

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 489**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2013 PCT/EP2013/057783**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2013 WO13156432**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2013 E 13716295 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2839039**

54 Título: **Ensayo de VHE**

30 Prioridad:

18.04.2012 US 201261625816 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

13.10.2017

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**LEYING, HERMANN;
MYERS, THOMAS W.;
NEWTON, NICOLAS;
RUSSMANN, EBERHARD;
SAN FILIPPO, JOSEPH;
SCHOENBRUNNER, NANCY;
WILTS, HEIKE;
WU, XIAONING;
YOUNG, KAREN KWOK YING y
ZIMMERMANN, DIRK**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 637 489 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ensayo de VHE

5 La invención se refiere a pruebas de diagnóstico, conjuntos de cebadores, conjuntos de oligonucleótidos y kits para detectar infección por VHE.

10 La infección por VHE produce hepatitis E, una enfermedad aguda. El VHE es un virus de ARN codificante monocatenario, sin envoltura, que se clasifica en la familia *Hepeviridae*. Hay cuatro genotipos principales de VHE que causan infecciones en seres humanos, los genotipos 1, 2, 3 y 4. Las pruebas diagnósticas para el VHE son importantes para las personas para las que se han excluido otras causas de hepatitis aguda.

15 Se han usado diferentes regiones del VHE para el diseño de pruebas basadas en ácidos nucleicos para el VHE. La ORF2 y ORF3 de VHE se han usado principalmente para detectar el VHE por amplificación de ácido nucleico. Los documentos JP04080995 y JP04127722 han propuesto el uso de cebadores degenerados con múltiples posiciones degeneradas para una estrategia de amplificación con cebador interno basada en cebadores que están parcialmente localizados en la región 5' UTR del VHE.

20 **Sumario de la invención**

La invención se refiere a un procedimiento para amplificar simultáneamente los genotipos 1, 2, 3 y/o 4 del VHE si están presentes en una muestra biológica, que comprende las etapas de

(a) aislar ácidos nucleicos presentes en la muestra biológica;

25 (b) amplificar los ácidos nucleicos aislados en la etapa (a) usando un cebador directo no degenerado y al menos un cebador inverso no degenerado, en el que los cebadores directo e inverso son capaces de amplificar los genotipos 1, 2, 3 y 4 del VHE, en el que la secuencia de ácido nucleico del cebador directo comprende la SEQ ID NO: 6 y la secuencia de ácido nucleico de uno o más cebadores inversos comprende una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 7 a 14.

30 En un aspecto, la invención se refiere a un conjunto de cebadores que comprende un cebador directo y al menos un cebador inverso, en el que la secuencia de ácido nucleico del cebador directo comprende la SEQ ID NO: 6 y en el que la secuencia de ácido nucleico de al menos un cebador inverso, o el cebador inverso, se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 7 a 14.

35 Enouf *et al.* (J. Med. Virol 78 (2006), 1076 – 1082) divulga una prueba de RT-PCR para los genotipos a, 2, 3 y 4 del virus de la hepatitis E usando un conjunto de cebadores directos e inversos y una sonda de una secuencia de la región ORF2. Esta región parecía ser más adecuada para detectar los cuatro genotipos que la región I (1 a 150 pb) y la región III (6300 a 6500 pb).

40 Troxler *et al.* (J. Clin. Microbiol 49 (4) (2011), 1339 – 1346) divulga una prueba de RT-PCR para el virus de la hepatitis E aviar, que comparte aproximadamente de un 50 a un 60 % de identidad de secuencia en comparación con el virus de la hepatitis E humano, usando cebadores y una sonda degenerada dirigida a la ORF3 del virus de la hepatitis C aviar. Fue necesaria una sonda degenerada ya que una sonda no degenerada no podía detectar el virus de la hepatitis E aviar en todas las muestras. Debido al bajo grado de identidad, los procedimientos moleculares de detección del virus de la hepatitis E de mamíferos no son adecuados para la detección del virus de la hepatitis E aviar.

45 Wenzel *et al.* (J. Clin. Virol 52 (2011), 50 – 54) divulga un ensayo de PCR en tiempo real para detectar el virus de la hepatitis E porcina usando un cebador directo e inverso y una sonda de ORF3. La publicación no menciona si se pueden detectar diferentes genotipos con esta prueba. Por el contrario, informa de dos nuevos subtipos del genotipo 3 en cerdos.

50 Jothikumar *et al.* (J. Virol. Methods 131 (2006), 65 - 71) divulga una prueba de PCR en tiempo real para la detección del virus de la hepatitis E porcina usando un cebador directo e inverso y una sonda de ORF3 con una región altamente conservada entre los 4 genotipos conocidos. Las secuencias elegidas del cebador y de la sonda estaban completamente conservadas entre los genotipos, con la excepción del cebador directo en el que, en una variante del genotipo 3, existía un emparejamiento erróneo.

55 En un aspecto, la invención se refiere a un conjunto de oligonucleótidos, en el que dicho conjunto consiste en un conjunto de cebadores como se describe en el presente documento y una sonda, en el que dicha sonda comprende al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 15 a 19 o una secuencia complementaria de la misma.

60 En un aspecto, la invención se refiere al uso de un conjunto de cebadores u oligonucleótidos como se describe en el presente documento para detectar simultáneamente los genotipos 1, 2, 3 y/o 4 del VHE en una muestra biológica.

En un aspecto, la invención se refiere a un kit que comprende una ADN polimerasa dependiente de molde, nucleótidos y un conjunto de cebadores u oligonucleótidos como se describe en el presente documento.

Breve descripción de las figuras

5 La figura 1 muestra la secuencia de trabajo para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de una muestra líquida.

Descripción detallada

10 La invención se refiere a un procedimiento para amplificar simultáneamente los genotipos 1, 2, 3 y/o 4 del VHE si están presentes en una muestra biológica, que comprende las etapas de

(a) aislar ácidos nucleicos presentes en la muestra biológica;

15 (b) amplificar los ácidos nucleicos aislados en la etapa (a) usando un cebador directo no degenerado y al menos un cebador inverso no degenerado, en el que los cebadores directo e inverso son capaces de amplificar los genotipos 1, 2, 3 y 4 del VHE, en el que la secuencia de ácido nucleico del cebador directo comprende la SEQ ID NO: 6 y la secuencia de ácido nucleico de uno o más cebadores inversos comprende una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 7 a 14.

20 En un modo de realización específico, la secuencia de ácido nucleico del cebador directo comprende la SEQ ID NO: 6 y la secuencia o secuencias de ácido nucleico de los al menos un cebador inverso se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7 a 14. En otro modo de realización específico, la secuencia de ácido nucleico del cebador directo comprende la SEQ ID NO: 6 y las secuencias de ácido nucleico de una mezcla de dos cebadores inversos comprende la SEQ ID NO: 13 y la SEQ ID NO: 14. En otro modo de realización específico, la secuencia de ácido nucleico del
25 cebador directo consiste en la SEQ ID NO: 6 y la secuencia de ácido nucleico del cebador inverso comprende la SEQ ID NO: 7. En otro modo de realización específico, la secuencia de ácido nucleico del cebador directo consiste en la SEQ ID NO: 6 y la secuencia de ácido nucleico del cebador inverso comprende la SEQ ID NO: 13. En otro modo de realización específico, la secuencia de ácido nucleico del cebador directo consiste en la SEQ ID NO: 6 y la secuencia de ácido nucleico del cebador inverso comprende la SEQ ID NO: 11.

30 El procedimiento tiene la ventaja de que los genotipos 1, 2, 3 y 4 del VHE se pueden amplificar de forma simultánea y eficaz en una única reacción.

En un modo de realización específico, los ácidos nucleicos se aíslan por unión a una fase sólida.

35 En un modo de realización específico, el procedimiento comprende adicionalmente poner en contacto los ácidos nucleicos amplificados con una sonda en condiciones suficientes para unir la sonda a los ácidos nucleicos amplificados. En un modo de realización específico del mismo, la sonda comprende de al menos 22 a 35 nucleótidos contiguos de la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 15 a 19 o 25 o una secuencia complementaria de la misma. En un modo de
40 realización específico, la secuencia de ácido nucleico de la sonda consiste en una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 15 a 19 o 25 o una secuencia complementaria de la misma. En un modo de realización específico del mismo, la secuencia de ácido nucleico de la sonda consiste en una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 15 a 18 o 25 o una secuencia complementaria de la misma. En un modo de realización específico, dicha sonda comprende un fluoróforo acoplado al extremo 5' de la sonda y un desactivador, en el que la separación entre el fluoróforo y el desactivador
45 comprende al menos 9 nucleótidos.

Otros modos de realización específicos del procedimiento se describen a continuación.

50 La invención también se refiere a un procedimiento de detección simultánea de los genotipos 1, 2, 3 y/o 4 del VHE si están presentes en una muestra biológica, que comprende las etapas de

(a) aislar ácidos nucleicos presentes en la muestra

55 (b) amplificar los ácidos nucleicos aislados en la etapa (a) usando un cebador directo no degenerado y al menos un cebador inverso no degenerado, en el que los cebadores directo e inverso son capaces de amplificar los genotipos 1, 2, 3 y 4 del VHE, en el que la secuencia de ácido nucleico del cebador directo comprende la SEQ ID NO: 6 y la secuencia de ácido nucleico de uno o más cebadores inversos comprende una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 7 a 14, y

60 (c) detectar el ácido nucleico amplificado obtenido en la etapa (b) como una indicación de la presencia de al menos uno de los genotipos 1, 2, 3 y/o 4 del VHE en la muestra biológica.

El término "detección", como se usa en el presente documento, se refiere a la detección de una señal que se correlaciona con la presencia del ácido nucleico amplificado. La detección puede ser cuantitativa o cualitativa. La detección del ácido nucleico amplificado proporciona una indicación de la presencia de al menos uno de los genotipos 1, 2, 3 y/o 4 del VHE en la muestra biológica.

La expresión "detección simultánea", como se usa en el presente documento, se refiere al diseño del procedimiento para detectar diferentes genotipos del VHE en una única mezcla de reacción. Esto hace necesario que las secuencias del cebador y la sonda usadas en el procedimiento sean capaces de generar una señal de detección razonable para todos los genotipos que se tienen que detectar simultáneamente si están presentes en la muestra. Por supuesto, si está presente solamente un genotipo en una muestra, el procedimiento detectará únicamente ese genotipo, incluso si es capaz de detectar más de uno de GT1, GT2, GT3 y/o GT4 en una única reacción. La detección simultánea de varios genotipos (a continuación en el presente documento abreviado como GT) a menudo requiere el uso de cebadores y sondas degeneradas para asegurar que se detectan todos los genotipos requeridos, salvo que estén disponibles regiones altamente conservadas que sean adecuadas para diseñar cebadores y sondas no degeneradas para la amplificación que permitan la detección de todos los genotipos. Estas regiones no siempre se pueden identificar. La técnica anterior identificó regiones diferentes de 5' UTR, tales como la región de la cápside, como adecuadas para diseñar ensayos para detectar el VHE. Las referencias de la técnica anterior citadas anteriormente propusieron el uso de cebadores degenerados, algunos de los cuales comprenden más de 3 posiciones degeneradas y son, por tanto, altamente degenerados, desde la región 5' UTR para una estrategia de cebador interno. El requisito de los cebadores altamente degenerados y la necesidad de realizar una PCR con cebadores internos sugieren que el procedimiento divulgado en la técnica anterior basado en la detección de 5' UTR no es tan sensible como los procedimientos que usan secuencias cebadoras de las regiones conservadas de ORF2 u ORF3. El término "5' UTR" se usa en el presente documento para secuencias diana, cebadores y amplicones que se superponen al menos parcialmente con la secuencia 5' UTR del VHE.

El término "muestra biológica" se refiere a un material que se puede someter a un ensayo de diagnóstico dirigido a ácidos nucleicos y que normalmente deriva de una fuente biológica. En algunos modos de realización, dicha muestra biológica deriva de un ser humano y es un líquido corporal. En un modo de realización de la invención, la muestra biológica es sangre, plasma, suero, orina, esputo, sudor, exudado, heces pipeteables o líquido cefalorraquídeo humano. La muestra biológica puede ser también un tejido del que se pueden extraer ácidos nucleicos diana.

El término "no degenerado", como se usa en el presente documento, se refiere a un ácido nucleico cebador o sonda en el que cada posición se define por un único nucleótido, es decir, es A, G, T o C. El cebador o sonda no degenerado se sintetiza químicamente con procedimientos bien conocidos en la técnica y se puede purificar.

El término "degenerado", como se usa en el presente documento, se refiere a un ácido nucleico cebador o sonda en el que determinadas posiciones no están definidas por un único nucleótido específico. Por tanto, en dicha posición degenerada, la secuencia del cebador o la sonda puede ser cualquiera de al menos dos nucleótidos diferentes. Dichas posiciones a menudo representan diferencias en los genotipos del ácido nucleico diana. Una secuencia degenerada también se puede representar como una mezcla de múltiples secuencias individuales no degeneradas que, para el propósito de la presente invención, difieren en al menos dos posiciones.

El uso de cebadores y sondas no degeneradas tiene varias ventajas. Una ventaja es que detectando cuatro genotipos usando cebadores no degenerados, se mejora el riesgo de cebado incorrecto, de competición entre las diferentes secuencias en una composición de cebadores degenerados y la sensibilidad de la amplificación. Por lo tanto, es deseable usar al menos un único cebador directo o inverso no degenerado para detectar múltiples genotipos. El cebador complementario – el cebador inverso, en el que el cebador directo no está degenerado, o el cebador directo, en el que el cebador inverso no está degenerado – puede comprender al menos un cebador no degenerado. Los términos "cebador" y "sonda", como se usan en el presente documento, se refieren a una secuencia oligonucleotídica. En el contexto de la presente invención, el término "oligonucleótido" se refiere a componentes formados a partir de una pluralidad de nucleótidos como sus unidades monoméricas. El término "oligonucleótido" también incluye oligonucleótidos modificados, es decir, el cebador y/o la sonda comprenden un nucleótido modificado o un compuesto no nucleotídico. El término "cebadores" se refiere además a dichos oligonucleótidos que se usan en reacciones de amplificación e hibridan con una secuencia diana. El término "sonda" se refiere además a una secuencia oligonucleotídica que hibrida con un ácido nucleico diana o un amplicón con el propósito de detección cualitativa o cuantitativa.

En el caso de una sonda, las modificaciones pueden incluir colorantes, tales como FAM, HEX, JA270, CY5, CY5.5, cumarina, etc. y/o moléculas de desactivador. Las moléculas de colorante se pueden acoplar a conectores. Dichos colorantes, sin embargo, también pueden estar presentes en cebadores. Otras modificaciones ejemplares incluyen un grupo fosfato en el extremo 3'. Dichas moléculas de colorante y/o moléculas de desactivador se pueden usar para la detección del ácido nucleico diana.

Las modificaciones habituales de cebadores incluyen la modificación de los nucleótidos 3' para evitar productos de amplificación no específicos tales como dímeros de cebador. Dichas modificaciones son bien conocidas en la técnica e incluyen, como ejemplos no limitantes, t-butilbencil-dA o -butilbencil-dC. Dichas modificaciones también se incluyen en el término "cebador".

Por tanto, se entiende que la expresión "cebador directo", como se usa en el presente documento, significa un cebador que ceba la hebra codificante de un ácido nucleico para permitir que una polimerasa amplíe en una dirección a lo largo de una hebra del ácido nucleico diana, y se entiende que la expresión "cebador inverso" significa un cebador que ceba la cadena no codificante de un ácido nucleico para permitir que la polimerasa amplíe en una dirección a lo largo de la

hebra complementaria del ácido nucleico diana, de tal manera que se obtenga un amplicón bicatenario con, en un extremo, la secuencia del cebador directo y la complementaria de la misma y, en el extremo opuesto, la secuencia del cebador inverso y la complementaria de la misma. En reacciones en las que se realiza inicialmente una etapa de transcripción inversa (RT), el cebador inverso también sirve como cebador de RT para transcripción inversa. La RT-PCR es una tecnología bien conocida en la técnica. En un modo de realización, se realiza una etapa de RT.

En un modo de realización específico, se usa un cebador directo no degenerado y al menos un cebador inverso no degenerado. De forma alternativa, se usa un cebador inverso no degenerado y al menos un cebador directo no degenerado. En otro modo de realización específico, se usa un cebador directo no degenerado y una mezcla de dos cebadores inversos no degenerados. De forma alternativa, se usa una mezcla de dos cebadores directos no degenerados y un cebador inverso no degenerado. En un modo de realización específico, los dos cebadores no degenerados difieren solamente en una única posición de nucleótido. Esto tiene la ventaja de que se pueden compensar las diferencias en la secuencia de nucleótidos de diferentes genotipos y los genotipos se pueden detectar en una única reacción evitando al mismo tiempo las desventajas de usar cebadores con más de una posición de degeneración. Por tanto, se entiende que si se usa un cebador directo y al menos un cebador inverso, entonces se usa una única secuencia de cebador directo, mientras que se puede usar una o más secuencias de cebador inverso. Si se usan dos cebadores inversos, entonces se usa una mezcla de dos secuencias de cebador inverso. De forma alternativa, si se usa un cebador inverso y al menos un cebador directo, entonces se usa una única secuencia de cebador inverso, mientras que se puede usar una o más secuencias de cebador directo. Si se usan dos cebadores inversos, entonces se usa una mezcla de dos secuencias de cebador inverso.

El término "amplificación" se refiere a la producción de una pluralidad de moléculas de ácido nucleico a partir de un ácido nucleico diana en el que los cebadores hibridan con sitios específicos en las moléculas de ácido nucleico diana para proporcionar un sitio de inicio para la extensión por una polimerasa. La amplificación se puede llevar a cabo por cualquier procedimiento conocido en líneas generales en la técnica, tal como, pero no limitado a: PCR estándar, PCR larga, PCR de inicio caliente, qPCR, RT-PCR y amplificación isotérmica. Un modo de realización de la PCR es la PCR en tiempo real, que es bien conocida en la técnica y que combina la amplificación y la detección.

En un aspecto del procedimiento, la secuencia de ácido nucleico del cebador directo se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 6 y la secuencia de ácido nucleico del al menos un cebador inverso se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7 a 14. Las tasas de acierto obtenidas con diferentes combinaciones de estos cebadores directos e inversos se muestran en la tabla 3. La tabla 5 y la tabla 8 muestran que las secuencias del cebador y de la sonda descritas en el presente documento detectan los genotipos GT1, GT2, GT3 y GT4 de VHE. En un modo de realización específico, la secuencia de ácido nucleico del cebador directo es la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 6. En un modo de realización más específico, la secuencia de ácido nucleico del cebador directo es la SEQ ID NO: 2, 3, 4 o 6. En un modo de realización más específico, la secuencia de ácido nucleico del cebador directo es la SEQ ID NO: 3, 4 o 6. En un modo de realización específico, la secuencia de ácido nucleico del cebador directo es la SEQ ID NO: 6.

En un modo de realización específico, la secuencia de ácido nucleico del cebador inverso consiste en la SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 13 o 14. En un modo de realización más específico, la secuencia de ácido nucleico del cebador inverso es la SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 13 o 14. En un modo de realización más específico, la secuencia de ácido nucleico del cebador inverso es la SEQ ID NO: 9, 10, 11, 13 o 14. En un modo de realización específico, la secuencia de ácido nucleico de los dos cebadores inversos consiste en la SEQ ID NO: 13 y la SEQ ID NO: 14 y la secuencia de ácido nucleico del cebador directo consiste en la SEQ ID NO: 6. En otro modo de realización específico, la secuencia de ácido nucleico del cebador directo consiste en la SEQ ID NO: 6 y la secuencia de ácido nucleico del cebador inverso consiste en la SEQ ID NO: 11. En otro modo de realización específico, la secuencia de ácido nucleico del cebador directo consiste en la SEQ ID NO: 6 y la secuencia de ácido nucleico del cebador inverso consiste en la SEQ ID NO: 13. En otro modo de realización específico, la secuencia de ácido nucleico del cebador directo consiste en la SEQ ID NO: 6 y la secuencia de ácido nucleico del cebador inverso consiste en la SEQ ID NO: 7.

En un aspecto, al menos dos de GT1, GT2, GT3 y/o GT4 se pueden detectar simultáneamente si están presentes en una única reacción. En un modo de realización específico, al menos GT1, GT2, GT3 y GT4 se pueden detectar simultáneamente si están presentes en una única reacción. En otro modo de realización específico, GT1, GT2, GT3 y GT4 se pueden detectar simultáneamente si están presentes en una única reacción.

En un aspecto, el procedimiento comprende adicionalmente aislar los ácidos nucleicos, en el que dicho aislamiento de los ácidos nucleicos precede a la etapa (b), y en el que dichos ácidos nucleicos aislados se amplifican en la etapa (b).

La expresión "aislamiento de los ácidos nucleicos" se refiere a la liberación de ácidos nucleicos de las células o partículas víricas conocida como lisis, seguida del enriquecimiento de los ácidos nucleicos. Dicho aislamiento aumenta la disponibilidad del ácido nucleico diana para los cebadores para su amplificación, y también elimina los inhibidores potenciales de la posterior reacción de amplificación que pueden estar presentes en la muestra. En un modo de realización específico, dichos ácidos nucleicos se aíslan por unión a una fase sólida. Un procedimiento útil para unir ácidos nucleicos implica la unión selectiva de ácidos nucleicos a superficies de vidrio de partículas de unión tales como, por ejemplo, partículas magnéticas en soluciones salinas caotrópicas y la separación de los ácidos nucleicos de contaminantes tales como agarosa, proteínas o desechos celulares. En algunos modos de realización, el vidrio de las

partículas se forma usando el procedimiento de gel-sol descrito en el documento WO 96/41811 y luego se seca y se comprime.

5 En un modo de realización específico, el procedimiento comprende adicionalmente, entre las etapas (b) y (c), (b1) poner en contacto los ácidos nucleicos amplificados con una sonda en condiciones suficientes para unir la sonda a los ácidos nucleicos amplificados y, en el que dicha detección en la etapa (c) comprende detectar el producto de unión entre el ácido nucleico diana amplificado y la sonda como una indicación de la presencia de al menos uno de los genotipos 1, 2, 3 y/o 4 del VHE en la muestra biológica.

10 En un modo de realización específico, la sonda tiene una secuencia de ácido nucleico no degenerada. De nuevo, esto tiene la ventaja de que se evita el cebado incorrecto durante la hibridación o la interferencia entre moléculas de sonda de una sonda degenerada y se mejora la sensibilidad de la detección. La sonda tiene que ser capaz de hibridarse con una secuencia del amplicón generado por amplificación usando cebadores directos e inversos. En un modo de
15 realización específico, la sonda puede hibridar con una secuencia del amplicón que no se superpone con las secuencias cebadoras. Se entiende que el amplicón se refiere al producto de al menos una etapa de amplificación usando el cebador o cebadores directos e inversos.

En un aspecto, la sonda comprende de al menos de 22 a 35 nucleótidos contiguos de la secuencia de ácido nucleico
20 SEQ ID NO: 15 a 19 o 25 o una secuencia complementaria de la misma.

En un aspecto específico, la sonda tiene una secuencia de ácido nucleico seleccionada de las SEQ ID NO: 15 a 19 o 25
o una secuencia complementaria de la misma. El rendimiento de estas sondas en la detección de los genotipos del VHE se muestra en la tabla 4. En un modo de realización específico, la sonda tiene una secuencia de ácido nucleico
25 seleccionada de las SEQ ID NO: 15 a 18. En otro modo de realización específico, la sonda tiene una secuencia de ácido nucleico seleccionada de las SEQ ID NO: 15 y 18.

Los modos de realización específicos de los procedimientos, conjunto de cebadores, conjunto de oligonucleótidos y kit
descritos en el presente documento comprenden las siguientes combinaciones de secuencias de ácido nucleico
30 cebador: SEQ ID NO: 1 combinada con la SEQ ID NO: 8, 10, 11, 13 o 13 mezclada con 14; la SEQ ID NO: 2 combinada con la SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 13 o 13 mezclada con 14; la SEQ ID NO: 3 combinada con la SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 13 mezclada con 14; la SEQ ID NO: 4 combinada con la SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 13 mezclada con 14; la SEQ ID NO: 5 combinada con la SEQ ID NO: 10, 11 o 13 o 13 mezclada con 14; la SEQ ID NO: 6 combinada con la SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 13 mezclada con 14. SEQ ID NO: 7 combinada con la SEQ ID NO: 3 o 4 o 6; la SEQ ID NO: 8 combinada con la SEQ ID NO: 2, 3 o 4 o 6; la SEQ ID NO: 9 combinada con la SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5 o 6; la SEQ ID NO: 10 combinada con la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 o 6; la SEQ ID NO: 11 combinada con la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 o 6; la SEQ ID NO: 12 combinada con la SEQ ID NO: 3 o 4. Otros modos de realización específicos de secuencias de ácido nucleico de combinaciones de cebadores directos e inversos son la SEQ ID NO: 6 combinada con la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 6 combinada con la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 6 combinada con la SEQ ID NO: 13 y la SEQ ID NO: 14 y la SEQ ID NO: 6 combinada con la SEQ ID NO: 11. En un modo de realización específico, la
40 secuencia de ácido nucleico del cebador directo consiste en la SEQ ID NO: 6. En un modo de realización específico, el cebador directo cuya secuencia de ácido nucleico consiste en la SEQ ID NO: 6 se combina con un cebador inverso, en el que la secuencia de ácido nucleico del cebador inverso consiste en la SEQ ID NO: 7. En otro modo de realización específico, el cebador directo cuya secuencia de ácido nucleico consiste en la SEQ ID NO: 6 se combina con un cebador inverso, en el que la secuencia de ácido nucleico del cebador inverso consiste en la SEQ ID NO: 13. En otro
45 modo de realización específico, el cebador directo cuya secuencia de ácido nucleico consiste en la SEQ ID NO: 6 se combina con un cebador inverso, en el que la secuencia de ácido nucleico del cebador inverso consiste en la SEQ ID NO: 11. En otro modo de realización específico, el cebador directo cuya secuencia de ácido nucleico consiste en la SEQ ID NO: 6 se combina con una mezcla de dos cebadores inversos, en los que las secuencias de ácido nucleico de los cebadores inversos consisten en la SEQ ID NO: 13 y la SEQ ID NO: 14.

50 La ventaja de estos conjuntos de cebadores, los procedimientos en los que se usan estos conjuntos de cebadores y el kit que comprende estos conjuntos de cebadores es que los cuatro genotipos 1, 2, 3 y 4 del VHE se pueden amplificar y detectar de forma eficaz en un única reacción sin reactividad cruzada con microorganismos no relacionados. Otra ventaja es que la prueba se simplifica porque todos los oligonucleótidos se pueden sintetizar con una secuencia
55 específica, no degenerada. Esto mejora significativamente la calidad de los oligonucleótidos y la sensibilidad y especificidad del procedimiento. Además, puesto que, además de los oligonucleótidos de control interno, solamente se usan de tres a cuatro oligonucleótidos específicos del VHE (incluidas las sondas) para detectar simultáneamente los cuatro genotipos del VHE, se minimiza el riesgo de reactividad cruzada entre los diferentes oligonucleótidos. Como no es necesario identificar por separado los diferentes genotipos del VHE, los procedimientos, conjunto de cebadores, oligonucleótidos y kit de la presente invención también son rentables porque se puede ejecutar solamente una única
60 prueba para determinar si alguno de los cuatro genotipos del VHE está presente en una muestra.

Los modos de realización específicos anteriores de combinaciones de cebadores se pueden combinar también con una
65 sonda con una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 15 a 19 y 21. En un modo de realización específico, la secuencia del ácido nucleico sonda se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 15 a 18. En un modo de realización específico, la secuencia del ácido nucleico sonda se selecciona de la SEQ

ID NO: 15 o 18. En un modo de realización específico, la secuencia del ácido nucleico sonda consiste en la SEQ ID NO: 15. En un modo de realización específico, la secuencia del ácido nucleico sonda consiste en la SEQ ID NO: 18.

5 Las tablas 1 A a C muestran que con el presente procedimiento se obtienen cebadores, sondas, uso y un kit de una tasa de acierto mejor en la 5' UTR en comparación con el uso de cebadores y sondas no degenerados en la región de la cápside (ORF2) cuando se usan 500 cp/ml de diana y la detección de GT3 o GT1, GT3 y GT4. (GT significa genotipo).

10 Una secuencia representativa para la 5' UTR del GT1 del VHE es la SEQ ID NO: 38, para la 5' UTR del GT2 del VHE es la SEQ ID NO: 39, para la 5' UTR del GT3 del VHE es la SEQ ID NO: 40, para la 5' UTR del GT4 del VHE es la SEQ ID NO: 41. Una secuencia representativa para la cápside del GT1 del VHE es la SEQ ID NO: 42, para la cápside del GT2 del VHE es la SEQ ID NO: 43, para la cápside del GT3 del VHE es la SEQ ID NO: 44, para la cápside del GT4 del VHE es la SEQ ID NO: 45.

15 En un aspecto específico, la sonda comprende un fluoróforo acoplado al extremo 5' de la sonda y un desactivador, en el que la separación entre el fluoróforo y el desactivador comprende al menos 9 nucleótidos. El término "separación" se refiere al número de nucleótidos entre el fluoróforo y el desactivador. En otros aspectos específicos, la sonda comprende al menos 10 o al menos 11 o al menos 12 nucleótidos entre el fluoróforo y el desactivador. En un modo de realización específico, la sonda comprende 12 nucleótidos entre el fluoróforo y el desactivador.

20 La detección usando un fluoróforo y un desactivador acoplados a la sonda es un procedimiento de detección bien conocido para la amplificación en tiempo real de ácidos nucleicos. La transferencia de energía entre el fluoróforo y el desactivador en el estado no unido de la sonda da lugar a la supresión de la emisión de luz fluorescente por el fluoróforo excitado. En el estado hibridado, el fluoróforo y el desactivador están separados y se inhibe la transferencia de energía, dando como resultado la emisión de luz desde el fluoróforo excitado. Los fluoróforos son colorantes que emiten luz
25 fluorescente de una determinada longitud de onda después de la excitación. Estos colorantes se utilizan para la detección. Los ejemplos de fluoróforos incluyen FAM, HEX, JA270, Cy5, Cy5.5, cumarina, etc. Los fluoróforos se pueden acoplar al ácido nucleico 5' a través de una molécula conectora. Dichas moléculas conectoras son bien conocidas en la técnica. Los ejemplos no limitantes son treo-HEX, treo-FAM, treo-JA270, etc. Los desactivadores pueden pertenecer al grupo de desactivadores oscuros. Los ejemplos no limitantes de dichos desactivadores son Dabcyl, Eclipse, BHQ1, BHQ2, BBQ650, TAMRA. En un modo de realización específico, el fluoróforo es FAM o treo-FAM y el desactivador es BHQ2.

35 Las tablas 4 y 6 muestran que aumentando la separación entre el fluoróforo y el desactivador se obtiene una tasa de acierto mejor para la detección de GT4 con una secuencia de sonda no degenerada. Por tanto, en un aspecto específico, la sonda comprende una secuencia de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 15 a la SEQ ID NO: 18 y la SEQ ID NO: 25.

40 En un modo de realización específico, la sonda comprende una T en la posición 86. Las tablas 4 a 6 muestran que una C en esta posición de la sonda impide la detección de los tres genotipos. Por tanto, en un aspecto específico, la sonda comprende una secuencia de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 15 a la SEQ ID NO: 18 y la SEQ ID NO: 25.

45 En un aspecto específico, el nucleótido en la posición 75 es una A. Las tablas 4, 6 y 7 muestran que las sondas con una A en esta posición dan lugar a una tasa de acierto mejor que las sondas con una G en esta posición. Por tanto, en un modo de realización específico, la sonda comprende una secuencia de ácido nucleico que consiste en la SEQ ID NO: 15 o la SEQ ID NO: 18.

50 En un aspecto de los procedimientos anteriores, los procedimientos comprenden adicionalmente, en paralelo, la detección de un segundo ácido nucleico diana en una muestra sospechosa de contener el segundo ácido nucleico diana, en los que dicho segundo ácido nucleico se amplifica y se detecta en recipientes en los que el VHE no se amplifica ni se detecta, el VHE se amplifica y se detecta en recipientes en los que el segundo ácido nucleico diana no se amplifica ni se detecta y en los que dichos recipientes en los que se amplifica y se detecta el VHE y dichos recipientes en los que se amplifica y se detecta el segundo ácido nucleico diana se mantienen en el mismo bloque térmico y se ciclan en condiciones idénticas. Esto permite optimizar el rendimiento de un sistema de prueba de ácidos nucleicos
55 porque se pueden ejecutar diferentes pruebas simultáneamente en el mismo procedimiento del lote.

60 En un aspecto, la invención se refiere a un conjunto de cebadores que comprende un cebador directo y al menos un cebador inverso, o al menos un cebador directo y un cebador inverso, en el que la secuencia de ácido nucleico del cebador directo o el al menos un cebador directo se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 6, y en el que la secuencia de ácido nucleico del cebador inverso o el al menos un cebador inverso se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7 a 14. Los modos de realización específicos de los cebadores y sus ventajas son como se divulga en el presente documento.

65 En un aspecto, la invención se refiere a un conjunto de oligonucleótidos, en el que dicho conjunto consiste en un conjunto de cebadores como se describe en el presente documento y una sonda, en el que dicha sonda comprende al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 15 a 19 o una secuencia

complementaria de la misma. Los modos de realización específicos de los cebadores y las sondas y sus ventajas son como se divulga en el presente documento.

5 En un aspecto, la invención se refiere al uso de un conjunto de cebadores o un conjunto de oligonucleótidos como se describe en el presente documento para detectar simultáneamente los genotipos 1, 2, 3 y/o 4 del VHE en una muestra biológica. Los modos de realización específicos del uso del conjunto de cebadores o el conjunto de oligonucleótidos son como se divulga en el presente documento.

10 En un aspecto, la invención se refiere a un kit que comprende una ADN polimerasa dependiente de molde, nucleótidos y un conjunto de cebadores o un conjunto de oligonucleótidos como se describe en el presente documento. Los modos de realización específicos de los cebadores u oligonucleótidos son como se divulga en el presente documento.

15 También se divulga un procedimiento para determinar si una muestra comprende uno o más de los genotipos 1, 2, 3 y/o 4 del VHE, que comprende las etapas de amplificar los genotipos 1, 2, 3 y/o 4 del VHE de acuerdo con el procedimiento descrito en el presente documento. También se divulga un procedimiento para determinar si una muestra comprende uno o más de los genotipos 1, 2, 3 y/o 4 del VHE, que comprende las etapas de detectar simultáneamente los genotipos 1, 2, 3 y/o 4 del VHE, si están presentes en una muestra, como se describe en el presente documento.

20 **Ejemplos**

Preparación de la muestra

Se preparó ARN protegido para el GT1, GT2, GT3 y GT4 del VHE por procedimientos conocidos en la técnica y se usaron como molde.

25 Se prepararon por anticipado 50 cp/ml o 500 cp/ml de los genotipos del VHE y se almacenaron durante la noche (diluciones en plasma de a -60 hasta -90 °C):

30 Cada muestra respectiva (850 µl) se pipeteó en una placa de pocillo profundo para el análisis por triplicado. A cada pocillo que contenía una muestra, se le añadieron 50 µl de un ácido nucleico de control interno. Se le añadió un ARN de control (CI/QS) que actuaba como control cualitativo (300 partículas protegidas/muestra).

La secuencia de dichos ácidos nucleicos de control fue idéntica en todos los casos y se seleccionó del grupo de las SEQ ID NO: 46-49.

35 El ácido nucleico de control respectivo se almacenó en el siguiente tampón:

| CI/QS – Tampón de almacenamiento | Conc. o pH |
|----------------------------------|------------|
| Tris (mM) | 10 |
| EDTA (mM) | 0,1 |
| Acida de sodio | 0,05 |
| ARN poli rA (mg/l) | 20 |
| <i>pH</i> | <i>8</i> |

40 La preparación de la muestra se realizó automáticamente, siguiendo la secuencia de trabajo de acuerdo con el esquema ilustrado en la figura 1 y usando los siguientes reactivos:

| Reactivo de proteasa | Conc. o pH |
|------------------------|------------|
| Tris (mM) | 10 |
| EDTA (mM) | 1 |
| Cloruro de calcio (mM) | 5 |
| Acetato de calcio (mM) | 5 |
| Esperasa (mg/ml) | 80 |
| Glicerina (p/v, %) | 50 |
| <i>pH</i> | <i>5,5</i> |

| Reactivo de MGP | Conc. o pH |
|------------------------|------------|
| MPG en polvo (mg/ml) | 60 |
| Tris (mM) | 30 |
| Metilparabeno (p/v, %) | 0,1 |

| | |
|----------------|-------|
| Acida de sodio | 0,095 |
| pH | 8,5 |

| | |
|-----------------------------|------------|
| Reactivo de lisis | Conc. o pH |
| Tiocianato de guanidina (M) | 4 |
| Citrato de sodio (mM) | 50 |
| Polidocanol (p/v, %) | 5 |
| Ditiotreitol (p/v, %) | 2 |
| pH | 5,8 |

| | |
|------------------------|------------|
| Tampón de lavado | Conc. o pH |
| Citrato de sodio (mM) | 7,5 |
| Metilparabeno (p/v, %) | 0,1 |
| pH | 4,1 |

| | |
|------------------------|------------|
| Tampón de elución | Conc. o pH |
| Tris (mM) | 30 |
| Metilparabeno (p/v, %) | 0,2 |
| pH | 8,5 |

5 Después de la etapa final, se añadieron a cada pocillo las respectivas mezclas principales (MMx) que contenían reactivos de amplificación, se mezclaron los eluidos que contenían los ácidos nucleicos aislados con la MMx y cada mezcla resultante se transfirió a un pocillo correspondiente de una placa de micropocillos en la que se llevó a cabo la amplificación.

10 **Amplificación y detección**

Para la amplificación, se usaron dos soluciones R1 y R2 de las siguientes concentraciones en un volumen total de 50 µl:

15 R1: MnOAc 16,73 mM, pH 6,1 y acida de sodio al 0,09 % pH 7,0.

R2: acida de sodio al 0,09 % pH 7,0, DMSO al 18 %, KOAc 400 mM pH 7,0, glicerol al 10 %, Tween 20 al 0,01 %, tricina 200 mM pH 8,0, aptámero 0,7 µM, 10 U de UNG, dAGP 1,333 mM, dATP 1,333 mM, dCTP 1,333 mM, dUTP 2,667 mM, 45 U de polimerasa Z05D (por reacción), cebador directo del VHE 0,667 µM, sonda codificante del VHE 0,417 µM, cebador inverso del VHE 0,333 µM; cebador directo de control (SEQ ID NO: 50) 0,417 µM, cebador inverso de control (SEQ ID NO: 51) 0,417 µM, sonda de control (SEQ ID NO: 52) 0,333 µM.

20 Cuando se usaron dos cebadores inversos, cada uno se usó a una concentración de 0,333 µM. Se usó el siguiente perfil de PCR:

25 Perfil de termociclado

| Nombre del programa | Diana (°C) | Modo de adquisición | Retención (hh: mm: ss) | Tasa de aumento (°C/s) | Ciclos | Modo de análisis |
|--------------------------|------------|---------------------|------------------------|------------------------|--------|------------------|
| Pre-PCR | 50 | Ninguno | 00:02:00 | 4,4 | 1 | Ninguno |
| | 94 | Ninguno | 0:00:05 | 4,4 | | |
| | 55 | Ninguno | 00:02:00 | 2,2 | | |
| | 60 | Ninguno | 0:06:00 | 4,4 | | |
| | 65 | Ninguno | 0:04:00 | 4,4 | | |
| 1. ^a medición | 95 | Ninguno | 0:00:05 | 4,4 | 5 | Cuantificación |
| | 55 | Individual | 0:00:30 | 2,2 | | |
| 2. ^a medición | 91 | Ninguno | 0:00:05 | 4,4 | 45 | Cuantificación |
| | 58 | Individual | 0:00:25 | 2,2 | | |
| Enfriamiento | 40 | Ninguno | 00:02:00 | 2,2 | 1 | Ninguno |

30 El programa Pre-PCR comprende la desnaturalización inicial y la incubación a 55 °C, 60 °C y 65 °C para la transcripción inversa de moldes de ARN. La incubación a tres temperaturas combina los efectos ventajosos de que a temperaturas más bajas también se transcriben secuencias diana ligeramente emparejadas erróneamente (tales como variantes genéticas de un organismo), mientras que a temperaturas más altas se suprime la formación de estructuras secundarias de ARN, lo que da lugar a una transcripción más eficaz.

5 El ciclado de PCR se divide en dos mediciones, en el que ambas mediciones aplican una configuración de una única etapa (combinación de hibridación y extensión). Los primeros 5 ciclos a 55 °C permiten una mayor inclusividad preamplificando secuencias diana ligeramente emparejadas erróneamente, mientras que los 45 ciclos de la segunda medición proporcionan una especificidad aumentada usando una temperatura de hibridación/extensión de 58 °C.

10 La amplificación de los genotipos 1, 2, 3 y 4 del VHE se sometió a prueba con diferentes combinaciones de cebadores y sondas y se determinó la tasa de acierto usando 500 cp/ml de VHE o 50 cp/ml de VHE. Los resultados se muestran en las siguientes tablas.

10 Los cebadores y sondas de 5' UTR proporcionan tasas de acierto coherentemente mejores a 500 cp/ml de VHE que los cebadores de la cápside y sondas para la detección de todos los genotipos, especialmente para la detección de GT3 y GT4 (tablas 1 A a 1 C).

15 **Tabla 1 A**

Cápside, 500 cp/ml, GT3

| Directo | Inverso | Sonda | aciertos | tasa de acierto |
|---------------|---------------|---------------|------------|-----------------|
| SEQ ID NO: 26 | SEQ ID NO: 27 | SEQ ID NO: 32 | 0/10 (GT3) | 0 |
| SEQ ID NO: 26 | SEQ ID NO: 28 | SEQ ID NO: 32 | 0/10 (GT3) | 0 |
| SEQ ID NO: 26 | SEQ ID NO: 29 | SEQ ID NO: 32 | 1/10 (GT3) | 10 |
| SEQ ID NO: 26 | SEQ ID NO: 30 | SEQ ID NO: 32 | 4/10 (GT3) | 40 |
| SEQ ID NO: 26 | SEQ ID NO: 31 | SEQ ID NO: 32 | 0/10 (GT3) | 0 |

20 **Tabla 1 B**

500 cp/ml: cápside, diferentes GT

| | | | | |
|---------------|---------------|---------------|---|-----------------|
| SEQ ID NO: 26 | SEQ ID NO: 30 | SEQ ID NO: 33 | 8/10 (GT3) 10/10 (GT1) 7/10 (GT4) | 80 100 70 |
| SEQ ID NO: 26 | SEQ ID NO: 30 | SEQ ID NO: 34 | 6/10 (GT3) 8/10 (GT1) 7/10 (GT4) | 60 80 70 |
| SEQ ID NO: 26 | SEQ ID NO: 30 | SEQ ID NO: 35 | 9/10 (GT3) 10/10 (GT1) 7/10 (GT4) | 90 100 70 |

25 **Tabla 1 C**

500 cp/ml: UTR, diferentes GT

| | | | | |
|--------------|--------------------------------|---------------|---|-------------------|
| SEQ ID NO: 6 | SEQ ID NO: 13 SEQ ID NO: 14 | SEQ ID NO: 15 | 10/10 (GT1) 10/10 (GT3) 10/10 (GT4) | 100 100 100 |
| SEQ ID NO: 6 | SEQ ID NO: 13 SEQ ID NO: 14 | SEQ ID NO: 19 | 10/10 (GT1) 10/10 (GT3) 10/10 (GT4) | 100 100 100 |
| SEQ ID NO: 6 | SEQ ID NO: 13 SEQ ID NO: 14 | SEQ ID NO: 22 | 10/10 (GT1) 10/10 (GT3) 10/10 (GT4) | 100 100 100 |

30 La tabla 1 D muestra que con una combinación de cebador/sonda de la cápside que da una tasa de acierto de un 90 % con 500 cp/ml de VHE, la tasa de acierto es significativamente menor al disminuir el ácido nucleico diana a 50 cp/ml. Con una combinación de cebador/sonda de la región 5' UTR, la tasa de acierto permanece alta incluso al disminuir la diana a 50 cp/ml.

Tabla 1 D: 50 cp/ml frente a 500 cp/ml

Cápside

| | Cebador directo | Cebador inverso | Sonda | Tasa de acierto | Tasa de acierto % |
|-----------------------|-----------------|-----------------|-------------------------------|--------------------------|-------------------|
| 50 cp/ml 500 cp/ml | SEQ ID NO: 36 | SEQ ID NO: 30 | SEQ ID NO: 32 + SEQ ID NO: 37 | 7/20 (GT3) 9/10 (GT3) | 35 90 |

5

UTR

| Cebador directo | Cebador inverso | Sonda | Tasa de acierto | Tasa de acierto % |
|-----------------|-----------------|-------|-----------------|-------------------|
|-----------------|-----------------|-------|-----------------|-------------------|

GT

| | | | | | | |
|-------|-----------|--------------|--------------------------------|---------------|-------------------------|---------------------|
| 1 3 4 | 500 cp/ml | SEQ ID NO: 6 | SEQ ID NO: 13 SEQ ID NO: 14 | SEQ ID NO: 16 | 10/10 10/10 10/10 | 100 100 100 |
| 1 3 4 | 50 cp/ml | | | | 21/21 18/21 11/21 | 100 85,7 52,4 |

10 La tabla 2 muestra las tasas de acierto de diferentes combinaciones de cebadores directos e inversos para la detección del GT3 del VHE usando 500 cp/ml de VHE. Varios pares de cebadores directos e inversos dieron una tasa de acierto de un 100 %, mientras que otras combinaciones aún proporcionaban buenas tasas de acierto, como puede verse en la tabla 2.

Tabla 2:

15

| Cebador directo | Cebador inverso | Sonda | Tasa de acierto | Tasa de acierto % |
|-----------------|-----------------|---------------|-----------------|-------------------|
| SEQ ID NO: 1 | SEQ ID NO: 12 | SEQ ID NO: 15 | 1/11 | 9 |
| SEQ ID NO: 20 | SEQ ID NO: 12 | SEQ ID NO: 15 | 0/11 | 0 |
| SEQ ID NO: 2 | SEQ ID NO: 12 | SEQ ID NO: 15 | 0/11 | 0 |
| SEQ ID NO: 3 | SEQ ID NO: 12 | SEQ ID NO: 15 | 9/11 | 82 |
| SEQ ID NO: 4 | SEQ ID NO: 12 | SEQ ID NO: 15 | 11/11 | 100 |
| SEQ ID NO: 5 | SEQ ID NO: 12 | SEQ ID NO: 15 | 0/11 | 0 |
| SEQ ID NO: 1 | SEQ ID NO: 7 | SEQ ID NO: 15 | 0/11 | 0 |
| SEQ ID NO: 20 | SEQ ID NO: 7 | SEQ ID NO: 15 | 0/11 | 0 |
| SEQ ID NO: 2 | SEQ ID NO: 7 | SEQ ID NO: 15 | 2/11 | 18 |
| SEQ ID NO: 3 | SEQ ID NO: 7 | SEQ ID NO: 15 | 8/11 | 73 |
| SEQ ID NO: 4 | SEQ ID NO: 7 | SEQ ID NO: 15 | 11/11 | 100 |
| SEQ ID NO: 5 | SEQ ID NO: 7 | SEQ ID NO: 15 | 0/11 | 0 |
| SEQ ID NO: 1 | SEQ ID NO: 8 | SEQ ID NO: 15 | 9/11 | 82 |
| SEQ ID NO: 20 | SEQ ID NO: 8 | SEQ ID NO: 15 | 3/11 | 27 |
| SEQ ID NO: 2 | SEQ ID NO: 8 | SEQ ID NO: 15 | 9/11 | 82 |
| SEQ ID NO: 3 | SEQ ID NO: 8 | SEQ ID NO: 15 | 11/11 | 100 |
| SEQ ID NO: 4 | SEQ ID NO: 8 | SEQ ID NO: 15 | 11/11 | 100 |
| SEQ ID NO: 5 | SEQ ID NO: 8 | SEQ ID NO: 15 | 3/11 | 27 |
| SEQ ID NO: 1 | SEQ ID NO: 9 | SEQ ID NO: 15 | 11/11 | 11 |
| SEQ ID NO: 20 | SEQ ID NO: 9 | SEQ ID NO: 15 | 4/11 | 36 |
| SEQ ID NO: 2 | SEQ ID NO: 9 | SEQ ID NO: 15 | 10/11 | 91 |
| SEQ ID NO: 3 | SEQ ID NO: 9 | SEQ ID NO: 15 | 11/11 | 100 |
| SEQ ID NO: 4 | SEQ ID NO: 9 | SEQ ID NO: 15 | 11/11 | 100 |
| SEQ ID NO: 5 | SEQ ID NO: 9 | SEQ ID NO: 15 | 7/11 | 64 |

| | | | | |
|---------------|---------------|---------------|-------|-----|
| SEQ ID NO: 1 | SEQ ID NO: 10 | SEQ ID NO: 15 | 11/11 | 100 |
| SEQ ID NO: 20 | SEQ ID NO: 10 | SEQ ID NO: 15 | 0/11 | 0 |
| SEQ ID NO: 2 | SEQ ID NO: 10 | SEQ ID NO: 15 | 11/11 | 100 |
| SEQ ID NO: 3 | SEQ ID NO: 10 | SEQ ID NO: 15 | 11/11 | 100 |
| SEQ ID NO: 4 | SEQ ID NO: 10 | SEQ ID NO: 15 | 11/11 | 100 |
| SEQ ID NO: 5 | SEQ ID NO: 10 | SEQ ID NO: 15 | 9/11 | 82 |
| SEQ ID NO: 6 | SEQ ID NO: 13 | SEQ ID NO: 15 | 11/11 | 100 |

La tabla 3 muestra los resultados de las amplificaciones usando diferentes combinaciones de cebadores directos e inversos de la región 5' UTR que dan como resultado altas tasas de acierto de un 77 a un 100 % para la detección de GT3 para varias combinaciones, incluso si se usaban solamente 50 cp/ml de VHE.

5

Tabla 3:

50 cp/ml, GT3

| Cebador directo | Cebador inverso | Sonda | Tasa de acierto | Tasa de acierto % |
|-----------------|-----------------|---------------|-----------------|-------------------|
| SEQ ID NO: 4 | SEQ ID NO: 7 | SEQ ID NO: 15 | 0/22 | 0 |
| SEQ ID NO: 24 | SEQ ID NO: 7 | SEQ ID NO: 15 | 6/22 | 27 |
| SEQ ID NO: 6 | SEQ ID NO: 7 | SEQ ID NO: 15 | 17/22 | 77 |
| SEQ ID NO: 23 | SEQ ID NO: 7 | SEQ ID NO: 15 | 0/22 | 0 |
| SEQ ID NO: 4 | SEQ ID NO: 11 | SEQ ID NO: 15 | 2/22 | 9 |
| SEQ ID NO: 24 | SEQ ID NO: 11 | SEQ ID NO: 15 | 11/22 | 50 |
| SEQ ID NO: 6 | SEQ ID NO: 11 | SEQ ID NO: 15 | 19/22 | 86 |
| SEQ ID NO: 23 | SEQ ID NO: 11 | SEQ ID NO: 15 | 1/22 | 5 |
| SEQ ID NO: 4 | SEQ ID NO: 13 | SEQ ID NO: 15 | 0/22 | 0 |
| SEQ ID NO: 24 | SEQ ID NO: 13 | SEQ ID NO: 15 | 0/22 | 0 |
| SEQ ID NO: 6 | SEQ ID NO: 13 | SEQ ID NO: 15 | 22/22 | 100 |
| SEQ ID NO: 23 | SEQ ID NO: 13 | SEQ ID NO: 15 | 0/22 | 0 |
| SEQ ID NO: 4 | SEQ ID NO: 14 | SEQ ID NO: 15 | 0/22 | 0 |
| SEQ ID NO: 24 | SEQ ID NO: 14 | SEQ ID NO: 15 | 0/22 | 0 |
| SEQ ID NO: 6 | SEQ ID NO: 14 | SEQ ID NO: 15 | 2/22 | 9 |
| SEQ ID NO: 23 | SEQ ID NO: 14 | SEQ ID NO: 15 | 0/22 | 0 |

10

La tabla 4 muestra los resultados de las pruebas usando diferentes sondas combinadas con un cebador directo específico y una mezcla de dos cebadores inversos. Una sonda no funcionó. Todas las otras sondas dieron altas tasas de acierto para la detección de GT1 y tasas de acierto algo más bajas para la detección de GT3 cuando se usaban solamente 50 cp/ml. Se observaron diferencias con la detección de GT4 a 50 cp/ml de VHE, con varias secuencias de sonda que dan tasas de acierto razonables para la detección de GT4 por encima de un 50 %, y dos sondas que dan buena detección de GT4 con tasas de acierto por encima de un 70 %, combinadas con tasas de acierto por encima de un 90 % para la detección de GT3 y de un 100 % para la detección de GT1.

15

Tabla 4: Sondas de UTR

20

| Cebador directo | Cebador inverso | Sonda | Tasa de acierto | Tasa de acierto % |
|-----------------|-----------------|-------|-----------------|-------------------|
|-----------------|-----------------|-------|-----------------|-------------------|

GT

| | | | | | | |
|-------|-----------|--------------|--------------------------------|---------------|-------|------|
| 1 3 4 | 500 cp/ml | SEQ ID NO: 6 | SEQ ID NO: 13 SEQ ID NO: 14 | SEQ ID NO: 19 | 10/10 | 100 |
| | | | | | 10/10 | 100 |
| | | | | | 10/10 | 100 |
| 1 3 4 | 50 cp/ml | | | | 21/21 | 100 |
| | | | | | 20/21 | 95,2 |
| | | | | | 8/21 | 38,1 |
| 1 3 4 | 500 cp/ml | SEQ ID NO: 6 | SEQ ID NO: 13 SEQ ID NO: 14 | SEQ ID NO: 15 | 10/10 | 100 |
| | | | | | 10/10 | 100 |
| | | | | | 10/10 | 100 |
| 1 3 4 | 50 cp/ml | | | | 21/21 | 100 |
| | | | | | 20/21 | 95,2 |

| | | | | | | |
|-------|-----------|--------------|--------------------------------|---------------|-------------------------|---------------------|
| | | | | | 16/21 | 76,2 |
| 1 3 4 | 500 cp/ml | SEQ ID NO: 6 | SEQ ID NO: 13 SEQ ID NO: 14 | SEQ ID NO: 21 | 0/10 0/10 0/10 | 0 0 0 |
| 1 3 4 | 50 cp/ml | | | | 0/21 0/21 0/20 | 0 0 0 |
| 1 3 4 | 500 cp/ml | SEQ ID NO: 6 | SEQ ID NO: 13 SEQ ID NO: 14 | SEQ ID NO: 16 | 10/10 10/10 10/10 | 100 100 100 |
| 1 3 4 | 50 cp/ml | | | | 21/21 18/21 11/21 | 100 85,7 52,4 |
| 1 3 4 | 500 cp/ml | SEQ ID NO: 6 | SEQ ID NO: 13 SEQ ID NO: 14 | SEQ ID NO: 17 | 10/10 10/10 10/10 | 100 100 100 |
| 1 3 4 | 50 cp/ml | | | | 21/21 19/21 12/21 | 100 90,5 57,1 |
| 1 3 4 | 500 cp/ml | SEQ ID NO: 6 | SEQ ID NO: 13 SEQ ID NO: 14 | SEQ ID NO: 18 | 10/10 10/10 10/10 | 100 100 100 |
| 1 3 4 | 50 cp/ml | | | | 21/21 20/21 15/21 | 100 95,2 71,4 |

La tabla 5 muestra que las secuencias de cebador y sonda detectan los cuatro genotipos del VHE, GT1, GT2, GT3 y GT4.

5 **Tabla 5**

| | | Cebador directo | Cebador inverso | Sonda | Tasa de acierto | Tasa de acierto % |
|----|--------------|-----------------|--------------------------------|---------------|-----------------|-------------------|
| GT | | | | | | |
| 2 | 150 cp/ml | SEQ ID NO: 6 | SEQ ID NO: 13 SEQ ID NO: 14 | SEQ ID NO: 18 | 38/40 | 95 |
| 4 | | | | | 35/40 | 87,5 |
| 1 | 30 cp/ml | | | | 42/42 | 100 |
| 2 | | | | | 37/42 | 88,1 |
| 3 | | | | | 42/42 | 100 |
| 4 | | | | | 42/42 | 100 |

10 La tabla 6 muestra una alineación de diferentes secuencias de sonda. Como se puede observar, las secuencias de las diferentes sondas son casi idénticas. Las diferencias se refieren, por un lado, a una posición diferente del desactivador de Q en la sonda. Las otras diferencias representan nucleótidos no conservados en los diferentes genotipos. Las diferentes posiciones también se muestran en la tabla 7. Una comparación de las diferencias de secuencia y las tasas de acierto obtenidas, como se muestra en la tabla 4, muestra que no todas estas posiciones son relevantes para el rendimiento de las secuencias de sonda. Una T en la posición 86 favorece el rendimiento de la secuencia de la sonda.

15 Un A en la posición 75 también tiene un efecto beneficioso sobre el rendimiento de la sonda para la detección de GT4. Además, una separación de 9 o más nucleótidos entre el fluoróforo y el desactivador mejora el rendimiento de las sondas de 5' UTR del VHE.

20 **Tabla 6**

75 86

75 86
 ↓ ↓

FAAGGCTCCTGGC**Q**ATCACTACTGCTATTGAGCAGGC SEQ ID NO: 15
 FAAGGCTCCTGGC**Q**GTCACACTACTGCTATTGAGCAGGC SEQ ID NO: 16
 FAAGGCTCCTGGC**Q**GTCACA~~A~~ACTGCTATTGAGCAGGC SEQ ID NO: 17
 FAAGGCTCCTGGC**Q**ATTACTACTGCTATTGAGCAGGC SEQ ID NO: 18
 FAAGGCTCC**Q**TGGC**A**TCACTACTGCTATTGAGCAGG SEQ ID NO: 19
 FAAGGCTCCTGGC**Q**ATTACTACTGCCATTGAGCAGGC SEQ ID NO: 21
 FAAGGCTCCTGGC**Q**ATTACA~~A~~ACTGCTATTGAGCAGGC SEQ ID NO: 25

Tabla 7

| | Pos 75 | Pos 77 | Pos 80 | Pos 86 |
|---------------|--------|--------|--------|--------|
| SEQ ID NO: 15 | A | C | T | T |
| SEQ ID NO: 21 | A | T | T | C |
| SEQ ID NO: 16 | G | C | T | T |
| SEQ ID NO: 17 | G | C | A | T |
| SEQ ID NO: 18 | A | T | T | T |
| SEQ ID NO: 19 | A | C | T | T |

5 La tabla 8 A muestra la detección de los cuatro genotipos GT1, GT2, GT3 y GT4, usando las combinaciones de cebadores de la SEQ ID NO: 6 con una mezcla de la SEQ ID NO: 13 y la SEQ ID NO: 14 y la SEQ ID NO: 6 con la SEQ ID NO: 1. Como se puede observar en la tabla, a 500 cp/ml de VHE, los cuatro genotipos se amplifican de forma eficaz por las combinaciones de cebadores, ya que la tasa de acierto es de un 100 % para cada genotipo. A la concentración más baja de 50 cp/ml de VHE, las tasas de acierto aún son altas y los cuatro genotipos del VHE se amplifican todos con una tasa de acierto entre un 75 y un 100 %. Por el contrario, usando otras combinaciones de cebadores de la misma región del VHE, como se muestra en la tabla 8 B, se amplifican de forma eficaz solamente gt2, gt3 y gt4 cuando se usan 500 cp/ml de VHE. A 50 cp/ml de VHE, no todos los genotipos se pueden amplificar. Las tasas de acierto de los controles internos correspondientes fueron de un 100 % para cada experimento.

15 **Tabla 8 A**

| | | Cebador directo | Cebador inverso | Sonda | Tasa de acierto | Tasa de acierto % |
|----|-----------|-----------------|--------------------------------|---------------|-----------------|-------------------|
| GT | | | | | | |
| 1 | 500 cp/ml | SEQ ID NO: 6 | SEQ ID NO: 13 SEQ ID NO: 14 | SEQ ID NO: 15 | 3/3 | 100 |
| 2 | | | | | 3/3 | 100 |
| 3 | | | | | 3/3 | 100 |
| 4 | | | | | 3/3 | 100 |
| 1 | 50 cp/ml | SEQ ID NO: 6 | SEQ ID NO: 11 | SEQ ID NO: 15 | 19/20 | 95 |
| 2 | | | | | 20/20 | 100 |
| 3 | | | | | 15/20 | 75 |
| 4 | | | | | 19/19 | 100 |
| 1 | 500 cp/ml | SEQ ID NO: 6 | SEQ ID NO: 11 | SEQ ID NO: 15 | 3/3 | 100 |
| 2 | | | | | 3/3 | 100 |
| 3 | | | | | 3/3 | 100 |
| 4 | | | | | 3/3 | 100 |
| 1 | 50 cp/ml | SEQ ID NO: 6 | SEQ ID NO: 11 | SEQ ID NO: 15 | 19/20 | 95 |
| 2 | | | | | 20/20 | 100 |
| 3 | | | | | 17/20 | 85 |
| 4 | | | | | 20/20 | 100 |

20 La tabla 8 B muestra patrones de detección para diferentes genotipos que proporcionaron una señal a un título elevado de VHE para el genotipo 3 usando combinaciones de cebadores de la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 3 y 9. Se muestra la detección de los genotipos 1, 2, 3, 4 del VHE con 500 cp/ml y 50 cp/ml de VHE. El reconocimiento del genotipo 2, en general, es mejor que el reconocimiento de los genotipos 1 y 3. Las tasas de acierto de los controles internos

correspondientes fueron de un 100 % para cada experimento.

Tabla 8 B

5

| Cebador directo | Cebador inverso | Sonda | Tasa de acierto | Tasa de acierto % |
|-----------------|-----------------|-------|-----------------|-------------------|
|-----------------|-----------------|-------|-----------------|-------------------|

GT

| | | | | | | |
|---|-----------|--------------|--------------|---------------|-------|-----|
| 1 | 500 cp/ml | SEQ ID NO: 4 | SEQ ID NO: 8 | SEQ ID NO: 15 | 0/3 | 0 |
| 2 | | | | | 3/3 | 100 |
| 3 | | | | | 3/3 | 100 |
| 4 | | | | | 3/3 | 100 |
| 1 | 50 cp/ml | SEQ ID NO: 4 | SEQ ID NO: 8 | SEQ ID NO: 15 | 0/20 | 0 |
| 2 | | | | | 14/20 | 70 |
| 3 | | | | | 0/20 | 0 |
| 4 | | | | | 6/20 | 32 |
| 1 | 500 cp/ml | SEQ ID NO: 3 | SEQ ID NO: 9 | SEQ ID NO: 15 | 0/3 | 0 |
| 2 | | | | | 3/3 | 100 |
| 3 | | | | | 2/3 | 67 |
| 4 | | | | | 3/3 | 100 |
| 1 | 50 cp/ml | SEQ ID NO: 3 | SEQ ID NO: 9 | SEQ ID NO: 15 | 0/19 | 0 |
| 2 | | | | | 15/20 | 75 |
| 3 | | | | | 0/20 | 0 |
| 4 | | | | | 0/20 | 32 |

La tabla 9 muestra los resultados de una prueba de reactividad cruzada para las combinaciones de cebador y sonda de la SEQ ID NO: 6, 13, 14, 15 (tabla 9 A) y la SEQ ID NO: 6, 11, 15 (tabla 9 B).

10 La reactividad cruzada se sometió a prueba en las condiciones descritas anteriormente. Se usaron las siguientes concentraciones de microorganismos: *Streptococcus viridians (oralis)*: 1,00E+06 ufc/ml; VHA: 1,00E+06 cp/ml; VHB: 1,00E+06 UI/ml; VHC: 1,00E+06 UI/ml; CNA: control negativo de adiciones: sin adición de microorganismo; CPA: control positivo de adiciones: adición de 150 cp/ml de VHE.

15 CI significa control interno.

Tabla 9 A

SEQ ID NO: 6, 13, 14, 15

20

| | Sin VHE, tasas de acierto, tasas de acierto en % | | Con VHE, tasas de acierto, tasas de acierto en % | |
|---|--|------------|--|------------|
| | Cebadores y sondas del VHE | CI | Cebadores y sondas del VHE | CI |
| <i>Streptococcus viridians (oralis)</i> | 0/3, 0 % | 3/3, 100 % | 3/3, 100 % | 3/3, 100 % |
| VHA | 0/3, 0 % | 3/3, 100 % | 3/3, 100 % | 3/3, 100 % |
| VIH-1 M | 0/3, 0 % | 3/3, 100 % | 3/3, 100 % | 3/3, 100 % |
| VHB | 0/3, 0 % | 3/3, 100 % | 3/3, 100 % | 3/3, 100 % |
| VHC | 0/3, 0 % | 3/3, 100 % | 3/3, 100 % | 3/3, 100 % |
| CNA/CPA | 0/3, 0 % | 3/3, 100 % | 3/3, 100 % | 3/3, 100 % |

Tabla 9 B

SEQ ID NO: 6, 11, 15

25

| | Sin VHE, tasas de acierto, tasas de acierto en % | | Con VHE, tasas de acierto, tasas de acierto en % | |
|--|--|----|--|----|
| | Cebadores y sondas del VHE | CI | Cebadores y sondas del VHE | CI |

ES 2 637 489 T3

| | | | | |
|---|-----------|------------|------------|------------|
| <i>Streptococcus viridians (oralis)</i> | 1/3, 33 % | 3/3, 100 % | 3/3, 100 % | 3/3, 100 % |
| VHA | 0/3, 0 % | 3/3, 100 % | 3/3, 100 % | 3/3, 100 % |
| VIH-1 M | 0/3, 0 % | 3/3, 100 % | 3/3, 100 % | 3/3, 100 % |
| VHB | 1/3, 33 % | 3/3, 100 % | 3/3, 100 % | 3/3, 100 % |
| VHC | 0/3, 0 % | 3/3, 100 % | 3/3, 100 % | 3/3, 100 % |
| CNA/CPA | 0/3, 0 % | 3/3, 100 % | 3/3, 100 % | 3/3, 100 % |

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para amplificar simultáneamente los genotipos 1, 2, 3 y/o 4 del virus de la hepatitis E si están presentes en una muestra biológica, que comprende las etapas de
- (a) aislar ácidos nucleicos presentes en la muestra biológica;
- (b) amplificar los ácidos nucleicos aislados en la etapa (a) usando un cebador directo no degenerado y una mezcla de dos cebadores inversos, en el que los cebadores directo e inverso son capaces de amplificar los genotipos 1, 2, 3 y 4 del virus de la hepatitis E, en el que la secuencia de ácido nucleico del cebador directo comprende la SEQ ID NO: 6 y la secuencia de ácido nucleico de la mezcla de dos cebadores inversos comprende la SE ID NO: 13 y la SEQ ID NO: 14.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dichos ácidos nucleicos se aíslan por unión a una fase sólida.
- 15 3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende adicionalmente poner en contacto los ácidos nucleicos amplificados con una sonda en condiciones suficientes para unir la sonda a los ácidos nucleicos amplificados.
- 20 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la sonda comprende de al menos 22 a 35 nucleótidos contiguos de la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 15 a 19 o 25 o una secuencia complementaria de la misma.
- 25 5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, en el que la secuencia de ácido nucleico de la sonda consiste en una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 15 a 19 o 25 o una secuencia complementaria de la misma.
- 30 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la secuencia de ácido nucleico de la sonda consiste en una secuencia seleccionada de las SEQ ID NO: 15 a 18 o 25.
7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que dicha sonda comprende un fluoróforo acoplado al extremo 5' de la sonda y un desactivador, en el que la separación entre el fluoróforo y el desactivador comprende al menos 9 nucleótidos.
- 35 8. Un conjunto de cebadores que comprende un cebador directo y una mezcla de dos cebadores inversos, en el que la secuencia de ácido nucleico del cebador directo comprende la SEQ ID NO: 6, y en el que la secuencia de ácido nucleico de la mezcla de dos cebadores inversos comprende la SEQ ID NO: 13 y la SEQ ID NO: 14.
- 40 9. Un conjunto de oligonucleótidos, en el que dicho conjunto consiste en un conjunto de cebadores de acuerdo con la reivindicación 8 y una sonda, en el que dicha sonda comprende al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 15 a 19 o 25 o una secuencia complementaria de la misma.
- 45 10. El conjunto de oligonucleótidos de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicha sonda comprende un fluoróforo acoplado al extremo 5' de la sonda y un desactivador, en el que la separación entre el fluoróforo y el desactivador comprende al menos 9 nucleótidos.
- 50 11. Uso de un conjunto de cebadores u oligonucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, para detectar simultáneamente los genotipos 1, 2, 3 y/o 4 del virus de la hepatitis E si están presentes en una muestra biológica.
12. Un kit que comprende una ADN polimerasa dependiente de molde, nucleótidos y un conjunto de cebadores u oligonucleótidos de acuerdo con las reivindicaciones 8 a 10.

Fig. 1

