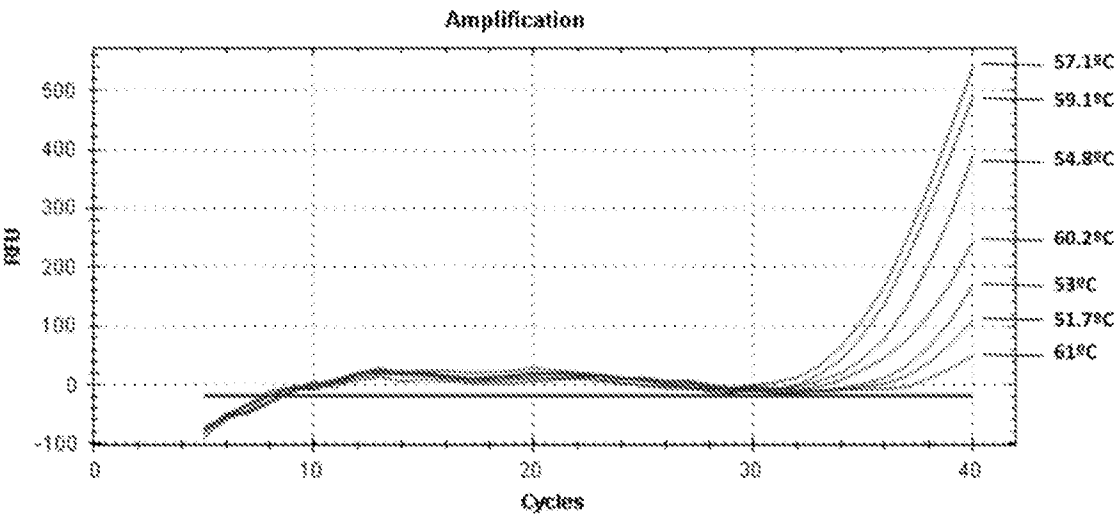


Fig. 1

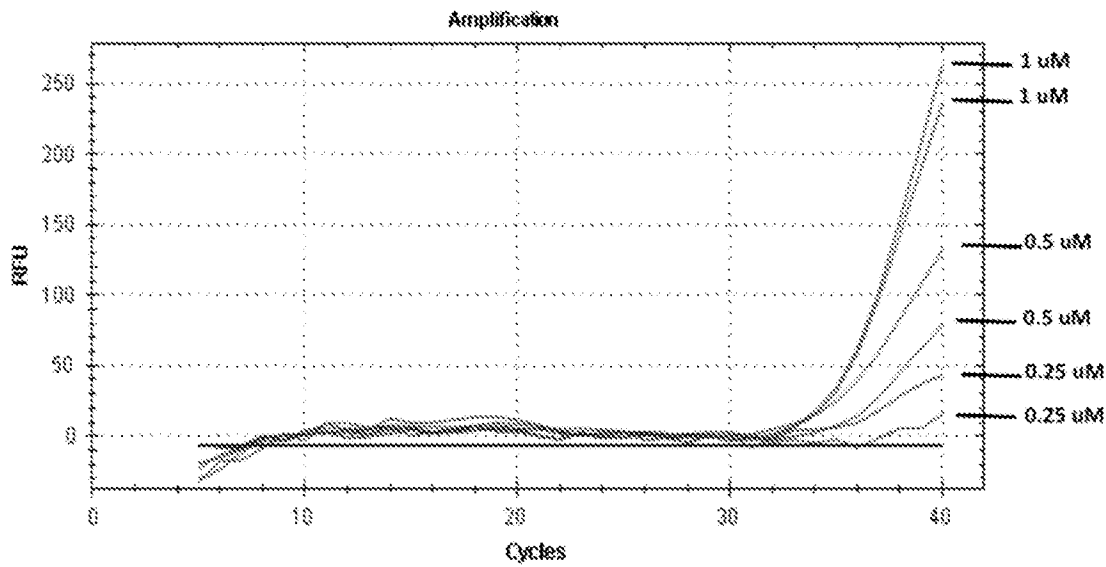


Fig. 2

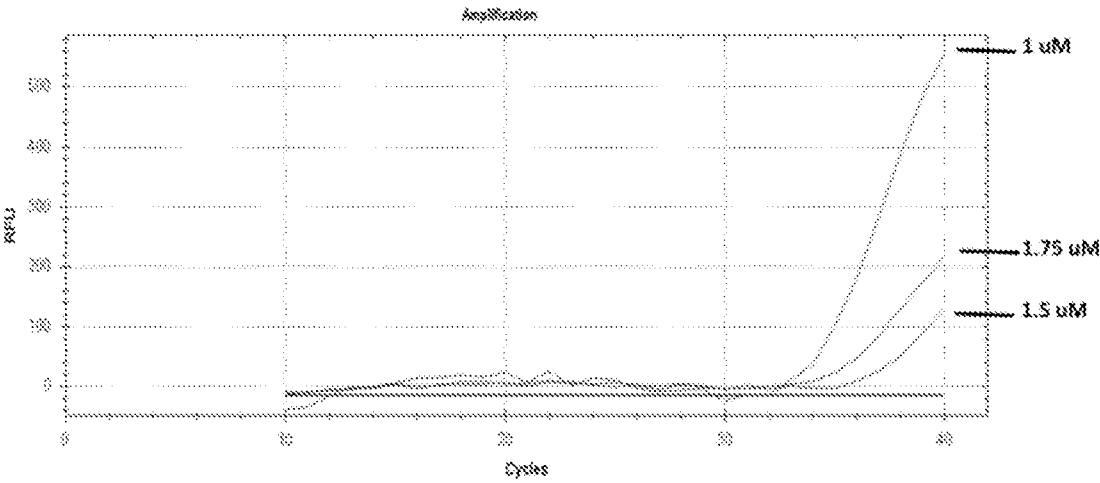


Fig. 3

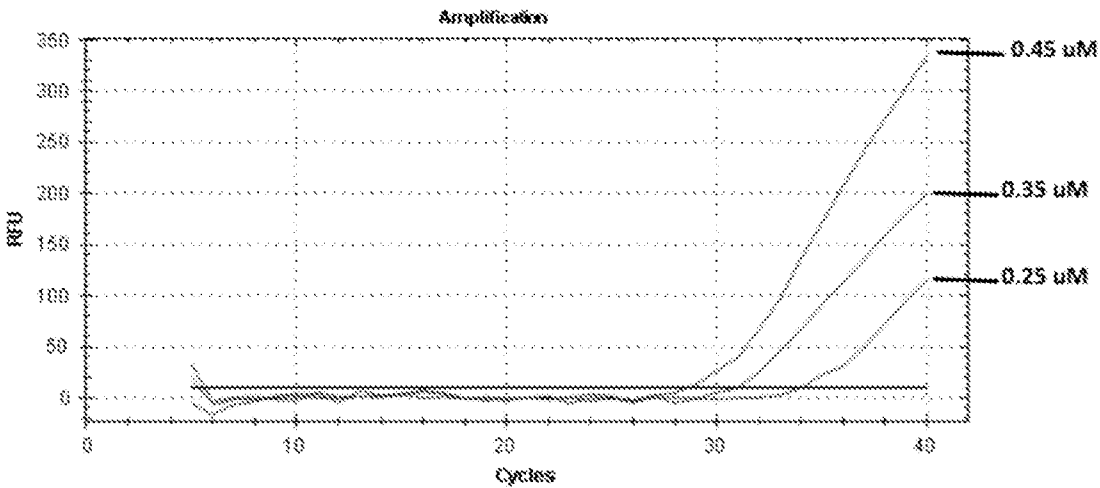


Fig. 4

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2019/070764

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**C12Q1/686** (2018.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

**C12Q**

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

**EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, EMBASE/Elsevier, MEDLINE/NLM y Bases de Texto TXT**

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                          | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | RIVERO-JUAREZ A et al.. "Detection of hepatitis E virus RNA in saliva for diagnosis of acute infection".<br>Zoonoses and Public Health AUG 2018. 31/07/2018,<br>Vol. 65, N° 5, Pages 584-588, ISSN 1863-1959(print)<br>ISSN 1863-2378(electronic),<br><DOI: doi:10.1111/zph.12472> see paragraph 2.3                                        | 1-11                  |
| X         | RISALDE MARIA A et al.. "Persistence of hepatitis E virus in the liver of non-viremic naturally infected wild boar".<br>PLoS One NOV 8 2017. 08/11/2017,<br>Vol. 12, N° 11, Pages Article No.: e0186858,<br>ISSN 1932-6203(print) ISSN 1932-6203(electronic),<br><DOI: doi:10.1371/Journal.pone.0186858><br>see paragraph "Molecular Study" | 1-11                  |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

|                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Special categories of cited documents:                                                                                                                                | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention                                         |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.                                                               |                                                                                                                                                                                                                                             |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                             |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone                                                                |
| "O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.                                                                                           | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed                                                                  | "&" document member of the same patent family                                                                                                                                                                                               |

Date of the actual completion of the international search  
**17/01/2020**

Date of mailing of the international search report  
**(22/01/2020)**

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer  
M. García Coca

Telephone No. 91 3493411

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ES2019/070764

| C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                          |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Category<br>*                                         | Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Relevant to claim<br>No. |
| A                                                     | <p>RIVERO A. et al . "Documento of consenso of GEHEP perteneciente a la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) sobre el diagnóstico, manejo y prevención de la infección por el virus de la Hepatitis E" . February 2018, Pages 1-76 [on line][retrieved on 16/01/2020].<br/>Retrieved of Internet &lt;URL:<br/><a href="https://seimc.org/contenidos/gruposdeestudio/gehep/dcientificos/documents/gehep-seimc-de-2018-HepatitisE.pdf">https://seimc.org/contenidos/gruposdeestudio/gehep/dcientificos/documents/gehep-seimc-de-2018-HepatitisE.pdf</a> &gt;<br/>the whole document.</p> | 1-11                     |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/ES2019/070764

**Box No. I      Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:  
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.  
☒ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:  
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).  
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

The sequences disclosed in the description shall be presented in the format defined in WIPO standard ST.25 (Rule 5.2).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/ES2019/070764

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## SUPPLEMENTAL SHEET: CONTINUATION OF BOX III

Owing to the manner in which the claims were drafted, the international application contains no single general concept, and thereby contravenes PCT Rule 13.1.

The general concept according to claim 1 is a set of nucleotide primers with SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2, while the concept according to claim 2 is a nucleotide probe with sequence SEQ ID NO:3. Therefore, there is no single general concept, since there is no technical relationship among these claims involving one or more of the same or corresponding special technical features, and likewise since no other features have been found that could be regarded as special features (PCT Rule 13.2), there is a lack of unity of invention.

This lack of unity of invention would be resolved by making the present claims 1 and 2 dependent on claim 3, given that both the set of primers and the probe are required in order to carry out the diagnostic method claimed in claim 3. This was, therefore, taken into account in the establishment of the present report and the report was established for all of the claims.

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2019/070764

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD **C12Q1/686** (2018.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)  
**C12Q**

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

**EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, EMBASE/Elsevier, MEDLINE/NLM y Bases de Texto TXT**

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes                                                                                                                                                                                                                                                      | Relevante para las reivindicaciones nº |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| X          | RIVERO-JUAREZ A et al.. "Detection of hepatitis E virus RNA in saliva for diagnosis of acute infection". Zoonoses and Public Health AUG 2018. 31/07/2018, Vol. 65, Nº 5, Páginas 584-588, ISSN 1863-1959(print) ISSN 1863-2378(electronic), <DOI: doi:10.1111/zph.12472> ver apartado 2.3                                     | 1-11                                   |
| X          | RISALDE MARIA A et al.. "Persistence of hepatitis E virus in the liver of non-viremic naturally infected wild boar". PLoS One NOV 8 2017. 08/11/2017, Vol. 12, Nº 11, Páginas Article No.: e0186858, ISSN 1932-6203(print) ISSN 1932-6203(electronic), <DOI: doi:10.1371/Journal.pone.0186858> ver apartado "Molecular Study" | 1-11                                   |

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

|                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Categorías especiales de documentos citados:                                                                                                                                               | "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.     |
| "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.                                                                                      | "X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.                                                                                    |
| "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.                                                                   | "Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia. |
| "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada). | "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.                                                                                                                                                                                                                 |
| "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                |

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.  
**17/01/2020**

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.  
**22 de enero de 2020 (22/01/2020)**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
**OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS**  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado  
**M. García Coca**  
Nº de teléfono 91 3493411

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2019/070764

| C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                        |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Categoría *                                          | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Relevante para las reivindicaciones nº |
| A                                                    | <p>RIVERO A. et al . "Documento de consenso de GEHEP perteneciente a la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) sobre el diagnóstico, manejo y prevención de la infección por el virus de la Hepatitis E". Febrero 2018, Páginas 1-76 [en línea][recuperado el 16/01/2020]. Recuperado de Internet</p> <p>&lt;URL:<a href="https://seimc.org/contenidos/gruposdeestudio/gehep/dcientificos/documentos/gehep-seimc-dc-2018-HepatitisE.pdf">https://seimc.org/contenidos/gruposdeestudio/gehep/dcientificos/documentos/gehep-seimc-dc-2018-HepatitisE.pdf</a> &gt; todo el documento.</p> | 1-11                                   |

**Recuadro I Secuencia(s) de nucleótidos y/o de aminoácidos (continuación del punto 1.c de la primera hoja)**

1. Con respecto a **las listas de secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos** divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, la búsqueda se ha llevado a cabo sobre la base de una lista de secuencias:
  - a. ☒ que forma parte de la solicitud internacional tal y como se presentó:
    - ☐ en formato de archivo de texto según Anexo C/ST.25.
    - ☒ en formato papel o en formato de archivo de imagen.
  - b. ☐ presentada junto con la solicitud internacional de acuerdo a la Regla 13.ter.1a) del PCT exclusivamente a los fines de la búsqueda, en formato de archivo de texto según Anexo C/ST.25.
  - c. ☐ Presentada con posterioridad a la fecha de presentación únicamente a los fines de la búsqueda internacional:
    - ☐ en formato de archivo de texto según Anexo C/ST.25 (Regla 13ter.1a)).
    - ☐ en formato papel o en formato de archivo de imagen (Regla 13ter.1b) e Instrucciones Administrativas, sección 713).
2. ☐ Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la que formaba parte de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.
3. Comentarios adicionales:

**Las secuencias que se describen en la memoria deben presentarse según el formato definido en la norma ST.25 de la OMPI. (Regla 5.2)**

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2019/070764

## Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones n°s:  
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☐ Las reivindicaciones n°s:  
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. ☐ Las reivindicaciones n°s:  
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

## Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

### Ver Recuadro Suplementario.

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☒ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:

### Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

**RECUADRO SUPLEMENTARIO: CONTINUACIÓN DEL RECUADRO III**

Debido a la forma de redactar las reivindicaciones, la solicitud internacional no presenta un concepto general único tal y como se exige en la Regla 13.1 PCT.

El concepto general que se desprende de la reivindicación 1, es un juego de cebadores nucleotídidos de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, mientras que el concepto que se desprende de la reivindicación 2, es una sonda nucleotídica de SEQ ID NO:3. Por lo tanto, no existe un concepto general único, ya que entre estas reivindicaciones no existe una relación técnica relativa a uno o varios elementos técnicos particulares idénticos o correspondientes, y como tampoco se encuentran otras características que puedan considerarse como elementos particulares en el sentido de la Regla 13.2 PCT, existe falta de unidad de invención.

Esta falta de unidad de invención quedaría solventada haciendo depender las actuales reivindicaciones 1 y 2 de la reivindicación 3, puesto que para poder realizar el método de diagnóstico reivindicado en la reivindicación 3 son necesarios tanto el juego de cebadores como la sonda. Por lo tanto, a la hora de realizar el presente informe se ha tenido esto en cuenta y se ha realizado el informe para todas las reivindicaciones.