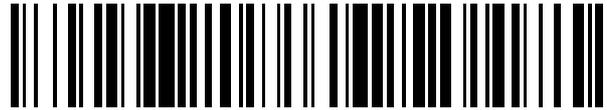


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 644**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2010 E 10769997 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014 EP 2425017**

54 Título: **Un método para la detección de un tipo de virus del papiloma humano (HPV)**

30 Prioridad:

30.04.2009 NO 20091733

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

27.04.2015

73 Titular/es:

**ALLUM-JENKINS AS (100.0%)
Fjelldalsveien 300
3721 Skien, NO**

72 Inventor/es:

**JENKINS, ANDREW;
ALLUM, ANNE-GRY y
STRAND, LINDA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 534 644 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

Un método para la detección de un tipo de virus del papiloma humano (HPV)

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la detección, tipificación y cuantificación de virus del papiloma humano (HPV) en muestras clínicas. Más específicamente, se refiere a las secuencias de oligonucleótidos que pueden ser utilizadas en las reacciones de amplificación y que se usan para la detección simultánea, la tipificación y la cuantificación de una pluralidad de genomas de HPV y un kit de diagnóstico de las mismas.

Antecedentes de la invención

10 Las infecciones por el virus del papiloma humano (HPV) se reportaron como una causa de cáncer de cuello uterino en la década de 1980. La relación entre la malignidad del cáncer y el genotipo del HPV fue considerada de interés. Desde entonces se han identificado más de 120 tipos de HPV. Se han identificado como oncogénicos trece tipos de HPV en el epitelio de la mucosa. Estos tipos incluyen el HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 66.

15 Las infecciones por papilomavirus humano se limitan al epitelio, lo que limita su contacto con el sistema inmune y son poco inmunogénicas. Por lo tanto la serología no es una prueba válida para el HPV. Del mismo modo, el cultivo no es una técnica de diagnóstico válida. Aunque es posible reproducir el ciclo de vida del virus in vitro, esta es una técnica de cultivo de tejidos altamente sofisticada que requiere la diferenciación in vitro de cultivos de células epiteliales. Por otra parte, las neoplasias y los cánceres cervicales de alto grado no producen virus. Por lo tanto, el análisis del HPV se basa en la detección de ácidos nucleicos virales.

20 El análisis del HPV ha demostrado tener una mayor sensibilidad que el ensayo de PAP (prueba de Papanicolaou) para la displasia cervical de alto grado, aunque su especificidad es menor debido a la alta prevalencia de las infecciones por HPV transitorias benignas.

Muchos países han adoptado el análisis del HPV como una prueba de cribado secundaria (triage) para la displasia de bajo grado y equívoca y también se ha sugerido su uso en el cribado primario.

25 El prueba del HPV dominante en la actualidad es la prueba de Digene HCII, cuya utilidad está respaldada por una gran cantidad de literatura científica. En esta prueba el ADN del HPV de la muestra se hibrida con el ARN complementario y los híbridos ADN-ARN resultantes son capturados por los anticuerpos sobre una superficie sólida a la que posteriormente se unen los conjugados anticuerpo-enzima que se detectan por quimioluminiscencia catalizada por enzimas. El ensayo de LCII no distingue entre los diferentes tipos de HPV oncogénicos.

30 También es posible detectar HPV en las células fijadas utilizando la hibridación in situ con sondas marcadas, ya sea con restos fluorescentes (hibridación fluorescente in-situ, FISH) o con haptenos que se pueden unir a un conjugado enzimático que genera un precipitado coloreado insoluble in situ. La hibridación in situ puede proporcionar información valiosa sobre la ubicación y el estado físico del HPV, pero la detección específica de un tipo de los múltiples tipos de HPV en la misma muestra es impracticable.

35 Muchas autoridades en detección han expresado su preferencia por las pruebas de genotipado en la detección secundaria ya que estas permiten distinguir las infecciones transitorias recurrentes que son benignas, de las infecciones persistentes de tipo específico que no son benignas. Además, algunos tipos de HPV, particularmente HPV16, tiene marcadamente más virulencia oncogénica.

Por último, el uso de una prueba de genotipado proporciona información epidemiológica válida que será de especial valor en el seguimiento de los efectos de la vacunación contra el HPV 16 y HPV 18 en la población.

40 Las pruebas de genotipado de HPV disponibles se basan principalmente en una PCR seguida de una hibridación inversa en algún formato. La etapa de PCR se dirige a los genes L1 o E1. Los amplicones de PCR se marcan mediante amplificación e hibridan con las sondas inmovilizadas sobre una micromatriz, en una tira de membrana o en los pocillos de una placa de microtitulación. A continuación, se detecta el amplicón marcado unido, ya sea directamente por fluorimetría si el amplicón está marcado con un resto fluorescente o utilizando conjugados enzimáticos que se unen al marcador y que son detectados usando técnicas colorimétricas o luminométricas. Estas pruebas implican la manipulación de los amplicones de PCR en el laboratorio abierto lo que requiere unas precauciones higiénicas estrictas. Esto, combinado con el alto precio de estas pruebas sitúa las pruebas disponibles fuera del alcance de la mayoría de los programas de cribado masivo. También está disponible una prueba de genotipado que detecta ARNm de los oncogenes virales E6 y E7 utilizando SDA (amplificación dependiente de secuencia). Sin embargo, este método detecta sólo cinco de los trece tipos oncogénicos y sólo cuando hay expresión de un oncogén activo.

50 La solicitud de patente WO 2007115582 A1 describe los conjuntos de cebadores y sondas de PCR para la detección de múltiples tipos de HPV mediante PCR en tiempo real. Estos conjuntos involucran a una combinación de cebadores compleja. En el método de acuerdo con la presente invención, sólo se requieren un cebador directo y

cuatro cebadores reversos. Esto simplifica el control de calidad y la fabricación y reduce el coste. Además, los genes diana de la solicitud de patente WO 2007115582 A1 están sujetos a las variaciones de secuencias intratípicas. Esta variación no se tiene en consideración. Por lo tanto pueden obtenerse resultados falsos negativos en las muestras clínicas que contengan variantes de la secuencia HPV distintas de las secuencias prototipo. Según la presente invención para el diseño del cebador y de la sonda se ha tenido en cuenta las variaciones de la secuencia conocida dentro de la región diana del gen L1 y todas las posiciones variables se evitan o se tienen en cuenta para la modificación de las secuencias de cebadores.

Además, en el documento WO 2007115582 A1 se indica que se obtienen sensibilidades por debajo de 100 copias para todos los tipos de HPV específicos. Sin embargo, los experimentos descritos no incluyen el uso del ADN portador. Esto proporciona una estimación irrealmente optimista de la sensibilidad puesto que el ADN humano presente en las muestras clínicas reduce la sensibilidad de la PCR. La sensibilidad del método según la presente invención se mide en presencia de 500 ng de ADN humano, que corresponden a $7,5 \times 10^4$ células humanas y, por tanto imita con precisión las condiciones de una muestra clínica rica en células. Así, la presente invención proporciona mayor sensibilidad en condiciones realistas.

Además, el documento WO 2007115582 A1 describe el uso de una prueba de PCR multiplex 13-plex en un único tubo. Sin embargo, de acuerdo con el estado de la técnica no parece que haya un instrumental capaz de realizar una prueba de este tipo. El método de acuerdo con la presente invención puede realizarse con el instrumental existente que se pueden adquirir en el formato propuesto o una variante o un análogo del mismo.

Además, "Detection and typing of 46 genital human papillomaviruses by L1F/L1R primer system based multiplex PCR and hybridation", Journal of Virological Methods, vol. 140, nº 1-2, Marzo 2007, páginas 32-42, describe los cebadores y las sondas para la detección de los tipos de HPV en una muestra biológica. Esta tipificación sin embargo se lleva a cabo mediante hibridación en fase sólida de las sondas.

En el documento WO 2009011472 A1 el gen diana que ha sido utilizado para los ensayos de PCR es E1. Sin embargo, este gen es un punto caliente para las delecciones y las inserciones durante el desarrollo del cáncer. La probabilidad de un resultado falso negativo aumenta de este modo con la gravedad de la enfermedad. El método de acuerdo con la presente invención se dirige al gen L1, que es mucho menos propenso a la delección.

Además, en el documento WO 2009011472 A1 los métodos para la detección y tipificación del HPV implican la manipulación de los productos de PCR en el laboratorio abierto. Esto implica el riesgo de contaminación de arrastre. El método de acuerdo con la presente invención se realiza en un sistema cerrado que elimina este riesgo, garantizando así resultados más fiables y eliminando el trabajo extra que se requiere para la descontaminación de equipos e instalaciones después del trabajo post-PCR en laboratorio abierto.

Sobre la base de lo anterior, hay una necesidad en este campo de métodos nuevos, cebadores, sondas y kits para la detección y tipificación de HPV que sean altamente sensibles, reproducibles y menos costosos que las pruebas existentes y que por lo tanto sean adecuados para programas de detección masivos.

35 **Compendio de la invención**

La presente invención describe el desarrollo de un método de PCR cuantitativa en tiempo real usando cebadores consenso y sondas TaqMan multiplex específicas para cada tipo que permite la detección sensible y específica y la tipificación de los trece tipos de HPV oncogénicos HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 66. Además, el método de acuerdo con la presente invención detecta los tipos de HPV HPV 6, 11, 26, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 68, 70, 72, 73, 82.

Más específicamente, la presente invención se refiere a un método para detectar y/o tipificar y/o cuantificar simultáneamente la presencia de HPV 18, 52, 59, 39, 51, 56, 66, 16, 45, 58, 31, 33 y 35 en una muestra biológica, el método comprende las siguientes cuatro reacciones paralelas:

Reacción 1- a) amplificación de los fragmentos de ácido nucleico de HPV 18, 52 y 59 en presencia de

- 45 i) una polimerasa de ácido nucleico
- ii) un cebador directo de PCR con una secuencia de oligonucleótidos SEQ ID NO: 1 o un análogo del mismo,
- iii) un cebador reverso de PCR con una secuencia de oligonucleótidos SEQ ID NO: 2 o un análogo del mismo,
- 50 iv) una sonda con una secuencia de oligonucleótido SEQ ID NO: 7,8 y 9 o un análogo del mismo, marcado con un fluoróforo y una molécula inhibidora de fluorescencia y

b) detección de un cambio de fluorescencia cuya longitud de onda del mismo para determinar el tipo de HPV 18, 52 y 59;

Reacción 2-a) amplificación de los fragmentos de ácido nucleico de HPV 39, 51, 56 y 66 en presencia de

- i) una polimerasa de ácido nucleico
- ii) un cebador directo de PCR con una secuencia de oligonucleótido SEQ ID NO: 1 o un análogo del mismo,
- iii) un cebador reverso de PCR con una secuencia de oligonucleótido de SEQ ID NO: 3 o un análogo del mismo,
- iv) una sonda con una secuencia de oligonucleótido de SEQ ID NO: 10, 11, 12 y 13 o un análogo del mismo, marcado con un fluoróforo y una molécula inhibidora de fluorescencia y

b) detección de un cambio de fluorescencia cuya longitud de onda del mismo para determinar el tipo de HPV 39, 51, 56 y 66;

Reacción 3- a) amplificación de los fragmentos de ácido nucleico de HPV 16, 45 y 58 en presencia de

- i) una polimerasa de ácido nucleico
- ii) un cebador directo de PCR con una secuencia de oligonucleótido SEQ ID NO: 1 o un análogo del mismo,
- iii) un cebador reverso de PCR con una secuencia de oligonucleótido SEQ ID NO: 4 o un análogo del mismo,
- iv) una sonda con una secuencia de oligonucleótido de la SEQ ID NO: 14, 15 y 16 o un análogo del mismo, marcado con un fluoróforo y una molécula inhibidora de fluorescencia y

b) detección de un cambio de fluorescencia cuya longitud de onda del mismo para determinar el tipo de HPV 16, 45 y 58;

Reacción 4- a) amplificación de los fragmentos de ácido nucleico de HPV 31, 33,35 y el control interno en presencia de

- i) una polimerasa de ácido nucleico
- ii) un cebador directo de PCR con una secuencia de oligonucleótido SEQ ID NO: 1 o un análogo del mismo,
- iii) un cebador reverso de PCR con una secuencia de oligonucleótido de la SEQ ID NO: 5 o un análogo del mismo,
- iv) una sonda con una secuencia de oligonucleótido de la SEQ ID NO: 17, 18, 19 y 20 o un análogo del mismo, marcado con un fluoróforo y una molécula inhibidora de fluorescencia y
- v) el control interno y

b) detección de un cambio de fluorescencia cuya longitud de onda del mismo para determinar el tipo de HPV 31, 33, 35 y el control interno.

La presente invención también se refiere a un kit de diagnóstico para la detección y/o tipificación y/o cuantificación de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 66 en una muestra biológica, que comprende las cuatro combinaciones cebador-sonda tal y como se utilizan en la reivindicación 1

Breve descripción de las figuras y las tablas

Figuras 1-13: muestran los análisis de las muestras y las curvas de amplificación para el tipo de PCR multiplex en tiempo real consenso para la detección específica de los tipos de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 66 en donde:

Figura 1: muestra la amplificación de HPV18 en el grupo multiplex 1.

Figura 2: muestra la amplificación de HPV52 en el grupo multiplex 1.

Figura 3: muestra la amplificación de HPV59 en el grupo multiplex 1.

Figura 4: muestra la amplificación de HPV39 en el grupo multiplex 2.

Figura 5: muestra la amplificación de HPV51 en el grupo multiplex 2.

Figura 6: muestra la amplificación de HPV56 en el grupo multiplex 2.

Figura 7: muestra la amplificación de HPV66 en el grupo multiplex 2.

Figura 8: muestra la amplificación de HPV16 en el grupo multiplex 3.

Figura 9: muestra la amplificación de HPV45 en el grupo multiplex 3.

Figura 10: muestra la amplificación de HPV58 en el grupo multiplex 3.

Figura 11: muestra la amplificación de HPV31 en el grupo multiplex 4.

Figura 12: muestra la amplificación de HPV33 en el grupo multiplex 4.

Figura 13: muestra la amplificación de HPV35 en el grupo multiplex 4.

Figura 14: muestra las curvas de amplificación para el control interno.

5 Figuras 15-20: muestran la amplificación de las diluciones en serie de HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35 y HPV56 con los cebadores PTF y PTR2.

Tabla 1: Hace referencia a la lista de los cebadores diseñados.

Tabla 2: Hace referencia a la lista de las sondas diseñadas.

10 Tabla 3: Hace referencia a la composición de la PCR Multiplex del Grupo Multiplex 1, del Grupo Multiplex 2, del Grupo Multiplex 3 y del Grupo Multiplex 4.

Tabla 4: Hace referencia a la evaluación del método en tiempo real consenso en las muestras clínicas.

Tabla 5: Hace referencia al Grupo 1 de HPV, formulación de la muestra de reacción.

Tabla 6: Hace referencia al Grupo 2 de HPV, formulación de la muestra de reacción.

Tabla 7: Hace referencia al Grupo 3 de HPV, formulación de la muestra de reacción.

15 Tabla 8: Hace referencia al Grupo 4 de HPV, formulación de la muestra de reacción.

Cuadro 9: Hace referencia a la sensibilidad analítica de los tipos de HPV diana.

Descripción detallada de la invención

20 El método de PCR cuantitativa en tiempo real de acuerdo con la presente invención detecta todos los tipos reconocidos de HPV oncogénico de la mucosa a niveles de 400 GU por muestra o inferiores. El método es intrínsecamente semi-cuantitativo ya que los resultados se miden como valores de C_T que son proporcionales a la concentración inicial de ADN diana. También es posible ejecutar las reacciones en un modo totalmente cuantitativo mediante la inclusión de las diluciones en serie de los tipos diana(s) con el fin de construir las curvas estándar.

25 La naturaleza cuantitativa del método tiene varias ventajas. En los estudios epidemiológicos sería posible establecer un valor de corte constante para todos los tipos, eliminando así las estimaciones de prevalencia sesgadas que resultan de las diferencias específicas del tipo en la sensibilidad analítica. Se ha sugerido que sólo las infecciones por HPV de alto nivel de más de 50 000 GU por muestra son clínicamente significativas, aunque esto sigue siendo un tema de debate. Con el método multiplex consenso es posible ajustar el punto de corte para cualquier valor cuantitativo requerido. Por último, el uso de un método cuantitativo puede ser de utilidad en el seguimiento del progreso de las infecciones y en los efectos del tratamiento.

30 La sensibilidad analítica del método es de 4-400 GU para todos los tipos en presencia de 500 ng de ADN humano, que corresponde a $0,75 \times 10^5$ células. Así, la presencia de una sola copia del virus en 0,5% de las células daría un resultado positivo. A concentraciones de ADN humano más bajas (50 ng), correspondientes a $0,75 \times 10^4$ células, la sensibilidad mejora en un factor de 10. Esto significa que es poco probable que los resultados falsos positivos debidos a muestras pobres en células sean un problema. Sin embargo, también implica que el funcionamiento del ensayo en un modo totalmente cuantitativo requiera la normalización de la concentración de ADN celular.

35 En comparación con el ensayo de la captura de híbridos (HCII), el HPV se detectó en más muestras clínicas, como era de esperar teniendo en cuenta que la sensibilidad de detección del método multiplex consenso de acuerdo con la presente invención era por lo menos de un orden de magnitud superior.

40 El método de acuerdo con la presente invención por lo tanto abarca en un ensayo a todos los tipos oncogénicos de HPV. El método ha sido diseñado específicamente para presentar un formato de cuatro tubos. Esto proporciona un método que utiliza óptimamente los formatos de 8x12 (96 pocillos) y 16x24 (384 pocillos) que son estándar en la mayoría de los instrumentales de PCR en tiempo real. Sin embargo, es obvio que el método según la presente invención se puede usar en un formato diferente sin apartarse del alcance de la invención.

45 Además, en el método de acuerdo con la presente invención, sólo se requieren un cebador directo y cuatro cebadores reversos. Esto simplifica el control de calidad y la fabricación y reduce el coste.

De acuerdo con la presente invención se ha tenido en cuenta la variación de la secuencia conocida dentro de la región diana del gen L1 antes del diseño de cebador y la sonda y todas las posiciones variables se evitan o se tienen en cuenta para la modificación de las secuencias de los cebadores.

La sensibilidad del método de acuerdo con la presente invención se mide en presencia de 500 ng de ADN humano, que corresponde a $7,5 \times 10^4$ células humanas y, por lo tanto se imitan con precisión las condiciones de una muestra clínica rica en células. Esto proporciona una mayor sensibilidad para todos los tipos de HPV diana.

El método de acuerdo con la presente invención se dirige el gen L1, que es mucho menos propenso a la delección.

- 5 Los cebadores de acuerdo con la presente invención podrían ser utilizados con otras modificaciones para la detección de los tipos de HPV relacionados, tales como, entre otros HPV11, 26, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 68, 70, 72, 73, 82.

En el instrumental de PCR en tiempo real utilizado en el método de acuerdo con la presente invención tiene dos canales de color libres lo que permite la posibilidad de añadir nuevos tipos de HPV oncogénicos a la prueba.

- 10 La agrupación multiplex descrita en la presente solicitud es una de una serie de posibles agrupaciones. Por ejemplo, se sabe que los cebadores usados en el grupo 3 son capaces de amplificar los tipos de HPV 18, 31, 33, 39, 51, 58, 59 y 66 y el control interno HPV6, y por lo tanto cualquiera de estos tipos, de modo que, podría ser asignado a este grupo.

- 15 En la presente invención, se utiliza un instrumental de PCR en tiempo real que tiene cuatro canales de color. Sin embargo, variantes alternativas del ensayo serían posibles con instrumental de PCR en tiempo real con cinco, seis, siete o más canales de color. Los cebadores y sondas podrían entonces combinarse en tres o dos reacciones paralelas para la detección de los mismos tipos de HPV.

- 20 En el presente formato del ensayo pueden ser analizadas 20 muestras en un día de trabajo, haciendo que el ensayo sea el más adecuado para laboratorios de bajo a moderado rendimiento. Se pueden analizar lotes más grandes de muestras utilizando un instrumental de PCR en tiempo real con un formato de 384 pocillos, aunque la capacidad del instrumental de extracción de ADN automático disponibles es en la actualidad una limitación más importante en el rendimiento que el tiempo de análisis de la PCR.

- 25 La PCR en tiempo real es una prueba en un sistema cerrado. No es necesario por lo tanto manipular las muestras amplificadas en laboratorios abiertos. Por consiguiente los problemas de contaminación de arrastre de la PCR se reducen enormemente, y esto a su vez reduce los recursos que de otra manera se deben dedicar al control estricto de la contaminación asociada a los análisis post-PCR en laboratorios abiertos.

El método de acuerdo con la presente invención es de interés entre otros en programas de cribado, donde el genotipado del HPV es preferible.

- 30 Se describen las formas de realización preferidas de la invención. Sin embargo, se debe entender que la invención no está limitada a esas realizaciones precisas, y que en las mismas se pueden efectuar diversos cambios y modificaciones por un experto en la técnica sin apartarse del alcance o espíritu de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas. Los siguientes ejemplos ilustran, pero no limitan la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Plásmidos

- 35 Los plásmidos que contienen la región diana de los genes L1 de HPV6, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 66 fueron transformados en *Escherichia coli* DH5- alfa y se aislaron por centrifugación en gradiente de densidad con cloruro de cesio (Fritsch et al) o con el Kit Midi HiSpeed de Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania). Las concentraciones de ADN se determinaron por espectrofotometría ultravioleta.

Ejemplo 2- Muestras clínicas

- 40 Las muestras clínicas fueron muestras cervicales tomadas con citoescobilla enviadas a nuestro laboratorio para análisis rutinario del HPV para la detección secundaria de la displasia de bajo grado (LSIL) o citología equívoca (ASCUS o muestra inadecuada). Las muestras se recogieron y se transportaron en una preparación fina de transporte CYTYC (medio CYTYC, Crawley, Reino Unido) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se centrifugaron 10 ml de muestra a 3000 rpm durante 10 min y el sedimento se volvió a suspender en 100 µl de una disolución salina amortiguada con fosfato antes de la extracción de ADN usando el instrumental de extracción automática de ADN MagNAPure con el kit de extracción de ADN MagNAPure LC (Roche Diagnostics, Penzberg, Alemania). El ADN se eluyó en 100 µl. Se utilizaron para evaluar el ensayo las muestras clínicas que habían sido analizadas previamente con el ensayo HCII y tipificadas usando una PCR consenso e hibridación en línea inversa.

Ejemplo 3- Ensayo de captura de híbridos

- 50 Se realizó el ensayo de captura de híbridos de Digene (Digene, Gaithersburg, MD) con 25 ml de muestra de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 4- Diseño de cebadores

Con el fin de identificar las dianas adecuadas para los cebadores consenso de la PCR, se alinearon las secuencias de los genes L1 de los tipos de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 66, además de HPV6 usando CLUSTALW. Con el fin de generar las secuencias de entrada para los alineamientos de CLUSTAL se utilizó una secuencia prototipo de cada tipo de HPV en una búsqueda BLAST para identificar las secuencias variables intratípicas. La secuencia se corrigió en la posición variable por sustitución con el código de ambigüedad IUPAC apropiado. Se identificaron como altamente conservadas las regiones correspondientes a los nucleótidos 6374-6348 y 6579-6557 del genoma de HPV16 y se eligieron para la colocación de los cebadores directos y reversos, respectivamente. Esto llevó a la construcción de los cebadores PTF y PTR. Como este par de cebadores no amplificó todos los tipos de dianas de manera satisfactoria, un fenómeno que podría atribuirse a la baja estabilidad de los dúplex con PTR, se buscaron versiones menos degeneradas de PTR.

Las secuencias se agruparon en cuatro grupos de homología sobre la base de un árbol de distancias de las secuencias diana de los cebadores directos y reversos concatenadas construidas en CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Los grupos fueron HPV18, HPV52 y HPV59 (Grupo 1), HPV39, HPV51, HPV56 y HPV66 (Grupo 2), HPV16, HPV45 y HPV58 (Grupo 3) y HPV31, HPV33 y HPV35 más el control interno HPV6 (Grupo 4). Para cada grupo se construyó un nuevo alineamiento CLUSTAL y se diseñaron cebadores reversos específicos del grupo con el fin de reducir la degeneración del cebador y mejorar la sensibilidad. Las posiciones variables se adaptaron mediante el uso de la inosina como base comodín, la timina como una pirimidina universal, la guanina como una purina universal (aprovechando la estabilidad no canónica del par de bases G: T) o la incorporación de nucleótidos mixtos. Esto llevó al diseño de los cebadores PTRGr1, PTRGr2 y PTRGr4. La secuencia original PTR se mantuvo para el grupo 3.

También se investigó una región diana alternativa correspondiente a las posiciones 6644 - 6620 de HPV16 para la colocación del cebador reverso. El cebador PTR2, fue diseñado para dirigirse a esta región. PTR2 es adecuado para la amplificación de los tipos de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 56, 58, 59.

Tabla 1. Listado de los cebadores

Cebador	Secuencia	SEQ ID NO
PTf	5-TG(CT)AAA TAT CC(AT) GAT TAT (AT)TI IAA ATG-3	1
PTrGr1b	5-TGT AGC CAG TAT GG(CT) TTA TTG AA-3	2
PTrGr2	5-TG(GT) AGC CAA TAA GGT TTA TTA AA-3	3
PTr957	5- TGI AIC CAA TAI GG(CT) TTA TTG AA -3	4
PTrGr4	5- TGT AIC CAA TAT GGI TTA TTA AA-3	5
PTr2	5- C(GT)G T(AG)G TAT CIC CAI CAA GTA ACA AA-3	6

Ejemplo 5- Diseño de la Sonda

Se diseñaron las sondas TaqMan MGB utilizando el software Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando el amplicón diana como secuencia de entrada y especificando una longitud del amplicón de ≥ 200 pb. El software se estableció para encontrar cebadores con una Tm de 60°C y las sondas con una Tm 10°C mayor (70°C). Cuando fue necesario, con el fin de compensar la incapacidad del software para localizar las sondas sin localizar simultáneamente los cebadores, la secuencia fue precedida y seguida por secuencias de cebadores ficticias. Las sondas TaqMan MGB fueron suministradas por Applied Biosystems y se marcaron con FAM, VIC o NED, que son los marcadores recomendados para los tres canales de color estándar de la serie 7000 del instrumental de PCR en tiempo real Prisma de AB. Las sondas MGB incorporan un ligando de surco menor, lo que incrementa la Tm de la

sonda y permite que se utilicen las sondas más cortas, y un (apagador no fluorescente) oscuro. Un cuarto canal, generalmente utilizado como una referencia pasiva, está disponible en el instrumental de la serie ABI 7000. Este canal preferentemente utiliza el colorante ROX. Las sondas MGB marcadas con ROX no se pueden conseguir. Se utilizaron dos estrategias con el fin de lograr la T_m requerida. Según la primera estrategia se diseñaron las sondas primero como sondas TaqMan MGB, a continuación, se volvieron a diseñar como sondas LNA sobre la base de las sugerencias de los proveedores (Sigma Genosys), o usando la página de internet <http://lna-tm.com/>. Las sondas LNA incorporan una desoxirribosa modificada en el esqueleto de azúcar-fosfato que estabiliza la estructura helicoidal y aumenta la T_m . Como alternativa se utilizó Primer Express para diseñar las sondas TaqMan convencionales (no-MGB) utilizando el módulo del programa para este fin y se estudiaron las sondas <22 pb. Todas las sondas fueron diseñadas con una T_m de $70 \pm 2^\circ$ C. Las sondas marcadas con ROX se marcaron con el fluoróforo y se apagaron con el apagador oscuro BHQ2 en el extremo 3'.

Las sondas candidatas se compararon mediante los alineamientos de secuencias múltiples CLUSTALW de la región de amplificación de los trece tipos de HPV diana y HPV6 con las posiciones variables marcadas. Las secuencias de las sondas dirigidas a las secuencias invariables intra-tipo pero específicas inter-tipos se seleccionaron para análisis adicionales.

Ejemplo 6 Programa de PCR

Todas las reacciones de PCR se realizaron en el analizador genético 7000 o 7300 Prism de ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA) con la función de ROX como referencia pasiva deshabilitada con el fin de permitir que el canal de color de ROX se utilice para la detección. Para todos los experimentos el programa de PCR fue: 95° C, 12 min seguido de 45 ciclos de 95° C, 15s; 45° C, 30; 60° C, 60s. Para los experimentos que utilizan SYBR verde, se añade el análisis de disociación al final del programa. El volumen de reacción de ADN de la muestra que se utilizó en todas las reacciones fue de 50 μ l y <5 μ l. Las mezclas de PCR se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 7 Análisis de los cebadores

Se utilizaron los cebadores a una concentración de 600nM. La sensibilidad analítica se evaluó para todos los tipos de HPV diana mediante la amplificación de una dilución en serie de 10 veces del ADN plasmídico de HPV en 100 ng / μ l de ADN humano (Sigma Aldrich, St Louis, MI). El ADN amplificado se detectó utilizando SYBR verde con el kit de qPCR SYBR verde F400 de Finnzymes Dynamo (Finnzymes, Espoo, Finlandia) usando el programa de PCR descrito combinado con el análisis de disociación. La sensibilidad analítica se define como la concentración de diana más baja que produce un pico de disociación específico del tipo inequívoco. El criterio para la aceptabilidad del cebador en esta etapa del análisis fue una sensibilidad analítica de 4.000 GU o mejor para todos los tipos de HPV diana.

Ejemplo 8 Evaluación y titulación de la sonda

Las sondas fueron utilizadas inicialmente a una concentración de 200 nM. La evaluación de las sondas se realizó mediante el ensayo de PCR TaqMan usando el kit de sondas de PCR F450 de Finnzymes Dynamo (Finnzymes, Espoo, Finlandia) o, en experimentos posteriores, FastMix qPCR PerfeCta, UNG Quanta Mastermix (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD) utilizando una dilución en serie de 10 veces del tipo de HPV diana en 100 ng / μ l de ADN humano y los cebadores afines. Una señal de amplificación positiva de 400 GU de ADN diana fue el criterio mínimo para la aprobación de la sonda para análisis posteriores.

Cuando se utilizan a altas concentraciones en las reacciones múltiplex, las sondas tienden a interferir unas con las otras. Por lo tanto se realizó la titulación de las sondas con el fin de determinar la concentración de sonda mínima que podría ser utilizada sin pérdida de sensibilidad. Se ensayaron concentraciones de sondas de 200, 150, 100 y 50 nM frente 4000, 400, 40 y 4 GU del tipo de diana. Se empleó la concentración más baja de sonda que podría ser utilizada sin pérdida de sensibilidad analítica en las reacciones múltiplex.

Ejemplo 9 Análisis de las sondas en Multiplex

Para el análisis multiplex, las sondas se combinaron a la concentración elegida junto con los cebadores afines y se ensayaron frente diluciones en serie de los tres o cuatro tipos de HPV diana en reacciones de PCR como las que han sido descritas. Los criterios para la aceptación de una combinación multiplex fueron una sensibilidad analítica de 400 GU o mejor y que no hubiese reacción cruzada con los otros tipos del grupo. Cuando se detectó una pérdida de sensibilidad analítica inaceptable o una reacción cruzada en un grupo multiplex, las reacciones se repitieron con un menor número de sondas en todas las combinaciones con el fin de identificar la sonda interferente.

Los grupos de sondas satisfactorios se ensayaron frente a $4 \cdot 10^4$ GU de cada uno de los catorce tipos de HPV del ensayo con el fin de detectar una reacción cruzada. En caso de observarse una reacción cruzada, se analizó la sonda de la reacción cruzada frente al tipo/s de HPV de la reacción cruzada en una reacción simple con el fin de determinar si la reacción cruzada era debida a una interacción directa entre la sonda y el tipo de HPV de la reacción cruzada, o era debido a efectos secundarios causados por el ensayo multiplex.

En el caso de que las sondas fueran rechazadas debido a interferencia o a reacción cruzada, se diseñaron nuevas sondas y ensayaron como se ha descrito anteriormente.

Las sondas que se evaluaron se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Listado de las sondas

Grp	HPV	Secuencia	SEQ ID NO	Marcador	Tipo	Diana
1	PTp18(7)	ATA CAC ACA GCT GCC AGG T	21	FAM	TaqMan MGB	HPV18
1	PTp18(8)	CTTCACCTGGCAGCTG	22	FAM	TaqMan MGB	HPV18
1	PTp18(130)	CACTGTGCCTCAATC	23	FAM	TaqMan MGB	HPV18
1	PTp18(131)	ACTGTGCCTCAATCC	7	FAM	TaqMan MGB	HPV18
1	PTp18(177)	ACCTGGCAGCTGTGT	25	FAM	TaqMan MGB	HPV18
1	PTp 52	TCT AAC TCT GGC AAT A	26	ROX/BHQ2	TaqMan MGB	HPV52
1	PTp52(4)	tc+Taa+Ctc+Tggc+Ae+Tac+Tgc	8	ROX/BHQ2	LNA	HPV52
1	PTp 59(1)	TAC TGA CAT ACG TGC C	9	NED	TaqMan MGB	HPV59
1	PTp59(77q)	AGGCGAGAACAGGTTTTGGCCAGACA	29	NED	TaqMan MGB	HPV59
1	PTp59(132)	ATCAACTTCCTGAATCACT	30	NED	TaqMan MGB	HPV59
1	PTp59(159)	AAGGTACTGACATACGTGCC	31	NED	TaqMan MGB	HPV59
-1	PTp 39(1)	CAC AGA TAT ACG TGC AAA	32	ROX/BHQ2	TaqMan MGB	HPV39
2	PTp39(4)	ca+Ca+Gatat+Acg+Tg+Caa+Acc	10	ROX/BHQ2	LNA	HPV39
2	PTp39(5)	caca+Gatat+Acg+Tg+Caa+Acc	34	ROX/BHQ2	LNA	HPV39
2	PTp 51	AGT GGT AAT GGC CGT G	35	FAM	TaqMan MGB	HPV51
2	PTp51(156)	AGTGGTAATGGCCGTGAC	11	FAM	TaqMan MGB	HPV51
2	PTp51(158)	TGGTAATGGCCGTGACC	37	FAM	TaqMan MGB	HPV51
2	PTp51(168)	CGTGACCCCTATAGAAAG	38	FAM	TaqMan MGB	HPV51
2	PTp 56	TAG CAA TGG TAG AGA AC	39	VIC	TaqMan MGB	HPV56
2	PTp56(2)	CAATACCTGCAGAGTTATA	12	VIC	TaqMan MGB	HPV56
2	PTp56(3)	ATATTTAAAGGGTAGCAATGGT	41	VIC	TaqMan MGB	HPV56
2	PTp 66(1)	TTG GAA GGG TGG CAA T	13	NED	TaqMan MGB	HPV66
3	PTp 16(6)	ATT TGC ACT AGA CCC AGA G	14	FAM	TaqMan MGB	HPV16

(continuación)

Grp	HPV	Secuencia	SEQ ID NO	Marcador	Tipo	Diana
3	PTp16(94)	CTGTTGGTGAAAATGTACC	44	FAM	TaqMan MGB	HPV16
3	PTp16(101)	TGAAAATGTACCAGACGATT	45	FAM	TaqMan MGB	HPV16
3	PTp16(155s)	AGCCAGTTCAAATTTAT	46	FAM	TaqMan MGB	HPV16
3/4	PTp 33	TCT ATT CAA AGC AGT GC	47	VIC	TaqMan MGB	HPV33
3/4	PTp33(2)	ctac+Tgc+Ctc+Tt+Car+Aag+Cag	48	ROX/BHQ2	LNA	HPV33
3/4	PTp33(8)	TGCCCTCTATTCAAAGCAGTGC	49	NED, VIC	Taqman MGB	HPV33
3/4	PTp33(10)	GGAAC TACTGCCTCTATTC AAAGCAGT GCTGC	50	VIC	TaqMan	HPV33
3/4	PTp33(141)	AGAGGCTGTCCCGATCACCTG	51	ROX	TaqMan	HPV33
3/4	PTp33(149)	TTCCCGATGACCTGTACATTAAGGT	52	ROX	TaqMan	HPV33
3/4	PTp33(9)	tg+Cctctatt+Caaag+Cagtgc	19	ROX/BHQ2	LNA	HPV33
3	PTp 58	TCC GGT AAT ACT GCA G	16	NED	TaqMan MGB	HPV58
3	PTp58(36)	CCAGTGAACCTTATGGG	55	NED	TaqMan MGB	HPV58
3	PTp58(118 m)	AAAACTTGGCGAGGCTG	56	NED	TaqMan MGB	HPV58
3	PTp58(156)	AAGGTCCGGTAATAC	57	NED	TaqMan MGB	HPV58
3	PTp58(170)	ACTGCAGTTATCCAAAGTA	58	NED	TaqMan MGB	HPV58
3/1	PTp 45(3)	ATA CAC ACA ACT GCC A	59	VIC	TaqMan MGB	HPV45
3/1	PTp45(6)	GTGAAACCCCTGGCAGT	15	VIC	TaqMan MGB	HPV45
3/1	PTP45(4)	aa+Tac+Aca+Caa+Ctg+Ccagg	61	ROX/6HQ2	LNA	HPV45
3/1	PTp45(5)	ct+Agc+Gct+Aat+Atg+Cgtgaa	62	ROX/BHQ2	LNA	HPV45
3/1	PTp45(172 Q)	TGCGTGA AACCCCTGGCAGTTG	63	VIC	TaqMan	HPV45
3/1	PTp45(127)	ACACAGTACCTACGGACCTA	64	VIC	TaqMan MGB	HPV45
3/1	PTp45(164)	CGCTAAATATCGGTGAAAC	65	VIC	TaqMan MGB	HPV45
4	PTp35	TAC CAC TGG CAC ATT G	66	FAM	TaqMan MGB	HPV35

(continuación)

Grp	HPV	Secuencia	SEQ ID NO	Marcador	Tipo	Diana :
4	PTp35(4)	GTACCACTGGCACATTG	20	FAM	TaqMan MGB	HPV35
4	pup35(5)	TACCACTGGCACATTG	68	FAM	TaqMan MGB	HPV35
4	PTp 31	TCC GGT TCA ACA GCT AC	18	VIC	TaqMan MGB	HPV31
4	PTp31 (115g)	TCAGGCGGGTTGGTGAATCGGT	70	VIC	TaqMan	HPV31
4	PTp31(168)	TTCAACAGCFACITTTAGC	71	VIC	TaqMan MGB	HPV31
4	PTp31(162)	CTCCGGTTCAACAGCTA	72	VIC	TaqMan MGB	HPV31
4	PTp6(2)	TGCCTGATACTCTTATAATTA	73	NED	Taqman MGB	HPV6
4	PTp6(197)	ACCCCGAGCGGCT	74	NED	TaqMan MGB	HPV6
4	PTp6(190)	TGTTAACACCCCCGAGCGG	75	NED	TaqMan MGB	HPV6
4	PTp6(154)	TAGTGAAATCGCACGTCT	17	NED	TaqMan MGB	HPV6
4	PTp6(101)	AACAGGGCTGGCGAGGTGGG	77	ROX/BHQ2	TaqMan	HPV6
4	PTp6(98)	TTTAACAGGGCTGGCGAGGTGGG	78	ROX/BHQ2	TaqMan	HPV6
4	PTp6(122)	ACAGGGCTGGCGAGGTGGG	79	ROX/BHQ2	TaqMan	HPV6
4	PTp6(116)	TTTTTAACAGGGCTGGCGAGGTGGG	80	ROX/BHQ2	TaqMan	HPV6

5 El grupo multiplex al que están asignados los tipos predominantemente se muestra en la primera columna. Las secuencias de ácido nucleico bloqueado (LNA™) se escriben con letras minúsculas para los restos normales y letras mayúsculas con el prefijo '+' para los restos de LNA. Las sondas que se utilizan en las mezclas multiplex se muestran a continuación en negrita. El texto en gris indica que la sonda ha sido sustituida. Los fluoróforos (FAM, VIC, NED y ROX) son los que se utilizan en el presente método. Se pueden utilizar fluoróforos alternativos y combinaciones de fluoróforos como es sabido por los expertos en la técnica.

Después de 1-3 rondas de rediseño de sonda /cebador, se llegó a la formulación múltiplex de la Tabla 3.

Tabla 3. Composición de las mezclas de PCR Multiplex

Multiplex Grupo 1. HPV 18,52,59.				
Cebador	Secuencia	SEQ ID NO	Concentración	
PTI	5-TG(CT)AAA TAT CC(AT) GAT TAT (AT)TI IAA ATG-3	1	600nM	
PTrGr1b	5-TGT AGC CAG TAT GG(CT) TTA TTG AA-3	2	600nM	
Sonda	Secuencia	SEQ ID NO	Tipo	Concentración
PTp18(131)	5- FAM ACT GTG CCT CAA TCC-3	7	TaqMan MGB	150n M
PTr52(4)	5- ROX TC+TAA+CTC+TGGC+AA+ TAC+TGC-3	8	LNA	50nM
PTp59(1)	5- NED TAC TGA CAT ACG TGC C-3	9	TaqMan MGB	100nM
Multiplex Grupo 2. HPV 39,51,56,66				
Cebador	Secuencia	SEQ ID NO	Concentración	
PTI	5-TG(CT)AAA TAT CC(AT) GAT TAT (AT)TI IAA ATG-3	1	600nM	
PTrGr2	5-TG(GT) AGC CAA TAA GGT TTA TTA AA-3	3	600nM	
Sonda	Secuencia	SEQ ID NO	Tipo	Concentración
PTp39(4)	5-ROX CA+CA+GATAT+ACG+TG+CAA+ACC-3	10	LNA	50nM
PTp 51(156)	5- FAM AGT GGT AAT GGC CGT GAC-3	11	TaqMan MGB	100nM
PTp 56(2)	5- VIC CAA TAC CTG CAG AGT TAT A-3	12	TaqMan MGB	50nM
PTp 66 (1)	5- NED TTG GAA GGG TGG CAA T-3	13	TaqMan MGB	100nM
Multiplex Grupo 3. HPV 16,45,58				
Cebador	Secuencia	SEQ ID NO	Concentración	
PTI	5-TG(CT)AAA TAT CC(AT) GAT TAT (AT)TI IAA ATG-3	1	600Nm	
PTr957	5- TGI AIC CAA TAI GG(CT) TTA TTG AA -3	4	600Nm	

(continuación)

Multiplex Grupo 3. HPV 16,45,58				
Cebador	Secuencia	SEQ ID NO	Concentración	
Sonda	Secuencia	SEQ ID NO	Tipo	Concentración
PTp16(6)	5- FAM ATT TGC AGT AGA CCC AGA G-3	14	TaqMan MGB	150Nm
PTp45(6)	5- VIC GTG AAA CCC CTG GCA GT-3	15	TaqMan MGB	150Nm
PTp58	5- NED TCC GGT AAT ACT GCA G-3	16	TaqMan MGB	50Nm
Multiplex Grupo 4. HPV 6,31 ,33,35				
Cebador	Secuencia	SEQ ID NO	Concentración	
OII1+	5- TG(CT)AAA TAT CC(AT) _ATT AT (AT)TI IAA ATG -3	1	600nM	
PTGr4	5- TGT AIC CAA TAT GGI TTA TTA AA-3	5	600nM	
Sonda	Secuencia	SEQ ID NO	Kons.I Quantamix	C.off
PTp 6(154)	5-TAG TGG AAA TCG CAC GTC T- 3 NED	17	50nM	6-7
PTp 31	5-TCC GGT TCA ACA GCT AC-3 VIC	18	50nM	31-9
PTp 33(9)	5-ROX tg(+C)ctctatt(+C)aaag(+C)agtgC-BHQ2	19	150nM	33-7
PTp 35(4)	5- GTA CCA CTG GCA CAT TG-3 FAM	20	100nM	35-7

Ejemplo 10- Control interno

Se utilizó un plásmido que contiene el genoma del tipo HPV no oncogénico HPV6 como control interno. El diseño y el análisis de la sonda del control interno HPV6 se realizó de la misma manera que para las otras sondas. Con el fin de determinar una concentración adecuada del control interno, se añadió HPV6 a las reacciones de PCR del grupo 4 en diluciones en serie 10x a concentraciones de $4,10^3$ GU a 40 GU por reacción. La mezcla multiplex que contiene el control interno se usó en el ensayo de amplificación utilizando los tipos HPV 31, 33 y 35 y diluciones en serie 10x con el fin de determinar qué concentraciones del control interno, en su caso, reducían la sensibilidad analítica de los tipos diana.

10 Ejemplo 11 - Evaluación frente a las muestras clínicas

Una vez que se obtuvo la formulación final del ensayo en base a los resultados de los ensayos anteriores, el ensayo se evaluó en 37 muestras clínicas y los resultados se compararon con los resultados previos del ensayo de captura de híbridos HCII y con los resultados de tipificación anteriores utilizando una hibridación en línea reversa.

15 En la tabla 4 se comparan los resultados de la PCR multiplex consenso para 37 muestras clínicas, en comparación con el ensayo de captura de híbridos (HCII) y con los resultados de tipificación anterior utilizando hibridación en línea reversa. No se encontraron resultados falsos negativos con respecto a las pruebas anteriores. Una muestra dio como resultado un falso negativo en relación para el ensayo HCII y en una muestra del ensayo multiplex consenso no se pudo detectar un tipo que se encontró en el ensayo de tipificación anterior.

20 Por consiguiente, los resultados muestran que en 5 muestras el ensayo multiplex consenso de acuerdo con la presente invención se detectan los tipos adicionales no detectados en los análisis anteriores.

Tabla 4. Evaluación de la prueba consenso en tiempo real de las muestras clínicas

Muestra	Resultado HClI	Resultado de tipificación previa	Resultado Multiplex consenso
1	+	HPV16	HPV16
2	-	-	-
3	-	-	-
4	+	HPV35	HPV16, 35, 52
5	-	-	-
6	+	HPV31	HPV31, 52
7	-	-	-
8	+	HPV51	HPV51, 56
9	+	HPV51	HPV51
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	HPV51, 66
13	-	-	-
14	-	-	-
15	-	-	-
16	-	-	-
17	-	-	-
18	+	HPV39	HPV39
19	-	-	-
20	-	HPV51	HPV51
21	-	-	HPV16, 45
22	-	-	-
23	-	-	-
24	-	-	-
25	-	-	-
26	+	-	-
27	-	-	-
28	-	-	-
29	-	-	-
30	±	HPV45	HPV45
31	-	-	-
32	+	HPV16	HPV16
33	-	-	-
34	-	HPV31	HPV31
35	+	HPV51, 52, 59	HPV51, 52
36	-	-	-
37	-	-	-

ES 2 534 644 T3

De este modo en la tabla 4 se comparan los resultados de la PCR multiplex consenso para 37 muestras clínicas, en relación con el ensayo de HCII y los resultados de tipificación anteriores utilizando hibridación en línea reversa. Hubo una concordancia completa de los resultados de las 28 muestras, de los cuales cinco fueron positivos y 23 negativos. Para dos muestras la HCII fue negativa, mientras que la hibridación en línea reversa y la PCR multiplex consenso dieron resultados idénticos. En 5 muestras del ensayo múltiplex consenso se detectaron los tipos adicionales no detectados con la hibridación en línea reversa. Estos tipos fueron HPV66 (una muestra), que no estaba incluido en el ensayo de hibridación en línea reversa, HPV52 (dos muestras) y HPV56 (una muestra) para los que se conoce que el ensayo de hibridación en línea reversa tiene una sensibilidad reducida y HPV35, HPV16 y HPV45 (un caso cada uno). En una muestra el ensayo multiplex consenso no pudo detectar un tipo (HPV59) detectado por hibridación en línea reversa. Una muestra resulto positiva solamente para el ensayo de HCII.

Ejemplo 12- Diseño de la PCR en tiempo real consenso

Se utilizó el siguiente procedimiento para analizar las 21 muestras clínicas. Las muestras procedían de ADN de muestras cervicales tomadas con citoescobilla utilizando el extractor automático de ADN MagNAPure.

1. Las mezclas de PCR para los grupos multiplex 1, 2, 3 y 4 se prepararon en tubos separados de acuerdo con las siguientes tablas.

Tabla 5

Grupo 1 de HPV, formulación mezcla maestra: reacción de 50µl. Concentración del cebador 600nM. Concentración de la sonda 150nM para HPV18, 50nM para HPV52 y 100nM para HPV 59.		
Componente	Volumen por muestra	Volumen por 26 muestras y controles
Rx-mix QuantaFast CicladoqPCR	25µl	650µl
PTf 100 pmol/µl	0.3 µl	7.8µl
PtrGr1 100 pmol/µl	0.3 µl	7.8µl
Sondas 18(131), 52(4), 59(1) 5 pmol/µl	1.5+0.5+1 .0µl	39+13+ 26µl

Tabla 6

Grupo 2 de HPV, formulación mezcla maestra: reacción de 50µl. Concentración del cebador 600nM. Concentración de la sonda 50nM para HPV39, 100nM para HPV51, 50nM para HPV56 y 100nM para HPV 66.		
Componente	Volumen por muestra	Volumen por 26 muestras y controles
Rx-mix QuantaFast CicladoqPCR	25µl	650µl
PTf 100 pmol/µl	0.3 µl	7.8µl
PtrGr2 100pmol/µl	0.3 µl	7.8µl
Sondas 39(4), 51(156), 56(2)66(1) 5 pmol/µl	0.5+1.0+0 .5+ 1:0µl	13+26+ 13+26µl
H₂O	16.4µl	426µl

Tabla 7

Grupo 3 de HPV, formulación mezcla maestra: reacción de 50µl. Concentración del cebador 600nM. Concentración de la sonda 150nM para HPV16, 150nM para HPV45 y 50nM para HPV 58.		
Componente	Volumen por muestra	Volumen por 26 muestras y controles
Rx-mix QuantaFast		
CicladoqPCR	25µl	650µl
PTf 100 pmol/µl	0.3 µl	7.8µl
Ptr 100 pmol/µl	0.3 µl	7.8µl
Sondas 16(6), 45(6), 58 5 pmol/µl	1.5+1.5+0 .5µl	39+39+ 13µl
H₂O	15.9µl	413µl

Tabla 8

Grupo 4 de HPV, formulación mezcla maestra: reacción de 50µl. Concentración del cebador 600nM. Concentración de la sonda 50nM para HPV6, 50nM para HPV31, 150nM para HPV33 y 100nM para HPV 35.		
Componente	Volumen por muestra	Volumen por 26 muestras y controles
Rx-mix QuantaFast Ciclado qPCR	25µl	650µl
PTf 100 pmol/µl	0.3 µl	7.8µl
PtrGr 4100 pmol/µl	0.3 µl	7.8µl
Sondas 6(154), 31, 33(9), 35(4)	0.5+0.5+1	13+13+
5 pmol/µl	.5+ 1.0µl	39+26µl
IK	0.5µl	13µl
H ₂ O	15.9µl	413µl

2. Programa de PCR: 95° C, 12 min seguido de 45 ciclos de 95° C, 15s; 45° C, 30; 60° C, 60s. Equipo de PCR en tiempo real AB7300. Se utiliza la siguiente configuración de una placa de 96 pocillos:

Filas 1, 2, 3: detectores para el Grupo 1,

5 Filas 4, 5, 6: detectores para el Grupo 2,

Filas 7, 8, 9 detectores para el Grupo 3 y

Fila 10, 11, 12 detectores para el Grupo 4.

También se introduce un número muestra para cada una de las 21 muestras.

10 Cada muestra se ejecuta en todos los grupos. Además, se incluyen mezclas control específicas para el grupo que contienen todos los tipos de HPV del grupo y los controles negativos.

Por lo tanto, se incluyen los siguientes controles:

Controles positivos

Control de los 13 tipos, que contiene 4000 GU de HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 66 en alícuotas de 5µl.

15 Se utilizaron controles positivos de grupo, que contienen 4.000 GU de HPV18, 52 y 59 (grupo 1), HPV39, 51, 59 y 66 (grupo 2), HPV16, 45 y 58 (grupo 3) y HPV 31, 33 y 35 (grupo 4) con los respectivos grupos.

Para cada grupo multiplex se ejecuta un control de los 13 tipos multiplex, un control de grupo y un control negativo (sin ADN añadido).

3. Las mezclas de PCR como se describe en (1) se reparten en 45µl en cada pocillo, siguiendo el diseño de la placa.

20 Se añaden 5 µl de muestra de ADN, de control positivo o de control negativo según el diseño de la placa.

La placa de PCR se sella y se coloca en la máquina de PCR. El programa de PCR tarda aproximadamente 2,5 horas.

Consideraciones logísticas

25 El tiempo requerido para completar el análisis de 20 muestras es de 8 horas - 4,5 horas para el procesado de las muestras, 15 minutos para el diseño de la PCR, 2,5 horas de tiempo de ejecución de la PCR y 1 hora para el análisis. De este, 2,5 horas son el tiempo de manipulación.

30 El análisis de las muestras y las curvas de amplificación para el tipo de PCR en tiempo real multiplex consenso para la detección específica de los tipos de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 66 se muestra en las Figuras 1 - 13. El eje vertical es log (fluorescencia), eliminada la señal de fondo, para el canal de color apropiado. El eje horizontal es el ciclo de PCR. La línea horizontal marcada con una flecha en el eje vertical de la derecha es la línea del umbral que se coloca manualmente después de corregir la fluorescencia de fondo. Las curvas de amplificación que cruzan la línea umbral se consideran positivas, y el ciclo de PCR fraccionario donde la curva de

amplificación cruza la línea de umbral es el ciclo umbral (Ct) que figura en el informe adjunto. La figura 4 muestra la amplificación del control interno, HPV6.

Resultados para Grupo Multiplex 1. HPV18, 52 y 59.

5 La Figura 1 muestra la amplificación del HPV18 en el grupo multiplex 1. Las dos curvas positivas son controles positivos. No hay muestras positivas de HPV18.

La Figura 2 muestra la amplificación de HPV52 en el grupo multiplex 1. Son visibles 4 curvas positivas. Las curvas de color naranja y gris a la derecha son los controles positivos. Las dos curvas azules son muestras positivas (muestras cuatro y 6) que contienen HPV52.

10 La Figura 3 muestra la amplificación de HPV59 en el grupo multiplex 1. Las dos curvas positivas son controles positivos. No hay muestras positivas de HPV59.

Resultados para Grupo Multiplex 2. HPV39, 51, 56 y 66.

15 La figura 4 muestra la amplificación de HPV39 en el grupo multiplex 2. La curva verde es un control positivo que contiene los tipos de diana del grupo 2. En un segundo control positivo que contiene todos los catorce tipos de diana de HPV39 no hubo amplificación. La curva en negro es una muestra fuertemente positiva (muestra 18) que contiene HPV39.

20 La Figura 5 muestra la amplificación de HPV51 en el grupo multiplex 2. Son visibles seis curvas positivas. Las curvas de color verde y marrón que cruzan la línea umbral en el ciclo de 29 son controles positivos. Las cuatro curvas restantes son muestras positivas para HPV51, dos de las cuales (muestras 8 y 9 son muy fuertemente positivas). Las curvas de color negro y azul para estas dos muestras son casi coincidentes. La muestra 20 (curva verde) cruza la línea umbral cerca de los controles positivos, lo que indica que contiene cantidades similares de HPV51 (4000 GU). La muestra 12 (curva roja) es débilmente positiva.

La Figura 6 muestra la amplificación de HPV56 en el grupo multiplex 2. Son visibles 3 curvas positivas. Las curvas de color verde y marrón son los controles positivos. La curva azul es una muestra positiva (muestra 8). La curva aplanada se debe al efecto competitivo de las concentraciones de HPV51 muy altas en esta muestra.

25 La Figura 7 muestra la amplificación de HPV66 en el grupo multiplex 2. Las curvas positivas de color verde y marrón en el extremo derecho son controles positivos. La curva roja es una muestra positiva.

Resultados del Grupo Multiplex 3. HPV16, 45 y 58.

30 La Figura 8 muestra la amplificación de HPV16 en el grupo multiplex 3. Son visibles 4 curvas positivas. Las curvas de color marrón y rojo que cruzan la línea umbral en el ciclo de 34 son controles positivos. La curva marrón es notablemente más plana que la curva roja, probablemente porque el control positivo representado por la curva marrón contiene todos los catorce tipos de dianas, produciendo un mayor potencial para la competencia. Las curvas de color negro y verde son las muestras positivas de HPV16 (muestras 1 y 21) una de las cuales es muy débilmente positiva.

35 La Figura 9 muestra la amplificación de HPV45 en el grupo multiplex 3. Son visibles 3 curvas positivas. Las curvas de color marrón y rojo son los controles positivos. La curva verde es una muestra positiva de HPV45 (muestra 21).

La Figura 10 muestra la amplificación de HPV58 en el grupo multiplex 3. Las dos curvas positivas son controles positivos. No hay muestras positivas de HPV58.

Resultados para Grupo Multiplex 4. HPV31, 33, 35 y Control Interno (HPV6)

40 La Figura 11 muestra la amplificación de HPV31 en el grupo multiplex 4. Son visibles 3 curvas positivas. Las dos curvas verdes similares son controles positivos. La curva azul es una muestra positiva (muestra 6) que contiene grandes cantidades de HPV31.

La Figura 12 muestra la amplificación de HPV33 en el grupo multiplex 4. Las dos curvas verdes similares son controles positivos que son las únicas señales positivas. No hay muestras positivas de HPV33.

45 La Figura 13 muestra la amplificación de HPV35 en el grupo multiplex 4. Son visibles 3 curvas positivas. Las dos curvas verdes similares son controles positivos. La curva marrón es una muestra positiva (muestra 4) que contiene HPV35.

50 La figura 14 muestra las curvas de amplificación del control interno. Todas las muestras contienen la misma cantidad de HPV6 y las curvas están agrupadas, lo que indica ausencia de inhibición. Las curvas a la derecha del principal grupo de curvas son indicativas de una inhibición parcial o competencia. Son visibles cinco curvas. En una curva (muestra 4) la amplificación del control interno está casi completamente inhibida. Esto lo causa la competencia con una fuerte señal de amplificación de HPV35 en el mismo tubo. Una segunda muestra ligeramente inhibitoria, la

muestra 9, contiene HPV51 a concentraciones inusualmente altas. Aunque HPV51 no está incluido en el grupo multiplex 4, la similitud de las secuencias de los cebadores es probablemente suficiente para generar una amplificación competitiva en esta muestra caliente. Las tres muestras restantes (3, 8 y 17) son negativas y son probablemente parcialmente inhibitoras.

- 5 El control interno, HPV6 por lo tanto podría añadirse a la reacción de grupo multiplex 4 a niveles de 400 a 4000 GU por reacción sin comprometer la sensibilidad analítica para HPV31, HPV33 o HPV35. Como concentración estándar se escogieron 4000 GU por reacción para el control interno.

Tabla 9. Sensibilidad analítica

Tipo de HPV	Sensibilidad analítica (GU) (100 ng/μl ADN humano)	Sensibilidad analítica (GU) (10 ng/μl ADN humano)
		1
HPV16	40	4
HPV18	40	4
HPV31	4	4
HPV33	400	40
HPV35	400	40
HPV39	40	4
HPV45	400	4
HPV51	4	4
HPV52	400	40
HPV56	40	4
HPV58	400	40
HPV59	40	4
HPV66	400	40

- 10 Esta tabla Hace referencia a la sensibilidad analítica para las reacciones de PCR múltiplex. Las reacciones se realizaron usando las formulaciones múltiplex descritas en las Tablas 5-8. El ADN diana era una dilución en serie de 10 veces del plásmido HPV en 100 ng /μ l o 10 ng /μ l de ADN humano, lo que corresponde a 500 o 50 ng, respectivamente, de ADN humano en la muestra. La sensibilidad analítica es el menor número de copias (GU) que producen una curva de amplificación que puede distinguirse claramente del fondo de fluorescencia.

Ejemplo 13- El uso del cebador PTR2

- 15 La amplificación se realizó con la dilución en serie de HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35 y HPV56 con los cebadores PTf y PTR2.

- 20 Por tanto la amplificación se llevó a cabo en una reacción de 100μl usando 500 ng de cada cebador, 1,5u de AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), 1,5 mM de MgCl₂, y 200 μmM de dNTPs en un amortiguador AmpliTaq Gold. El programa de PCR fue 93° C, 30s; 40° C, 30s; 72° C, 90s; 40 ciclos. Se aplicaron 10μl del material amplificado a un gel de agarosa al 1,5% y se sometieron a electroforesis a 130 V durante 90 minutos, se tiñeron con verde SYBR según las instrucciones del fabricante y se fotografiaron con iluminación UV de 300 nm. Los resultados se muestran en las Figuras 15-22.

Ptr2 es por tanto adecuado para la amplificación de los tipos de HPV.

Ejemplo 14- Kit de diagnóstico

- 25 El kit de diagnóstico según la presente invención puede tener la siguiente construcción, pero es obvio que se pueden efectuar cambios y modificaciones por un experto en la técnica sin apartarse del alcance o espíritu de la invención.

ES 2 534 644 T3

El kit puede contener cuatro filas de seis tubos (Tubos 1 - 6) que contienen todos los reactivos necesarios para la detección de los tipos de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 66 .

5 El tubo 1 contiene 500 µl de una solución que contiene el cebador directo PTf y el cebador reverso PTrGr1, además de las sondas TaqMan MGB para HPV18 (marcador FAM), HPV59 (marcador NED) y una sonda LNA para HPV52 (marcador ROX).

El tubo 2 contiene 500 µl de una solución que contiene el cebador directo PTF y el cebador reverso PTrGr2, además de las sondas TaqMan MGB para HPV51 (marcador FAM), HPV56 (marcador VIC) HPV66 (marcador NED) y una sonda LNA para HPV39 (marcador ROX).

10 El tubo 3 contiene 500 µl de una solución que contiene el cebador directo PTf y el cebador reverso PTr, además de las sondas TaqMan MGB para HPV16 (marcador FAM), HPV45 (marcador VIC) y HPV58 (marcador NED).

El tubo 4 contiene 500 µl de una solución que contiene el cebador directo PTf y el cebador reverso PTrGr4, además de las sondas TaqMan MGB para HPV35 (marcador FAM), el marcador CIV HPV31, y una sonda LNA para HPV52 (marcador ROX). También se incluye una sonda TaqMan para el control interno HPV6 y para la diana del control interno de HPV6 en una concentración de 800 copias por µl.

15 El tubo 5 contiene 20 µl de control positivo que contiene 4.000 copias de los tipos de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 66.

El tubo 6 contiene 2500 µl de 2 x mezcla maestra de PCR que contiene ADN polimerasa termoestable y desoxinucleótidos trifosfatos y cloruro de magnesio en una solución amortiguada adecuada.

20 De acuerdo con el procedimiento siguiente se pueden analizar 23 muestras simultáneamente. Tres de estas muestras puede ser controles negativos. Asimismo, el ADN se extrae de las muestras usando un método adecuado.

1. Cada uno de los tubos 1 a 6 se dejó descongelar a temperatura ambiente.

2. Se preparó la mezcla maestra del grupo 1 del Ejemplo 12 mediante la adición de 600 µl de mezcla maestra de PCR (tubo 6) al tubo 1 y se mezcló mediante inversión.

25 3. Se preparó la mezcla maestra del grupo 2 del Ejemplo 12 mediante la adición de 600 µl de mezcla maestra de PCR (tubo 6) al tubo 2 y se mezcló mediante inversión.

4. Se preparó la mezcla maestra del grupo 3 del Ejemplo 12 mediante la adición de 600 µl de mezcla maestra de PCR (tubo 6) al tubo 3 y se mezcló mediante inversión.

5. Se preparó la mezcla maestra del grupo 4 del Ejemplo 12 mediante la adición de 600 µl de mezcla maestra de PCR (tubo 6) al tubo 4 y se mezcló mediante inversión.

30 6. Se transfirieron 45 µl de mezcla maestra del grupo 1 a cada pocillo de las filas A y E de una placa de PCR óptica de 96 pocillos de 500 µl.

7. Se transfirieron 45 µl de mezcla maestra del grupo 2 a cada pocillo de las filas B y F.

8. Se transfirieron 45 µl de mezcla maestra del grupo 3 a cada pocillo de las filas C y G.

9. Se transfirieron 45 µl de mezcla maestra del grupo 4 a cada pocillo de las filas D y H.

35 10. Añadir 5 µl de muestra de ADN 1 a los pocillos A1, B1, C1 y D1.

11. Añadir 5 µl de muestra de ADN 2 a los pocillos A2, B2, C2 y D2.

12. Continuar la adición de muestras con el mismo patrón a los pocillos A3 - D3 hasta A12- D12.

13. Continuar la adición de muestras con el mismo patrón a los pocillos D1 - H1 hasta D11- H11.

14. Añadir 5µ l de control positivo a cada uno de los pocillos D12 - H12.

40 15. Sellar la placa, colocar en la máquina de PCR en tiempo real e iniciar el programa de PCR.

16. Los tipos de HPV 18, 52 y 59 serán detectados en las filas A y E.

17. Los tipos de HPV 39, 51, 56 y 66 serán detectados en las líneas B y F.

18. Los tipos 16, 45 y 58 serán detectados en las filas C y G.

19. Los tipos de HPV 31, 33, 35 y el control interno serán detectado en filas D y H.

El programa de PCR sería:

Activación de la polimerasa y desnaturalización de la muestra: 10 minutos a 95° C.

Seguido de 45 ciclos de:

Desnaturalización 15 segundos a 95° C

5 Anillamiento 30 segundos a 45° C

Extensión 60 segundos a 60° C.

La máquina de PCR en tiempo real debería estar programada para recopilar los datos de la fluorescencia en cuatro canales de color optimizados para la detección de los tintes fluorescentes FAM, VIC, NED y ROX.

10 Los ejemplos anteriores sólo se ofrecen como ilustración de la invención. Se debe entender que una persona experta en la técnica puede modificar el método, el kit, las sondas y los cebadores descritos en este documento sin apartarse del concepto y del alcance de la invención expuesta en las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar y/o tipificar y/o cuantificar simultáneamente la presencia de HPV 18, 52, 59, 39, 51, 56, 66, 16, 45, 58, 31, 33 y 35 en una muestra biológica, comprendiendo el método las siguientes cuatro reacciones paralelas:
- 5 Reacción 1-a) amplificación de los fragmentos de ácido nucleico de HPV 18, 52 y 59 en presencia de
- i) una polimerasa de ácido nucleico
 - ii) un cebador directo de PCR con una secuencia de oligonucleótidos SEQ ID NO: 1
 - iii) un cebador reverso de PCR con una secuencia de oligonucleótidos SEQ ID NO: 2
 - iv) una sonda con una secuencia de oligonucleótidos SEQ ID NO: 7, 8 y 9, marcada con un fluoróforo y una molécula inhibidora de fluorescencia y
- 10 b) detección de un cambio de fluorescencia cuya longitud de onda del mismo que determina el tipo de HPV 18, 52 y 59;
- Reacción 2- a) amplificación de los fragmentos de ácido nucleico de HPV 39, 51, 56 y 66 en presencia de
- i) una polimerasa de ácido nucleico
 - ii) un cebador directo de PCR con una secuencia de oligonucleótidos SEQ ID NO: 1
 - iii) un cebador reverso de PCR con una secuencia de oligonucleótidos SEQ ID NO: 3
 - iv) una sonda con una secuencia de oligonucleótidos SEQ ID NO: 10, 11, 12 y 13 marcada con un fluoróforo y una molécula inhibidora de fluorescencia y
- 15 b) detección de un cambio de fluorescencia cuya longitud de onda del mismo que determina el tipo de HPV 39, 51, 56 y 66;
- 20 Reacción 3- a) amplificación de los fragmentos de ácido nucleico de HPV 16, 45 y 58 en presencia de
- i) una polimerasa de ácido nucleico
 - ii) un cebador directo de PCR con una secuencia de oligonucleótidos SEQ ID NO: 1
 - iii) un cebador reverso de PCR con una secuencia de oligonucleótidos SEQ ID NO: 4
 - iv) una sonda con una secuencia de oligonucleótidos SEQ ID NO: 14,15 y 16 marcada con un fluoróforo y una molécula inhibidora de fluorescencia y
- 25 b) detección de un cambio de fluorescencia cuya longitud de onda del mismo que determina el tipo de HPV 16,45 y 58;
- 30 Reacción 4- a) amplificación de los fragmentos de ácido nucleico de HPV 31, 33 y 35 en presencia de una polimerasa de ácido nucleico
- i) una polimerasa de ácido nucleico
 - ii) un cebador directo de PCR con una secuencia de oligonucleótidos SEQ ID NO: 1
 - iii) un cebador reverso de PCR con una secuencia de oligonucleótidos SEQ ID NO: 5
 - iv) una sonda con una secuencia de oligonucleótidos SEQ ID NO: 17,18 19 y 20 marcada con un fluoróforo y una molécula inhibidora de fluorescencia y
 - v) un control interno y
- 35 b) detección de un cambio de fluorescencia cuya longitud de onda del mismo que determina el tipo de HPV 31, 33, 35 y un control interno
- 40 2. Un método según la reivindicación 1, en donde dichas reacciones se llevan a cabo en paralelo y en viales separados.
3. Un método según las reivindicaciones 1-2, en donde los cuatro fluoróforos son FAM, VIC, NED y ROX.
4. Un método según las reivindicaciones 1-2, en donde el control interno es HPV6.
5. Un kit para la detección simultánea y/o tipificación y/o cuantificación de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 66 en una muestra biológica que comprende las cuatro combinaciones cebador-sonda tal como se
- 45 utilizan en la reivindicación 1.

Figura 1

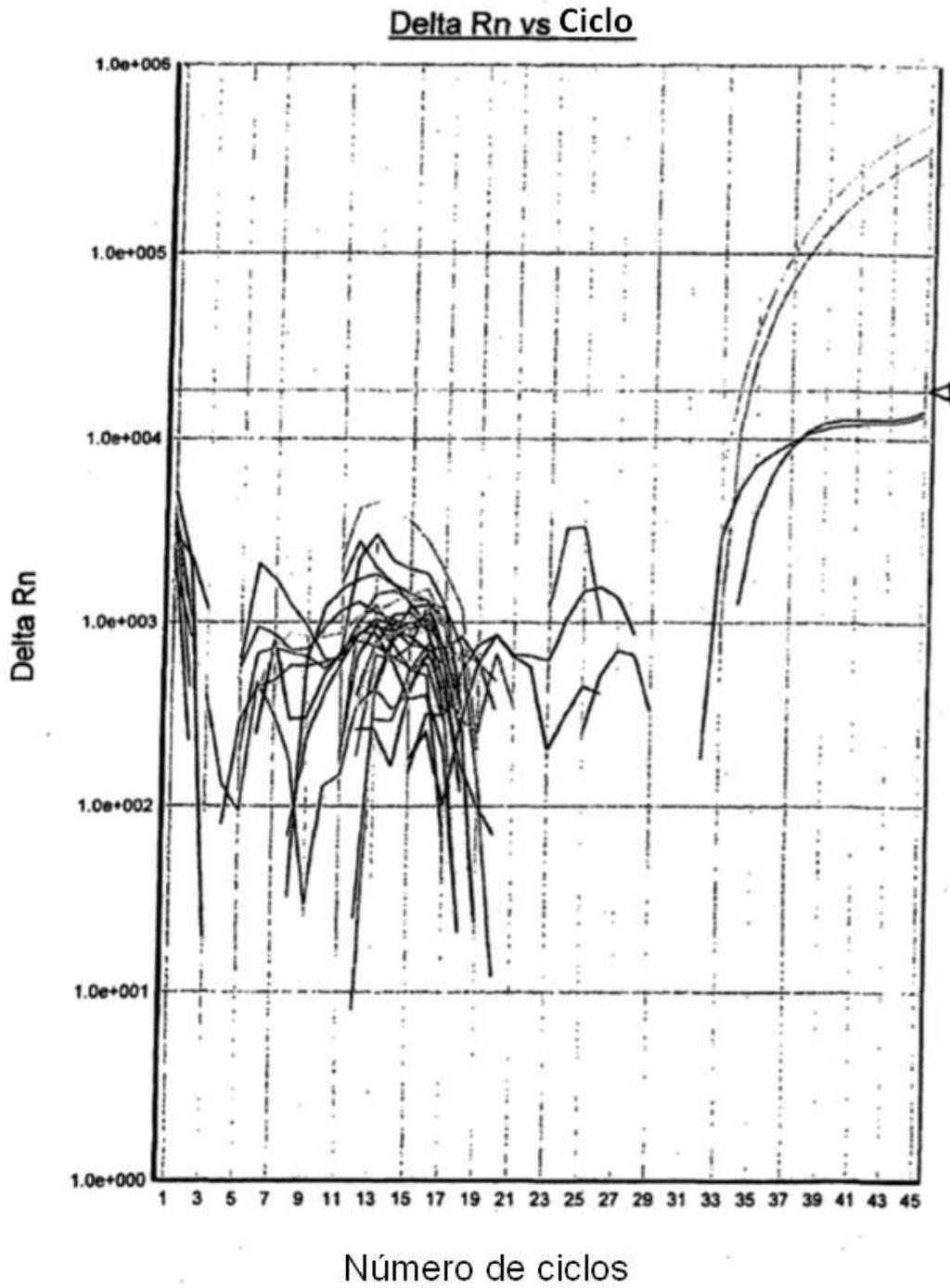


Figura 2

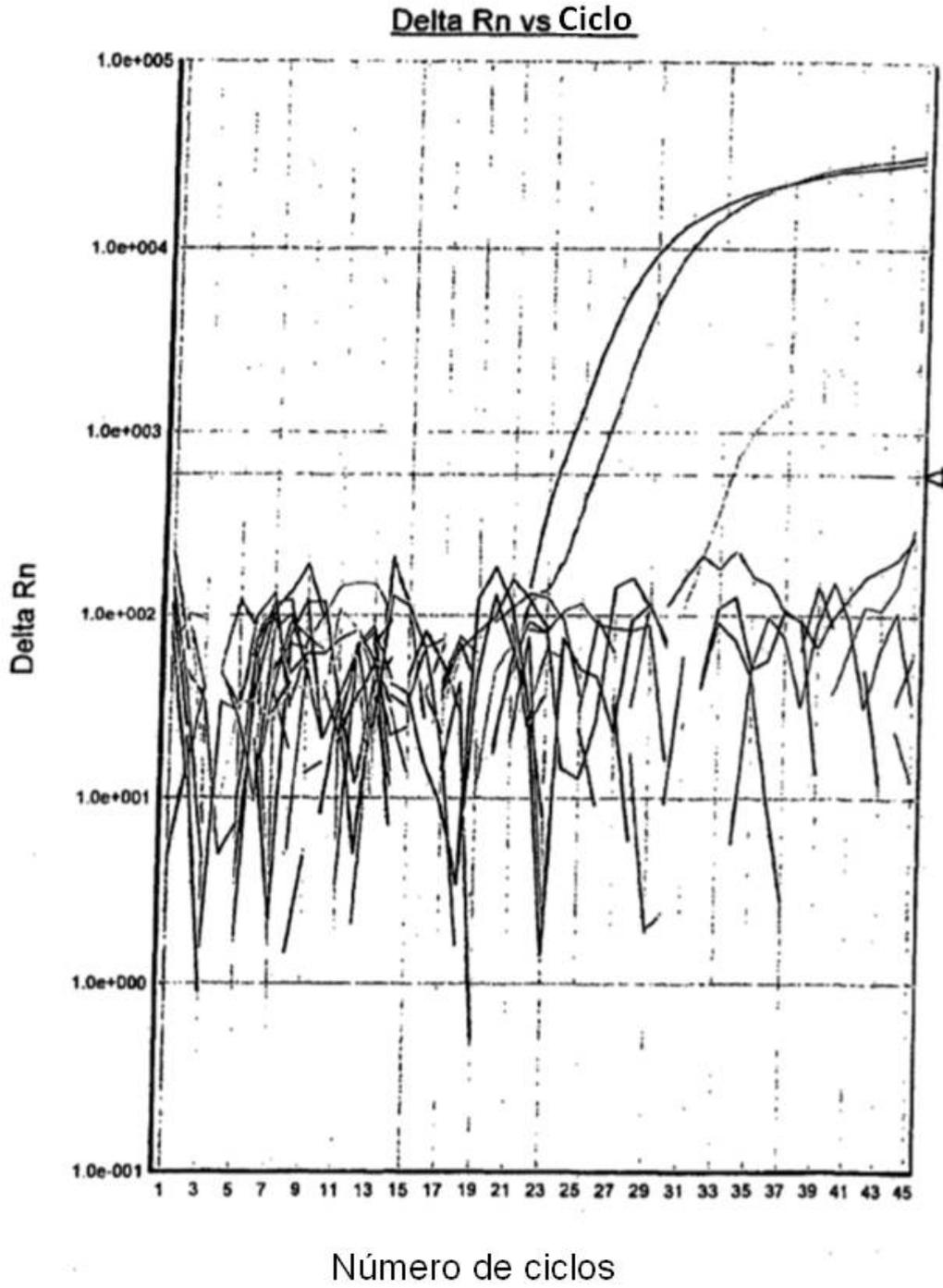


Figura 3

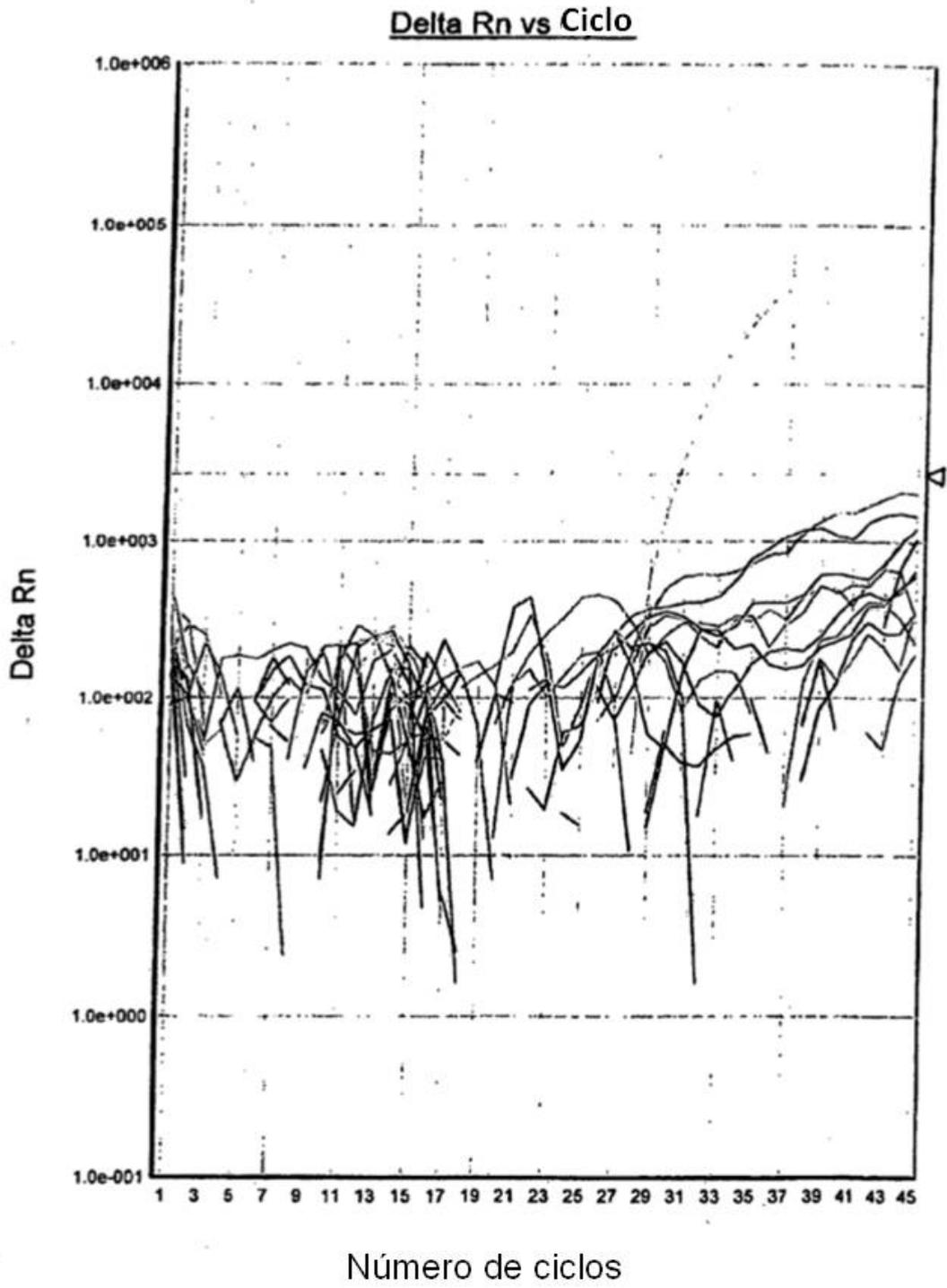


Figura 4

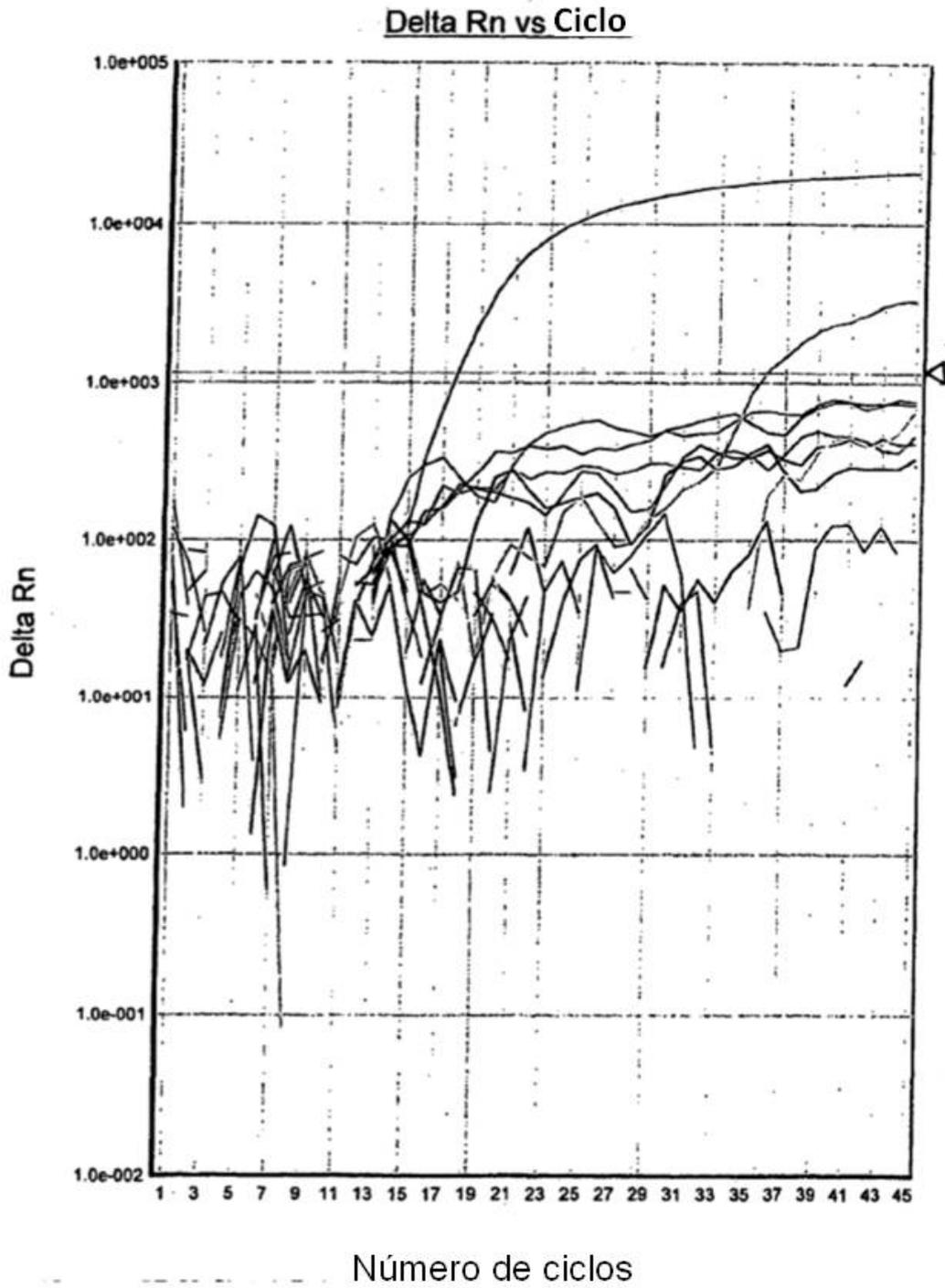


Figura 5

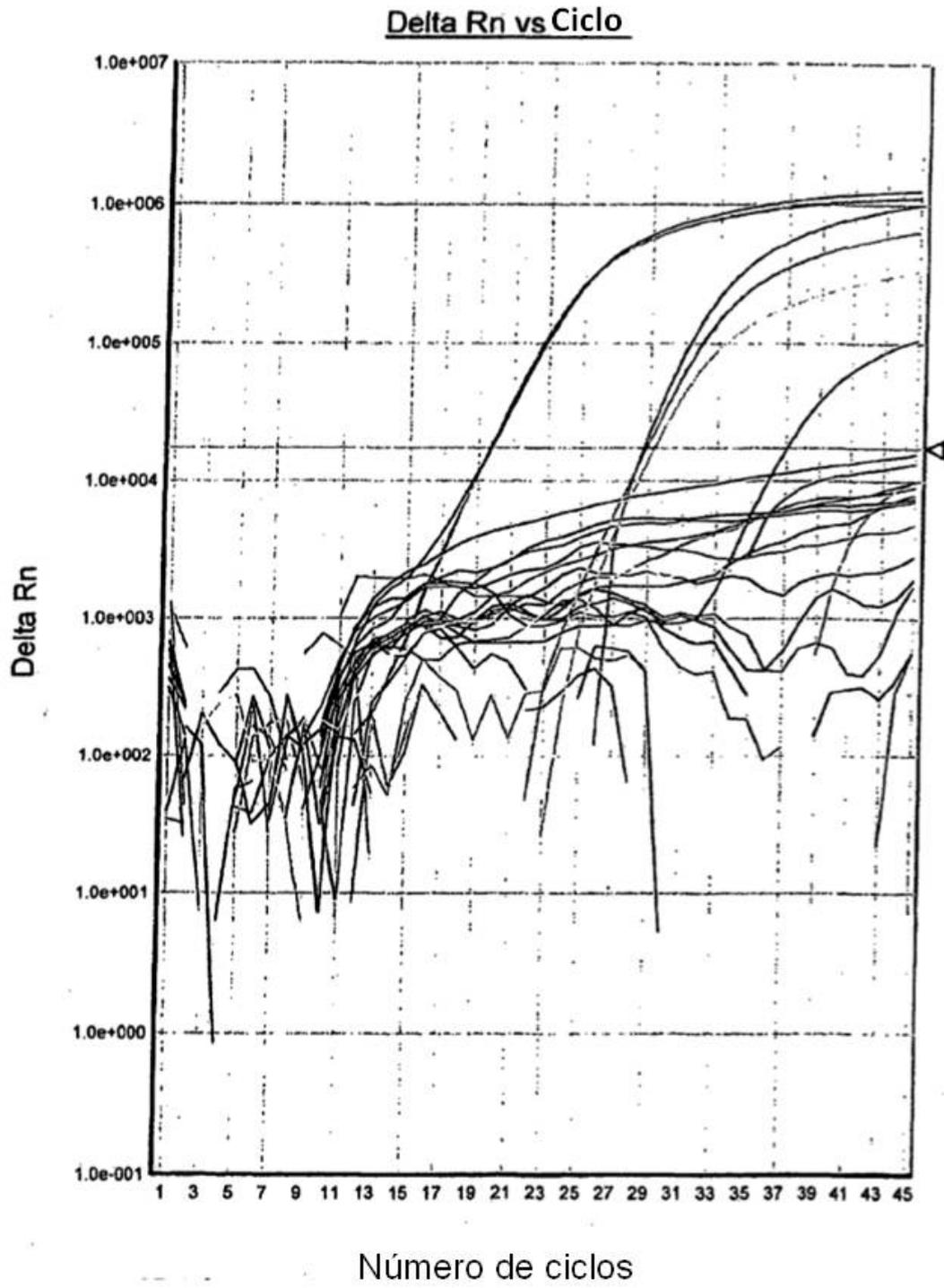


Figura 6

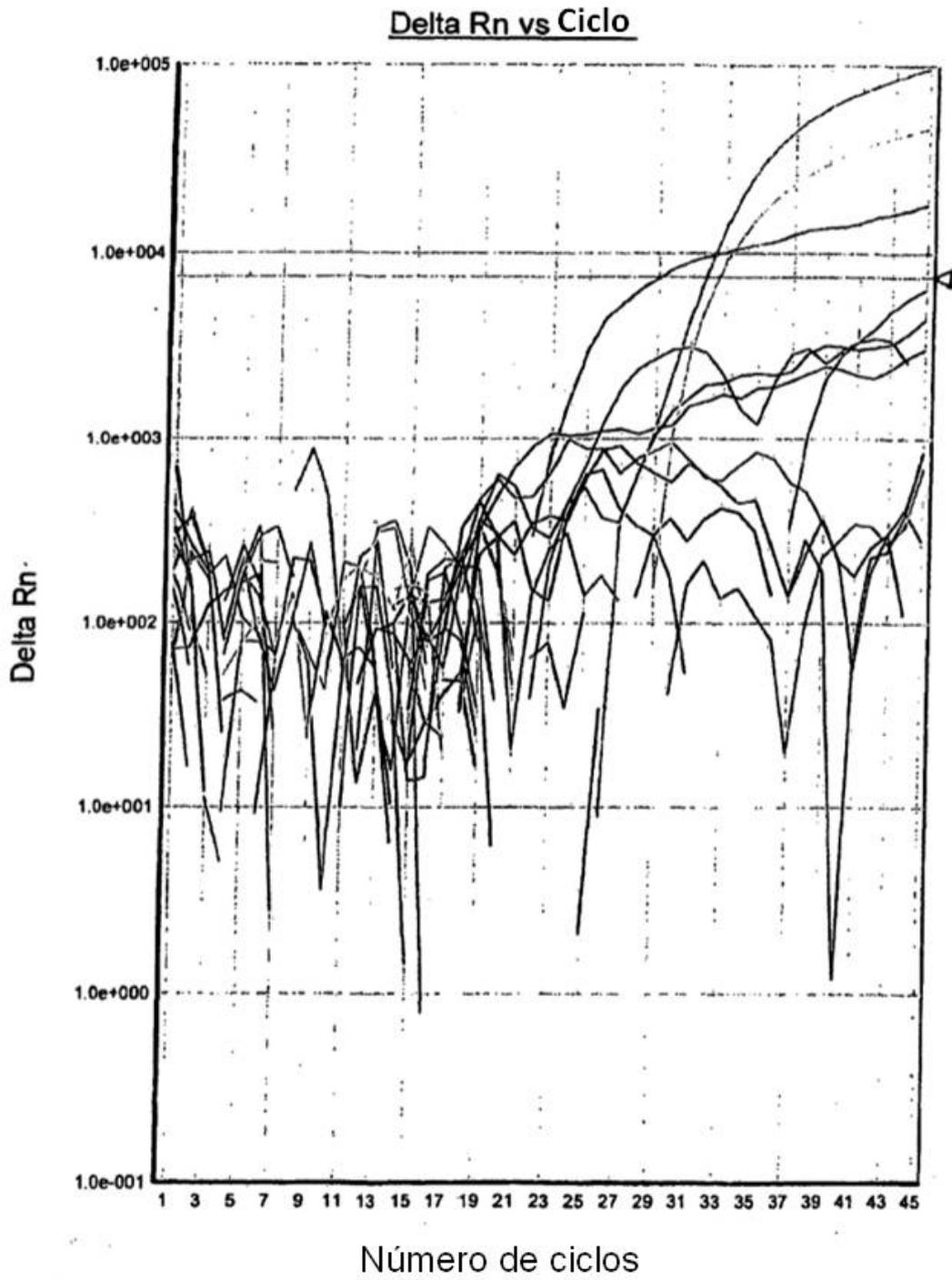


Figura 7

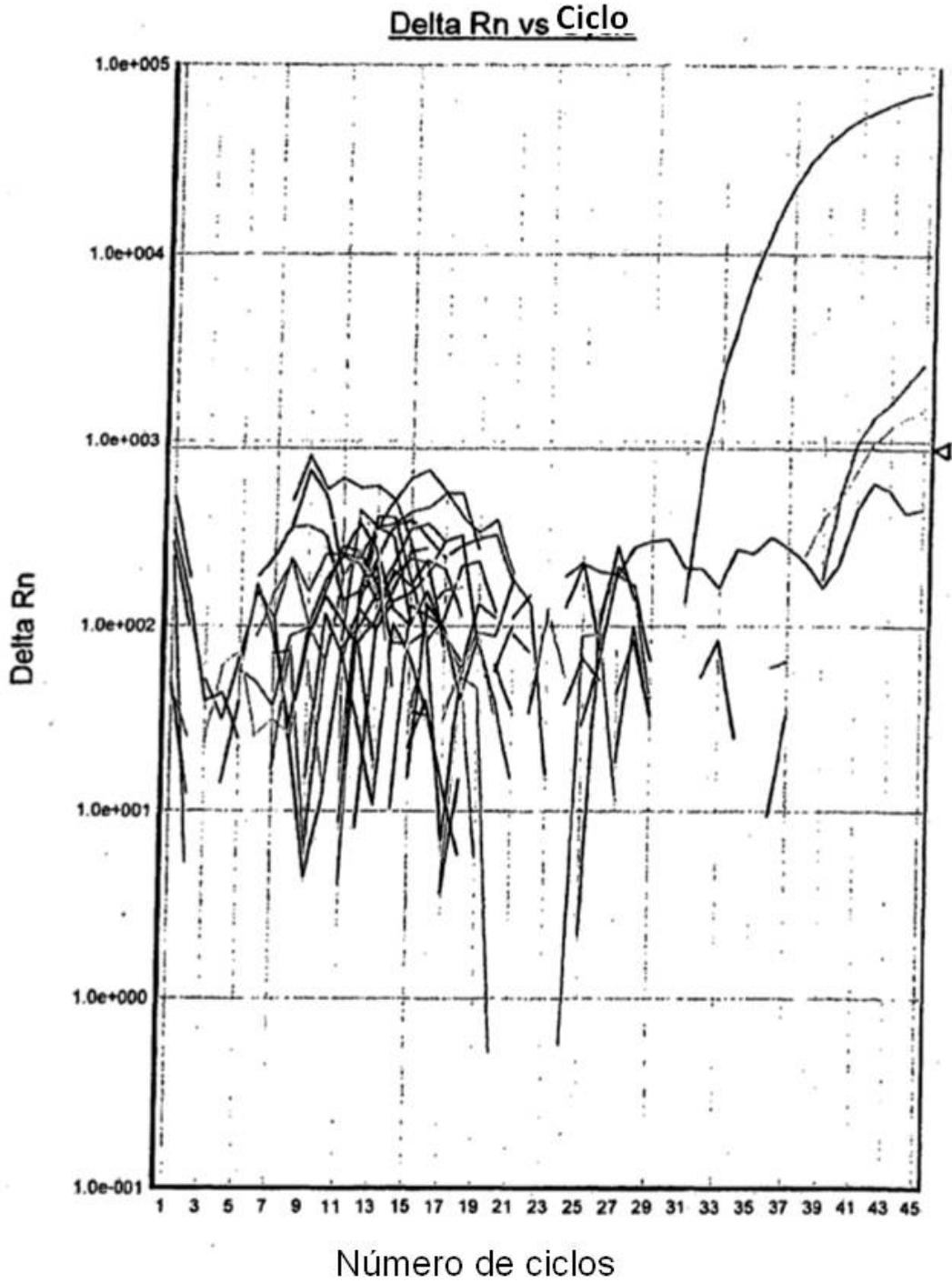


Figura 8

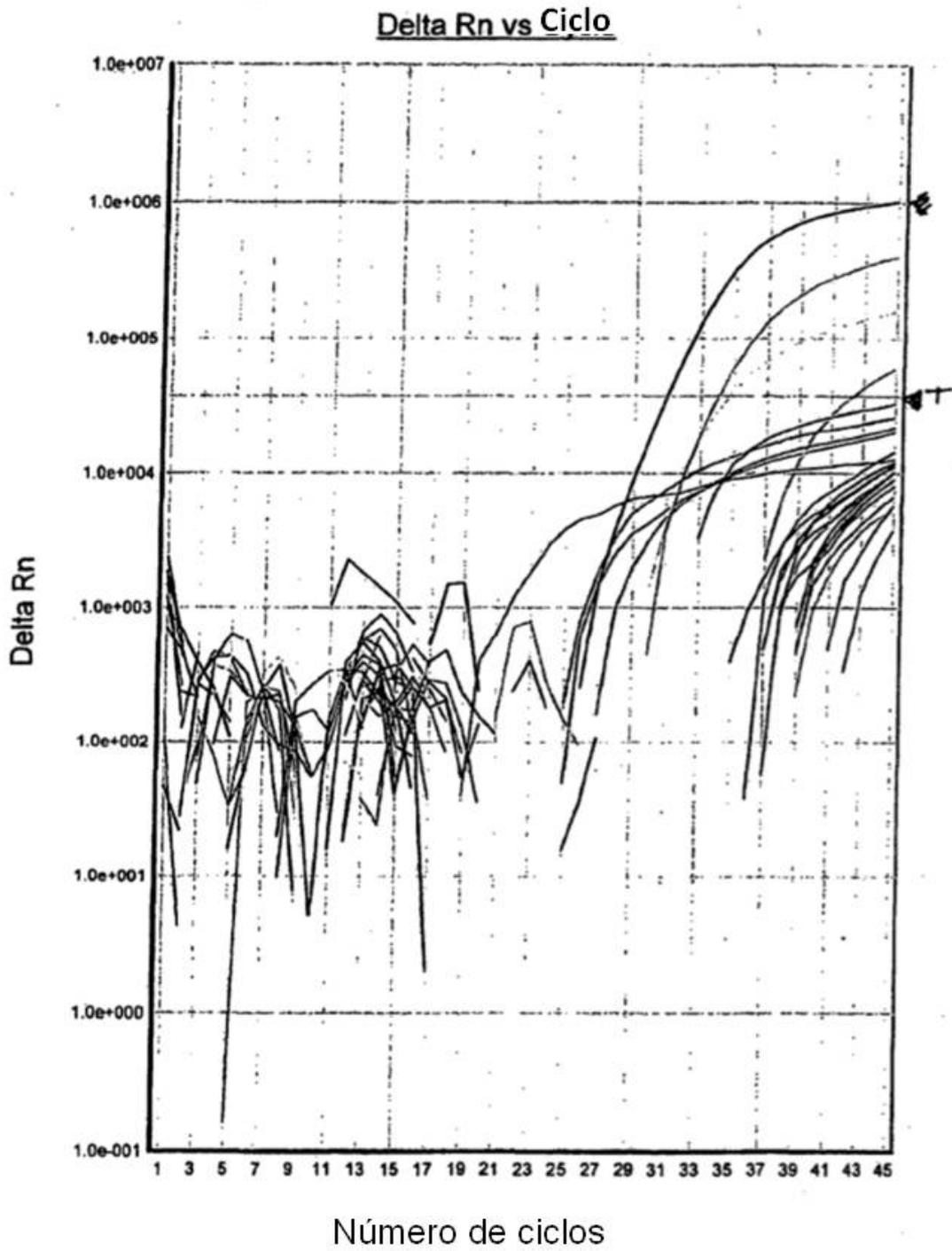


Figura 9

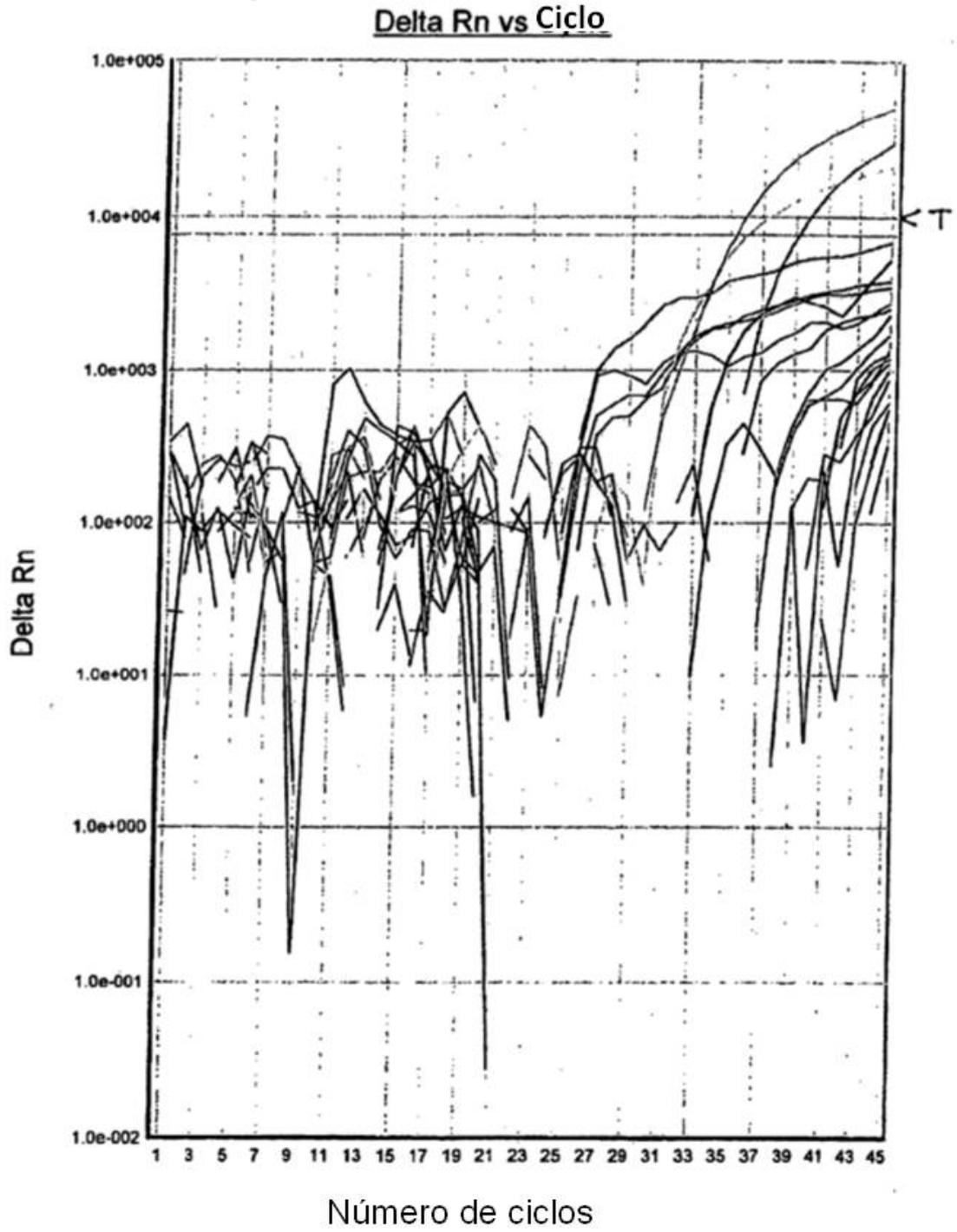


Figura 10

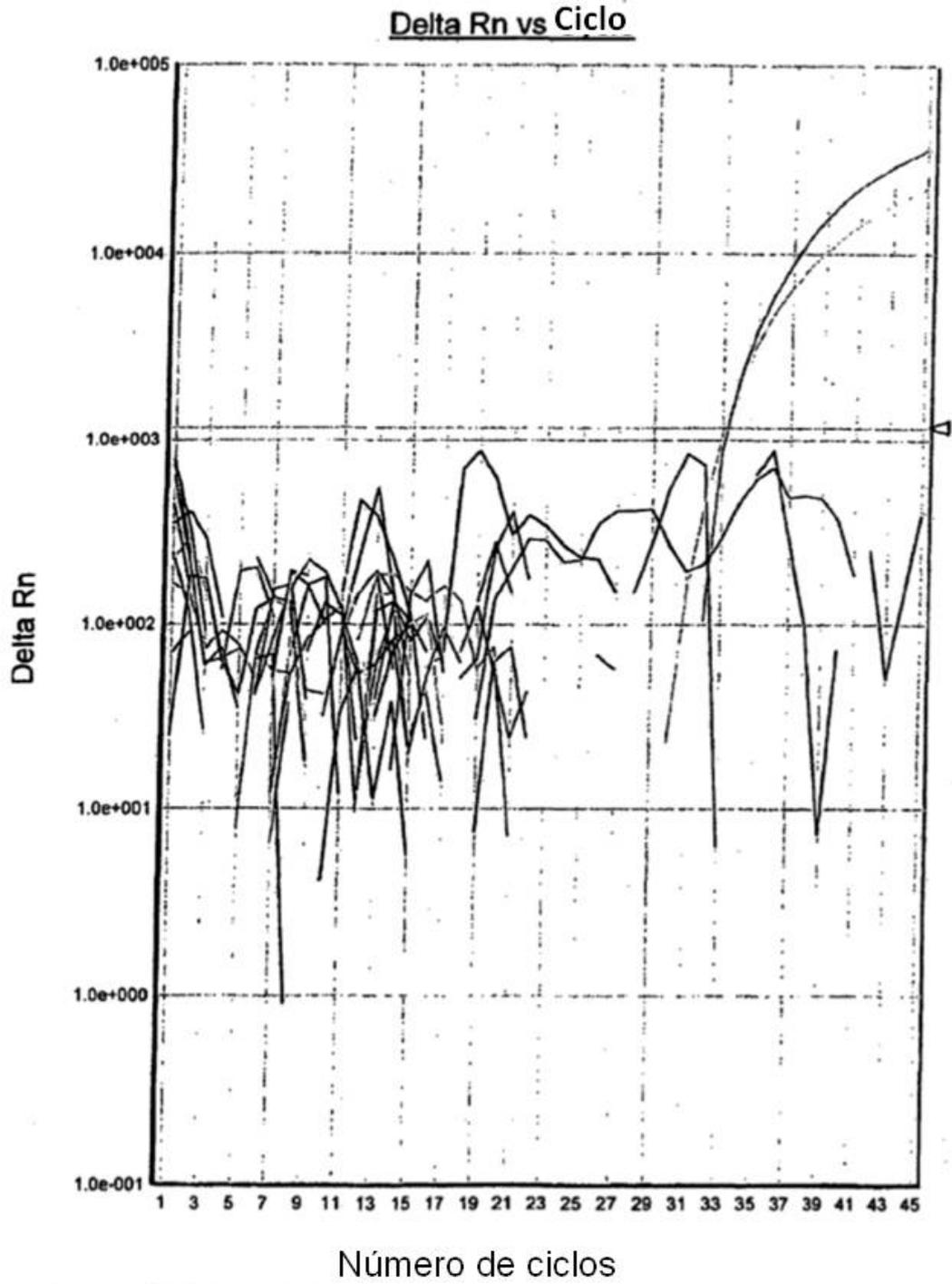


Figura 11

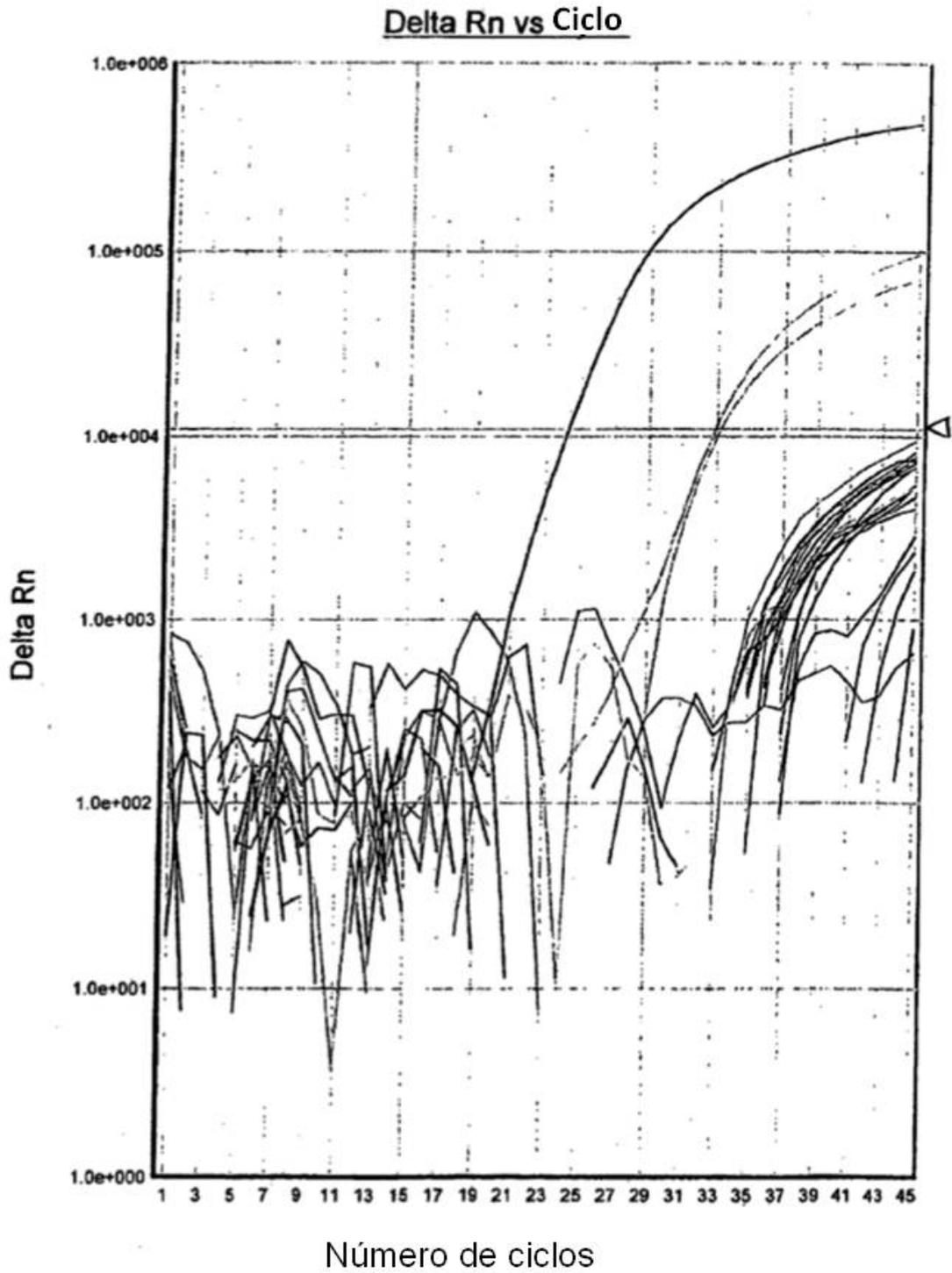


Figura 12

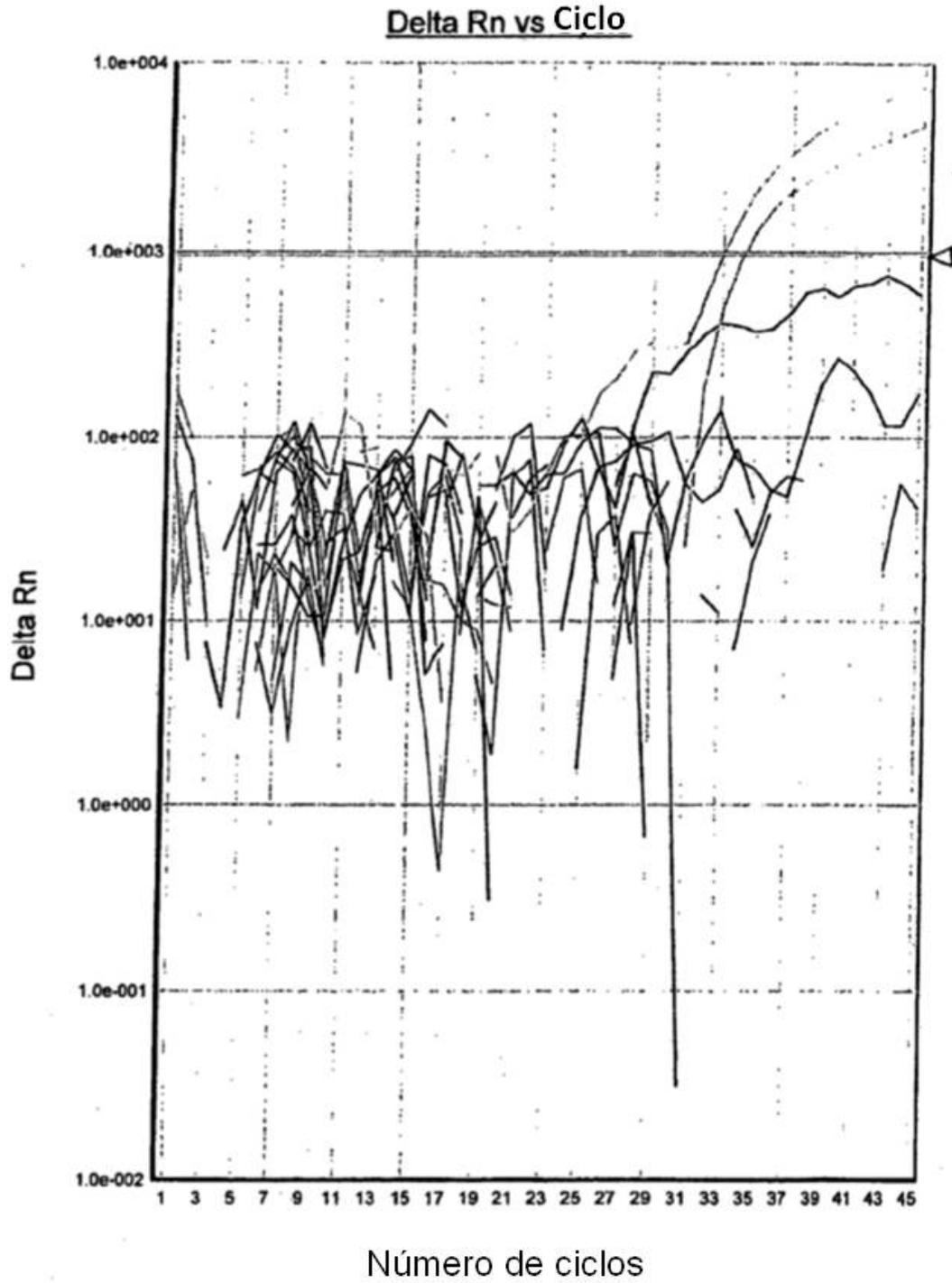


Figura 13

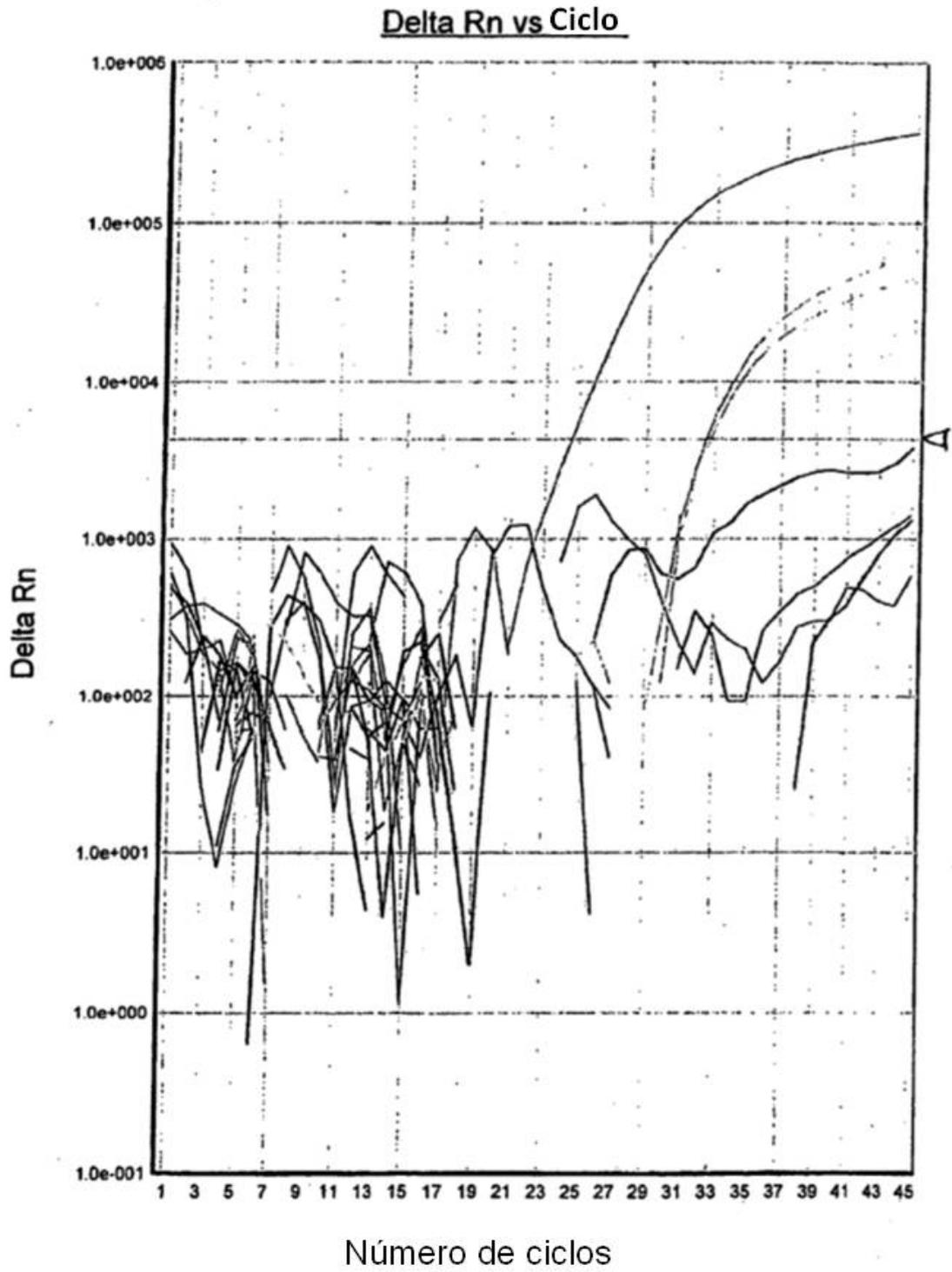


Figura 14

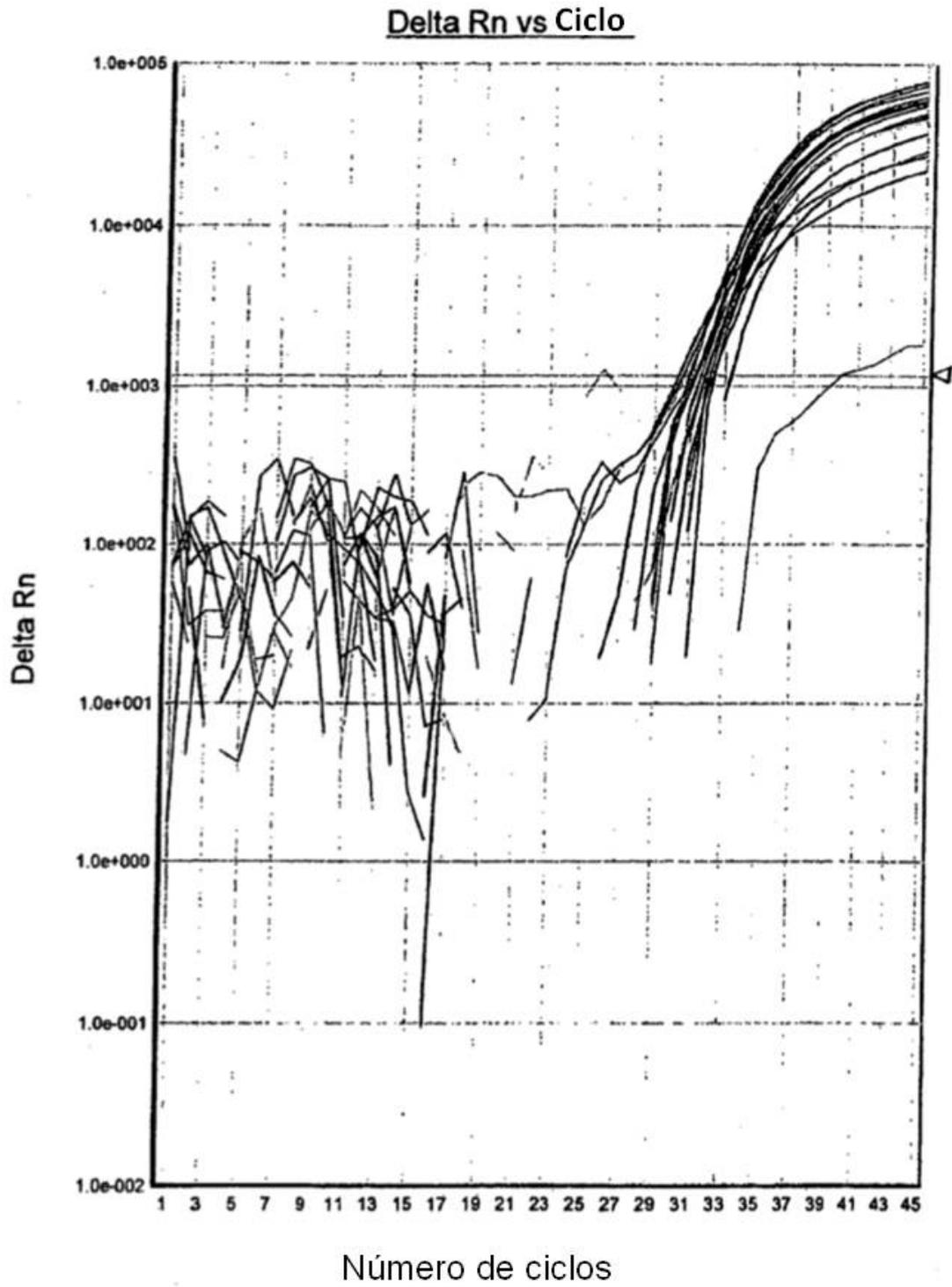


Figura 15



Amplificación de HPV16. La banda difusa es el cebador no incorporado. La banda nítida de arriba es el amplicon de HPV, 323 bp. Carril 1: 8×10^6 GU, Carril 2: 8×10^5 GU, Carril 3: 8×10^3 GU, Carril 4: 8×10^2 , Carril 5: Control negativo.

Figura 16



Amplificación de HPV18. La banda difusa es el cebador no incorporado. La banda nítida de arriba es el amplicon de HPV, 323 bp. Carril 1: 8×10^6 GU, Carril 2: 8×10^5 GU, Carril 3: 8×10^3 GU, Carril 4: 8×10^2 , Carril 5: Control negativo.

Figura 17



Amplificación de HPV33. La banda difusa es el cebador no incorporado. La banda nítida de arriba es el amplicon de HPV, 323 bp. Carril 1: 8×10^3 GU, Carril 2: 8×10^2 GU, Carril 3: 80 GU, Carril 4: 8 GU, Carril 5: Control negativo.

Figura 18



Amplificación de HPV31. La banda difusa es el cebador no incorporado. La banda nítida de arriba es el amplicon de HPV, 323 bp. Carril 1: 8×10^3 GU, Carril 2: 8×10^2 GU, Carril 3: 80 GU, Carril 4: 8 GU, Carril 5: Control negativo.

Figura 19



Amplificación de HPV56. La banda difusa es el cebador no incorporado. La banda nítida de arriba es el amplicon de HPV, 323 bp. Carril 1: 8×10^4 GU, Carril 2: 8×10^3 GU, Carril 3: 8×10^2 GU, Carril 4: 80 GU, Carril 5: Control negativo.

Figura 20



Amplificación de HPV35. La banda difusa es el cebador no incorporado. La banda nítida de arriba es el amplicon de HPV, 323 bp. Carril 1: 8×10^7 GU, Carril 2: 8×10^6 GU, Carril 3: 8×10^5 GU, Carril 4: 8×10^4 GU, Carril 5: 8×10^3 GU, Carril 6: 8×10^2 GU, Carril 7: 80 GU, Carril 8: 8 GU, Carril 9: Control negativo.