

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 728**

51 Int. Cl.:

C07H 21/02 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.01.2011 PCT/US2011/022887**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2011 WO2011094514**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2011 E 11737712 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2528932**

54 Título: **Métodos y composiciones para una purificación y un análisis múltiple específico de secuencia de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

20.04.2010 US 326067 P

29.01.2010 US 299531 P

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

08.06.2017

73 Titular/es:

QIAGEN GAITHERSBURG, INC. (100.0%)
1201 Clopper Road
Gaithersburg, MD 20878, US

72 Inventor/es:

O'NEIL, DOMINIC;
NAZARENKO, IRINA;
BASHAM, HOLLY;
VIRMANI, ARVIND;
AGARWAL, SHIULI y
SHUKLA, MRIDULA

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 615 728 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

Métodos y composiciones para una purificación y un análisis múltiple específico de secuencia de ácidos nucleicos

Campo de la invención

5 La presente descripción se refiere a métodos y conjuntos de sondas para la purificación, detección y caracterización de ácidos nucleicos.

Antecedentes

10 La identificación de la presencia o ausencia de secuencias específicas de ácidos nucleicos en una muestra es una parte central de muchos ensayos y pruebas que se utilizan en el laboratorio moderno de investigación y el ámbito clínico. En el esquema típico, los ácidos nucleicos de la muestra se separan primero de otras macromoléculas presentes en la muestra mediante una manipulación de varias propiedades físicas. Por ejemplo, los ácidos nucleicos normalmente son portadores de una carga neta negativa a pH neutro, que pertenece a la cadena principal de fosfodiéster. Esta propiedad se puede manipular para separar ácidos nucleicos de otras macromoléculas utilizando resinas de intercambio aniónico. A modo de otro ejemplo, la solubilidad diferencial de los ácidos nucleicos en comparación con otras macromoléculas, en algunos disolventes, se utiliza para extraer ácidos nucleicos de la muestra. 15 Existen numerosos esquemas diferentes de este tipo. Sin embargo, la cantidad de ácido nucleico diana con respecto a la cantidad total de ácido nucleico purificado, normalmente es muy baja. Por lo tanto, es necesario algún tipo de amplificación. O bien la cantidad de la o las secuencias de nucleótidos específicas se incrementa a través de métodos de amplificación dirigidas, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o bien la o las secuencias de nucleótidos específicas reaccionan con un marcador detectable y la señal del marcador se amplifica hasta niveles detectables. 20

Desafortunadamente, estos métodos tienen una utilidad limitada. Una limitación es que los métodos de amplificación específicos dirigidos, tales como PCR, son sustancialmente propensos a errores. Por ejemplo, aunque el rigor de la hibridación del cebador se puede controlar, existe sin embargo una posibilidad de unión no específica del cebador y de amplificación independiente del cebador, lo que puede conducir a resultados falsos positivos. Por otra parte, diferentes secuencias se pueden amplificar con diferentes velocidades, lo que da como resultado un sesgo en la amplificación. Como resultado, un análisis cuantitativo de múltiples secuencias de ácido nucleico en una sola reacción, frecuentemente experimenta una falta de sensibilidad. Además, los ácidos nucleicos diana que están presentes a concentraciones bajas en relación con otros ácidos nucleicos, pueden estar "enmascarados" eficazmente frente a la polimerasa, lo que podría dar lugar a resultados falsos negativos. Pueden existir otros factores que reducen tanto la especificidad como la sensibilidad de tales ensayos. Otra limitación de la PCR es que se amplifica un fragmento relativamente pequeño de la diana. Como resultado, en caso de mutaciones/deleciones, el ensayo puede producir resultados falsos negativos. 25 30

Por lo tanto, se necesitan métodos y composiciones para un aislamiento y análisis específico y sensible de al menos un segmento de ácido nucleico diana que contiene al menos una secuencia específica.

35 Compendio

La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas 1 a 19. La presente descripción en aspectos y realizaciones se dirige a diversas necesidades y problemas, proporcionando un método de detección y genotipificación de al menos un ácido nucleico diana y ácidos nucleicos aislados útiles para ello.

40 En un aspecto, se proporciona un ácido nucleico aislado que tiene una longitud total de no más de 100 nucleótidos que comprende, consiste esencialmente o consiste en al menos una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 75 por ciento de homología con una secuencia de nucleótidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 727 y un complemento de la misma.

45 En un aspecto, el ácido nucleico aislado es capaz de hibridarse en condiciones rigurosas con una porción de un genoma de virus del papiloma humano (HPV, del inglés "human papillomavirus"), seleccionado a partir del grupo que consiste en: HPV2, HPV3, HPV6, HPV10, HPV11, HPV16, HPV18, HPV26, HPV27, HPV28, HPV29, HPV30, HPV31, HPV32, HPV33, HPV34, HPV35, HPV39, HPV42, HPV45, HPV51, HPV52, HPV53, HPV54, HPV56, HPV57, HPV58, HPV59, HPV64, HPV66, HPV67, HPV68, HPV69, HPV70, HPV73, HPV82, HPV84, HPV85, HPV86, HPV87 y HPV94.

50 En un aspecto, el ácido nucleico es capaz de hibridarse en condiciones rigurosas selectivas con un gen de HPV seleccionado a partir del grupo que consiste de E6, E7 y L1.

En un aspecto, el ácido nucleico no es capaz de hibridarse en condiciones rigurosas con más de un genoma de virus del papiloma humano (HPV).

En un aspecto, el ácido nucleico es capaz de hibridarse en condiciones rigurosas con al menos dos de un grupo de genomas del virus del papiloma humano (HPV), seleccionados a partir del grupo que consiste en: a) grupo A7, que

consiste en HPV18, HPV39, HPV45, HPV59, HPV68, HPV70 y HPV85; y b) grupo A9, que consiste en HPV16, HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 y HPV67.

5 En otro aspecto, el ácido nucleico es capaz de hibridarse con una pareja de genomas de HPV seleccionada a partir del grupo que consiste en: a) HPV18 y HPV45; b) HPV39 y HPV68; c) HPV59 y HPV70; d) HPV70 y HPV85; e) HPV16 y HPV35; f) HPV31 y HPV35; g) HPV52 y HPV67; h) HPV33 y HPV58; i) HPV26 y HPV69; j) HPV51 y HPV82; k) HPV30 y HPV53; l) HPV56 y HPV66; m) HPV34 y HPV73; y n) HPV6 y HPV11.

10 En un aspecto, el ácido nucleico aislado tiene al menos 75 por ciento de homología a lo largo de toda su longitud con una porción del genoma del virus del papiloma humano, el HPV seleccionado a partir del grupo que consiste en: HPV2, HPV3, HPV6, HPV10, HPV11, HPV16, HPV18, HPV26, HPV27, HPV28, HPV29, HPV30, HPV31, HPV32, HPV33, HPV34, HPV35, HPV39, HPV42, HPV45, HPV51, HPV52, HPV53, HPV54, HPV56, HPV57, HPV58, HPV59, HPV64, HPV66, HPV67, HPV68, HPV69, HPV70, HPV73, HPV82, HPV84, HPV85, HPV86, HPV87 y HPV94.

En un aspecto, el ácido nucleico aislado tiene al menos 75 por ciento de homología a lo largo de toda su longitud con una porción de un gen seleccionado a partir del grupo que consiste de E6, E7 y L1.

15 En un aspecto, el ácido nucleico aislado comprende una secuencia seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 727, un ARN o ADN equivalente de la misma y un complemento de la misma.

En otro aspecto, se proporciona una sonda de ácido nucleico, que comprende un ácido nucleico aislado como se describe en el presente documento y que comprende opcionalmente además un marcador y/o un ligando detectable. En un aspecto adicional, la sonda de ácido nucleico se proporciona unida a un soporte sólido.

20 En un aspecto adicional, las sondas de ácido nucleico como se han expuesto anteriormente, se proporcionan como parte de un conjunto de sondas.

En otro aspecto, se proporciona un método para detectar un ácido nucleico diana en una muestra que comprende ácidos nucleicos no diana, comprendiendo dicho método:

a. purificar el ácido nucleico diana a partir de la muestra mediante un método que comprende:

25 (i) poner en contacto la muestra con al menos una sonda de purificación, en donde al menos una porción de la sonda de ácido nucleico se hibrida con al menos un ácido nucleico diana para formar un híbrido de ADN:ARN;

(ii) inmovilizar el híbrido de ADN:ARN sobre un primer soporte sólido mediante un método que comprende poner en contacto el híbrido de ADN:ARN con al menos un primer anticuerpo capaz de unirse al híbrido de ADN:ARN, en donde el anticuerpo está unido o se adapta para estar unido al primer soporte sólido; y

30 (iii) separar el primer soporte sólido de la muestra para generar al menos un ácido nucleico diana purificado;

b. genotipificar el ácido nucleico diana purificado mediante un método que comprende:

(i) amplificar al menos una porción del ácido nucleico diana purificado para generar un amplicón, tal como mediante una amplificación isotérmica, tal como una amplificación del genoma completo;

35 (ii) inmovilizar el amplicón sobre un segundo soporte sólido mediante un método que comprende poner en contacto el amplicón con al menos una sonda de inmovilización, en donde:

(α) la sonda de inmovilización está unida o está adaptada para estar unida al segundo soporte sólido; y

(β) al menos una porción de la sonda de inmovilización se hibrida con al menos un ácido nucleico diana;

40 (iii) poner en contacto el amplicón inmovilizado con al menos una sonda de detección, en donde la, al menos una, porción de la sonda de detección se hibrida con el, al menos uno, ácido nucleico diana para generar un complejo de detección; y

(iv) detectar al menos una primera señal detectable generada por el complejo de detección, en donde la señal detectable indica el genotipo del ácido nucleico diana.

En otro aspecto, el ácido nucleico purificado se fragmenta antes de la amplificación.

En otro aspecto, el segundo soporte sólido genera la primera señal detectable.

45 En otro aspecto, se genera una pluralidad de distintos ácidos nucleicos diana purificados.

En otro aspecto, la pluralidad de ácidos nucleicos diana purificados se pone en contacto con una pluralidad de sondas de inmovilización, en donde cada una de la pluralidad de sondas de inmovilización es específica de un ácido nucleico diana purificado distinto.

En otro aspecto, al menos dos de la pluralidad de sondas de inmovilización son específicas del mismo ácido nucleico diana purificado.

En otro aspecto, al menos dos de la pluralidad de sondas de inmovilización son específicas de diferentes regiones del mismo ácido nucleico diana purificado.

- 5 En otro aspecto, se utiliza una pluralidad de distintos segundos soportes sólidos, en donde: (α) cada segundo soporte sólido comprende al menos una sonda de inmovilización específica de un ácido nucleico diana único y no comprende ninguna sonda de inmovilización específica de cualquier otro de la pluralidad de ácidos nucleicos diana; y (β) cada soporte sólido genera una primera señal detectable única que indica el genotipo del ácido nucleico diana.

- 10 En otro aspecto, se genera una segunda señal detectable que indica la inmovilización del amplicón sobre el segundo soporte sólido.

En otro aspecto, la sonda de detección comprende un marcador detectable que genera la segunda señal detectable.

En otro aspecto, la segunda señal detectable indica además el genotipo del ácido nucleico diana.

En otro aspecto, la segunda señal detectable indica además la cantidad de amplicón inmovilizado sobre cada soporte sólido.

- 15 En otro aspecto, la primera señal detectable indica un genotipo de un virus del papiloma humano (HPV) seleccionado a partir del grupo que consiste en: los tipos de HPV de alto riesgo (HR-HPV) 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82; y los tipos de HPV de bajo riesgo (LR-HPV) 2, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 27, 28, 30, 32, 40, 42, 43, 53, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 74, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90 y 91.

- 20 En otro aspecto, al menos una entre la sonda de la purificación, la sonda de inmovilización y/o la sonda de detección comprende un ácido nucleico aislado que tiene una longitud total de no más de 100 nucleótidos y que comprende una secuencia que tiene al menos 75 por ciento de homología con una secuencia de nucleótidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 727, un ADN o ARN equivalente de la misma y un complemento de la misma.

- 25 En otro aspecto, la sonda de purificación comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 727 y un complemento de la misma.

En otro aspecto, la sonda de inmovilización comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 344 a SEQ ID NO: 727 y un complemento de la misma.

En otro aspecto, la sonda de detección comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 727 y un complemento de la misma.

- 30 En otro aspecto, se proporciona un método que comprende:

a. una etapa de purificación que comprende:

- generar un híbrido de ácido nucleico bicatenario de al menos un ácido nucleico diana mediante hibridación de al menos un ácido nucleico diana con un conjunto de sondas híbridas que comprende al menos una primera sonda de ácido nucleico específica del al menos un ácido nucleico diana;

- 35 - inmovilizar el híbrido de ácido nucleico bicatenario sobre un primer soporte sólido por medio de poner en contacto el híbrido de ácido nucleico bicatenario con al menos un primer anticuerpo capaz de unirse al híbrido de ácido nucleico bicatenario y unir el al menos un primer anticuerpo con el primer soporte sólido; y

- separar el híbrido de ácido nucleico bicatenario de la muestra para generar al menos un ácido nucleico purificado;

- 40 b. una etapa de amplificación, en donde al menos una porción del al menos un ácido nucleico purificado se amplifica para generar ácidos nucleicos amplificados; y

c. una etapa de genotipificación que comprende:

- 45 - inmovilizar los ácidos nucleicos amplificados con al menos un segundo soporte sólido mediante la hibridación de los ácidos nucleicos amplificados con un conjunto de sondas de inmovilización que comprende al menos una sonda de polinucleótido específica del al menos un ácido nucleico diana; y

- detectar la presencia del al menos un ácido nucleico diana con un conjunto de sondas de detección que comprende al menos una sonda de polinucleótido específica del al menos un ácido nucleico diana.

En un aspecto adicional, la etapa de amplificación comprende una amplificación isotérmica.

En un aspecto adicional, la etapa de amplificación comprende una amplificación del genoma completo.

En un aspecto adicional, los ácidos nucleicos amplificados están fragmentados antes de la etapa de genotipificación.

En un aspecto adicional, el conjunto de sondas de inmovilización está unido a una pluralidad de soportes sólidos colocados en suspensión.

5 En un aspecto adicional, la pluralidad de soportes sólidos está marcada de forma detectable.

En un aspecto adicional, los métodos descritos en la presente memoria están adaptados para detectar la presencia de una pluralidad de ácidos nucleicos diana.

En un aspecto adicional, el conjunto de sondas de inmovilización comprende al menos una sonda específica para cada uno de la pluralidad de ácidos nucleicos diana.

10 En un aspecto adicional, el conjunto de sondas de inmovilización consiste esencialmente en dos sondas específicas para cada uno de la pluralidad de ácidos nucleicos diana.

En un aspecto adicional, las dos sondas específicas de la pluralidad de ácidos nucleicos diana se unen a regiones distintas de las variantes.

15 En un aspecto adicional, cada soporte sólido de la pluralidad de soportes sólidos contiene solo sondas específicas de un ácido nucleico de la pluralidad de ácidos nucleicos diana, de manera que solo un ácido nucleico de la pluralidad de ácidos nucleicos diana se unirá a cada uno de la pluralidad de soportes sólidos.

20 En un aspecto adicional, cada uno de la pluralidad de soportes sólidos está marcado de forma detectable, de tal manera que un soporte sólido específico de un primer ácido nucleico de la pluralidad de ácidos nucleicos diana es portador de un marcador detectable diferente de un soporte sólido específico de un segundo nucleico ácido de la pluralidad de ácidos nucleicos diana.

En un aspecto adicional, el conjunto de sondas de detección está marcado de forma detectable.

En un aspecto adicional, el marcador detectable de cada uno de la pluralidad de soportes sólidos se emplea para indicar la identidad del ácido nucleico diana unido al mismo; y el marcador detectable del conjunto de sondas de detección se utiliza para indicar la cantidad relativa del ácido nucleico diana unido a cada soporte sólido.

25 En un aspecto adicional, el al menos un ácido nucleico diana es un ácido nucleico del virus del papiloma humano (HPV).

30 En un aspecto adicional, el ácido nucleico de HPV se selecciona a partir del grupo que consiste en: los tipos de HPV de alto riesgo (HR-HPV) 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82; y los tipos de HPV de bajo riesgo (LR-HPV) 2, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 27, 28, 30, 32, 40, 42, 43, 53, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 74, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90 y 91.

En un aspecto adicional, se detecta una pluralidad de ácidos nucleicos del HPV.

35 En un aspecto adicional, la pluralidad de ácidos nucleicos del HPV comprende, consiste o consiste esencialmente en: los tipos de HR-HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82, o cualquier subconjunto del mismo; y/o los tipos de LR-HPV 2, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 27, 28, 30, 32, 40, 42, 43, 53, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 74, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90 y 91, o cualquier subconjunto del mismo.

En un aspecto adicional, los métodos descritos en este documento están adaptados de tal manera que 59 tipos de HPV de alto riesgo y bajo riesgo se pueden detectar e identificar en una sola reacción.

40 En otro aspecto, se proporciona un kit para la genotipificación de un ácido nucleico que comprende: (a) un ácido nucleico aislado como se describe en el presente documento; (b) una polimerasa de ácido nucleico; (c) un cebador; (d) un primer soporte sólido; (e) un anticuerpo anti-híbrido de ADN:ARN unido o adaptado para unirse al primer soporte sólido; y (f) un segundo soporte sólido marcado de forma detectable.

Breve descripción de los dibujos

45 La Figura 1A es una representación gráfica de los resultados de una amplificación convencional y de cómo el ADN genómico humano reduce la amplificación de la diana deseada; y la Figura 1B es una representación gráfica de los resultados de una captura de híbridos y de una amplificación y de cómo la amplificación de la diana deseada no se reduce con el ADN genómico humano.

La Figura 2 es un gráfico que muestra los resultados de una reacción múltiple 20-plex que detecta infecciones cuádruples de HPV.

La Figura 3A es una representación gráfica de los resultados de detección de dianas con diversos volúmenes

de amplicones; y 3B es una representación gráfica de los resultados de detección de dianas después de una amplificación durante una noche.

Las Figuras 4A y 4B son representaciones gráficas de resultados de detección de dianas para dos tipos de HPV.

5 La Figura 5 es una representación gráfica de los resultados de un experimento múltiple que analiza 26 tipos de HPV y todos los tipos de HR-HPV.

La Figura 6 es una tabla de datos que muestra los valores de S/N de los resultados de un experimento múltiple que analiza 26 tipos de HPV y todos los tipos de HR-HPV.

10 La Figura 7 es una representación gráfica de los resultados de la detección de una infección con un solo tipo de HPV.

La Figura 8 es una representación gráfica de los resultados de la detección de una infección con un solo tipo de HPV.

La Figura 9 es una representación gráfica de los resultados de la detección de una infección con cuatro tipos de HPV.

15 La Figura 10 es una representación gráfica de los resultados de la detección de una infección con dos tipos de HPV.

La Figura 11 es un esquema que ilustra la captura de híbridos, la amplificación del genoma completo y la detección de los ácidos nucleicos diana.

Descripción detallada

20 La presente descripción incluye métodos, composiciones, reactivos y kits para determinar la presencia de al menos un ácido nucleico diana en una muestra. Los métodos, composiciones, reactivos, sistemas y kits se pueden utilizar con fines de diagnóstico clínico, incluyendo pero no limitados a la detección e identificación de organismos patógenos y la detección de una predisposición genética hacia una enfermedad particular.

I. Muestras y preparación de muestras

25 A. Muestras

Se puede emplear cualquier muestra como punto de partida, incluyendo, sin limitación, un espécimen o un cultivo (por ejemplo, cultivos celulares, microbiológicos y víricos), incluyendo muestras biológicas clínicas y de laboratorio y muestras del medio ambiente. Las muestras biológicas pueden ser de un animal, incluyendo un ser humano, líquidas, sólidas (por ejemplo, heces) o de un tejido, así como productos e ingredientes líquidos y sólidos de alimentos y piensos, tales como artículos lácteos, vegetales, cárnicos y subproductos cárnicos y residuos. Las muestras ambientales incluyen material ambiental tal como muestras de materia de la superficie, suelo, agua e industriales, así como muestras obtenidas a partir de instrumentos, aparatos, equipos, utensilios, artículos desechables y no desechables de procesamiento de alimentos y productos lácteos.

30 Las muestras biológicas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, células epiteliales del cuello uterino (por ejemplo, una muestra obtenida a partir de un hisopo cervical), células adenoides, células epiteliales anales, sangre, saliva, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, leche, linfa, esputo y semen.

En un aspecto, la muestra biológica se recoge y se almacena en un medio de recogida. El medio de recogida tiene diversas funciones que se incluyen como un medio conservante para conservar ácidos nucleicos e inhibir nucleasas para evitar una degradación de los ácidos nucleicos antes del análisis. En un aspecto, el medio de recogida es a base de detergente. Sin limitaciones, los medios de recogida a modo de ejemplo incluyen los que se encuentran en los documentos de publicación de patente de EE.UU. n° US 2010-0105060 A1 y de publicación de patente de EE.UU. n° US 2010- 0159463 A1.

En un aspecto el medio de recogida a base de detergente comprende, consiste esencialmente o consiste en 1,0% de NP-40, 0,25% de desoxicolato de sodio, Tris-HCl 50 mM, EDTA 25 mM, NaCl 150 mM y 0,05% de azida de sodio. En otro aspecto, el medio de recogida a base de detergente comprende, consiste esencialmente o consiste en desde aproximadamente 0,5% a aproximadamente 2,0% de NP-40, desde aproximadamente 0,10% a aproximadamente 0,40% de desoxicolato de sodio, Tris-HCl desde aproximadamente 25 mM a aproximadamente 75 mM, EDTA desde aproximadamente 10 mM hasta aproximadamente 50 mM, NaCl desde aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM y desde aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,10% de azida de sodio. En otros aspectos, el medio de recogida a base de detergente comprende, consiste esencialmente o consiste en desde aproximadamente 0,8% a aproximadamente 1,5% de NP-40, desde aproximadamente 0,20% a aproximadamente 0,40% de desoxicolato de sodio, Tris-HCl desde aproximadamente 30 mM a aproximadamente 60 mM, EDTA desde aproximadamente 20 mM hasta aproximadamente 40 mM, NaCl desde aproximadamente 100 mM a aproximadamente

200 mM y desde aproximadamente 0,025% a aproximadamente 0,075% de azida de sodio. En todavía otro aspecto, el medio de recogida a base de detergente comprende, consiste esencialmente o consiste en desde aproximadamente 0,9% a aproximadamente 1,2% de NP-40, desde aproximadamente 0,20% a aproximadamente 0,30% de desoxicolato de sodio, Tris-HCl desde aproximadamente 30 mM a aproximadamente 60 mM, EDTA desde aproximadamente 20 mM hasta aproximadamente 30 mM, NaCl desde aproximadamente 100 mM a aproximadamente 150 mM y desde aproximadamente 0,04% a aproximadamente 0,06% de azida de sodio

En un aspecto, el medio de recogida comprende, consiste esencialmente o consiste en NP-40 y EDTA. En otro aspecto, el medio de recogida comprende, consiste esencialmente o consiste en NP-40, EDTA y azida de sodio. En un aspecto, el medio de recogida comprende, consiste esencialmente o consiste en desoxicolato de sodio, EDTA y azida de sodio. En un aspecto, el medio de recogida comprende, consiste esencialmente o consiste en aproximadamente NP-40, desoxicolato de sodio, EDTA y azida de sodio. En un aspecto, el medio de recogida comprende, consiste esencialmente o consiste en NP-40, desoxicolato de sodio, Tris-HCl, EDTA y azida de sodio.

En otro aspecto, el medio de recogida comprende, consiste esencialmente o consiste en desde 0,5% a aproximadamente 2,0% de NP-40 y EDTA desde 10 mM a aproximadamente 50 mM. En otro aspecto, el medio de recogida comprende, consiste esencialmente o consiste en desde 0,5% a aproximadamente 2,0% de NP-40, EDTA desde 10 mM a aproximadamente 50 mM y desde aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,10% de azida de sodio. En un aspecto, el medio de recogida comprende, consiste esencialmente o consiste en desde aproximadamente 0,10% a aproximadamente 0,40% de desoxicolato de sodio, EDTA desde 10 mM a aproximadamente 50 mM y desde aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,10% de azida de sodio. En un aspecto, el medio de recogida comprende, consiste esencialmente o consiste en desde aproximadamente 0,5% a aproximadamente 2,0% de NP-40, desde aproximadamente 0,10% a aproximadamente 0,40% de desoxicolato de sodio, EDTA desde 10 mM a aproximadamente 50 mM y desde aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,10% de azida de sodio. En un aspecto, el medio de recogida comprende, consiste esencialmente o consiste en desde aproximadamente 0,5% a aproximadamente 2,0% de NP-40, desde aproximadamente 0,10% a aproximadamente 0,40% de desoxicolato de sodio, Tris-HCl desde aproximadamente 25 mM a aproximadamente 75 mM, EDTA desde aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM y desde aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,10% de azida de sodio. En ciertos aspectos, el medio comprende o consiste esencialmente en 1% de NP-40, 0,25% de desoxicolato de sodio, Tris-HCl 50 mM, EDTA 25 mM, NaCl 150 mM y 0,09% de azida de sodio. Este medio se denomina frecuentemente en la presente memoria medio de recogida Digene o DCM.

Las muestras se pueden recoger en otros medios de recogida conocidos y se pueden utilizar en los métodos descritos en el presente documento. Ejemplos de otros medios de recogida incluyen PRESERVCYT, SUREPATH, orina y STM (Medio de Transporte de Muestras/Especímenes). Las muestras recogidas en algunos de estos medios pueden requerir un procesamiento antes de que los ácidos nucleicos en las muestras se puedan detectar y analizar. Diversos métodos de procesamiento de muestras (también conocidos como preparación de muestras) se conocen en la técnica. Por ejemplo, muestras de células cervicales recogidas para un análisis citológico en un medio tal como PRESERVCYT, se pueden combinar con un tampón de lisis a base de detergente seguido por la adición de perlas magnéticas que comprenden superficies que se unen a ácidos nucleicos.

En otro aspecto, la muestra puede comprender, consistir o consistir esencialmente en ácidos nucleicos que han sido extraídos a partir de una muestra biológica. Se conocen numerosos métodos para la extracción de ácidos nucleicos a partir de una muestra biológica o ambiental, incluyendo, pero no limitados a: extracción con fenol/cloroformo; cromatografía de intercambio de aniones; ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio; cromatografía de exclusión por tamaño; y extracción en sal de sílice/caotrópica. Los ácidos nucleicos extraídos se pueden separar adicionalmente de acuerdo con el tamaño, mediante electroforesis en gel y extraer del gel si se desean muestras que comprendan tamaños específicos de ácido nucleico.

B. Ácidos nucleicos diana

Como se ha señalado anteriormente, los métodos descritos en este documento se refieren a la detección y determinación del genotipo de al menos un ácido nucleico diana en una muestra. El al menos un ácido nucleico diana puede ser ADN o ARN, o ambos ADN y ARN y puede ser de cadena sencilla, de cadena doble o parcialmente de cadena sencilla. El al menos un ácido nucleico diana puede estar contenido dentro de un ácido nucleico más grande. La detección del al menos un ácido nucleico diana o del ácido nucleico más grande que comprende el al menos un ácido nucleico diana, se contempla en la presente descripción.

El al menos un ácido nucleico diana puede incluir, sin limitación, ácidos nucleicos que se encuentran en especímenes o cultivos (por ejemplo, cultivos celulares, microbiológicos y víricos), incluyendo muestras biológicas y ambientales. El al menos un ácido nucleico diana se puede encontrar en muestras biológicas procedentes de un animal, incluyendo un ser humano, líquidas, sólidas (por ejemplo, heces) o tisulares, así como productos e ingredientes líquidos y sólidos de alimentos y piensos, tales como artículos lácteos, vegetales, cárnicos y subproductos cárnicos y residuos. El al menos un ácido nucleico diana se puede encontrar en muestras ambientales e incluyen material ambiental tal como muestras de materia de la superficie, suelo, agua e industriales, así como muestras obtenidas a partir de instrumentos, aparatos, equipos, utensilios, artículos desechables y no desechables de procesamiento de alimentos y productos lácteos.

El al menos un ácido nucleico diana encontrado en muestras biológicas incluye, pero no se limita a, muestras cervicales (por ejemplo, una muestra obtenida a partir de un hisopo cervical) o muestras de células cervicales, células adenoides, células epiteliales anales, sangre, saliva, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, leche, linfa, esputo, orina y semen. El al menos un ácido nucleico diana puede proceder de otros virus, bacterias, micobacterias o plasmodios, como el citomegalovirus (CMV), virus herpes simple (HSV), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), H1N1, *Neisseria gonorrhoeae* (GC), *Chlamydia trachomatis* (CT), *Trichomonas vaginalis*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, coronavirus asociado a SARS o de la gripe.

En un aspecto, el al menos un ácido nucleico diana es al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 98%, al menos 99% o al menos 100% idéntico a los ácidos nucleicos que están asociados con una cualquiera de las muestras cervicales (por ejemplo, una muestra obtenida a partir de un hisopo cervical) o muestras de células cervicales, células adenoides, células epiteliales anales, sangre, saliva, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, leche, linfa, esputo, orina y semen, otros virus, bacterias, micobacterias o plasmodios, por ejemplo, citomegalovirus (CMV), virus herpes simple (HSV), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), H1N1, *Neisseria gonorrhoeae* (GC), *Chlamydia trachomatis* (CT), *Trichomonas vaginalis*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, coronavirus asociado a SARS o de la gripe.

En un aspecto, el al menos un ácido nucleico diana es un ácido nucleico de HPV. En otro aspecto, el ácido nucleico de HPV es ADN de HPV de un tipo de HR-HPV. En otro aspecto, el ácido nucleico de HPV es ARN de HPV de un tipo de LR-HPV. En otro aspecto, el al menos un ácido nucleico diana es uno cualquiera entre los tipos de HR-HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82, o uno cualquiera entre los tipos de LR-HPV 2, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 27, 28, 30, 32, 40, 42, 43, 53, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 74, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90 y 91.

En otro aspecto, una pluralidad de ácidos nucleicos diana está dirigida. En un aspecto, la pluralidad de ácidos nucleicos diana consiste en un conjunto de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 ácidos nucleicos que tienen secuencias de nucleótidos distintas. Se puede utilizar cualquier conjunto de ácidos nucleicos que se vaya a dirigir. En un aspecto, la pluralidad de ácidos nucleicos diana se selecciona de modo que cada uno se relacione con los demás. A modo de ejemplo y no como una limitación, en el conjunto, los ácidos nucleicos pueden estar: estructuralmente relacionados entre sí (por ejemplo, miembros de una familia de genes); funcionalmente relacionados entre sí (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican citocinas proinflamatorias); filogenéticamente relacionados entre sí (por ejemplo, ácidos nucleicos específicos de diferentes miembros de una familia de virus, tal como la familia del virus HPV); relacionados en virtud de una expresión diferencial en un tipo de célula o de tejido diferente (por ejemplo, ácidos nucleicos asociados con macrófagos y ácidos nucleicos asociados con la próstata) o estados de enfermedad (ácidos nucleicos asociados con el cáncer de cuello uterino). En otro aspecto, en el conjunto, los ácidos nucleicos no están relacionados.

En un aspecto, un conjunto de ácidos nucleicos diana comprende, consiste o consiste esencialmente en los tipos de HR-HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82 o cualquier subconjunto del mismo. En otro aspecto, un conjunto de ácidos nucleicos diana comprende, consiste o consiste esencialmente en los tipos de LR-HPV 2, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 27, 28, 30, 32, 40, 42, 43, 53, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 74, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90 y 91 o cualquier subconjunto del mismo. En otro aspecto, un conjunto de ácidos nucleicos diana comprende, consiste o consiste esencialmente en los tipos de HR-HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82 o cualquier subconjunto del mismo; y los tipos de LR-HPV 2, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 27, 28, 30, 32, 40, 42, 43, 53, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 74, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90 y 91 o cualquier subconjunto del mismo. En otro aspecto, el al menos un ácido nucleico diana es al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 98%, al menos 99% o 100% idéntico a los ácidos nucleicos asociados con uno cualquiera entre HPV, variantes genéticas de HPV, ADN de HPV de un tipo de HR-HPV o ARN de HPV de un tipo de HR-HPV. En otro aspecto, el al menos un ácido nucleico diana es al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 98%, al menos 99% o al menos 100% idéntico a los ácidos nucleicos asociados con uno cualquiera de los tipos de HR-HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82 o uno cualquiera de los tipos de LR-HPV 2, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 27, 28, 30, 32, 40, 42, 43, 53, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 74, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90 y 91.

Como se ha señalado anteriormente, el al menos un ácido nucleico diana puede ser ADN o ARN. Cuando el al menos un ácido nucleico diana es ADN, la sonda puede ser ARN y cuando el al menos un ácido nucleico diana es ARN, la sonda puede ser ADN. Sin embargo, una sonda de ADN se puede utilizar con el ADN de al menos un ácido nucleico diana y una sonda de ARN se puede usar con el ARN de al menos un ácido nucleico diana.

C. Preparación de la muestra

Después de recoger la muestra en un medio de recogida como se ha descrito anteriormente, la muestra se puede tratar con un reactivo para la desnaturalización para hacer que el al menos un ácido nucleico diana sea accesible para una hibridación. En un aspecto, la muestra se desnaturaliza con una solución alcalina. Sin ser una limitación, los álcalis adecuados incluyen NaOH y KOH.

El tratamiento alcalino de proteínas homogeniza con eficacia el espécimen para asegurar la capacidad de reproducir los resultados del análisis para una muestra dada. También puede reducir la viscosidad de la muestra para aumentar la cinética, homogenizar la muestra y reducir el ruido de fondo mediante la destrucción cualquier ácido nucleico endógeno de ARN de cadena sencilla, híbridos de ADN-ARN o híbridos de ARN-ARN en la muestra. También ayuda el inactivar enzimas tales como ARNasas y ADNasas que pueden estar presentes en la muestra. Un experto en la técnica apreciará que si el ARN es el al menos un ácido nucleico diana (a diferencia de ADN), pueden ser preferibles diferentes reactivos, incluyendo pero no limitados a extracción con fenol y precipitación con TCA/acetona y extracción con tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo.

Se pueden emplear otros métodos de desnaturalización, tales como la utilización de una etapa de calentamiento, por ejemplo, calentando la muestra a aproximadamente 95°C para separar las cadenas de ácido nucleico. También se pueden emplear enzimas tales como la helicasa.

II. Purificación

En el ensayo típico para detectar ácidos nucleicos en una muestra, se lleva a cabo una gran extracción no específica de ácidos nucleicos. Después, el usuario intenta amplificar o detectar el ácido nucleico diana en presencia de este grupo grande de ácidos nucleicos no específicos. Sin embargo, el grupo de ácidos nucleicos no específicos interfiere frecuentemente con la etapa de amplificación o detección deseada, particularmente cuando el ácido nucleico diana está en una concentración baja, en comparación con los ácidos nucleicos no específicos. Por tanto, los métodos descritos ahora separan el ácido nucleico diana del grupo de ácidos nucleicos no específicos, antes de que se lleve a cabo la detección mediante: (1) hibridación de una sonda de purificación de polinucleótidos específica de secuencia para el ácido nucleico diana, para formar un híbrido de ácido nucleico de cadena doble; (2) formación de un complejo entre el híbrido de ácido nucleico de cadena doble y al menos una molécula que se une específicamente a los híbridos de ácido nucleico de cadena doble; y (3) captura del complejo sobre un soporte sólido.

A. Hibridación de las sondas

Después de que la muestra que comprende el ácido nucleico se ha preparado para la hibridación, se pone en contacto con al menos una sonda híbrida de polinucleótidos, en condiciones suficientes para que una o varias sondas híbridas de polinucleótidos se hibriden con el al menos un ácido nucleico diana en la muestra, para formar un híbrido de ácido nucleico de cadena doble. La, al menos una, sonda híbrida de polinucleótidos puede ser ADN de longitud completa, truncado o sintético, o ARN de longitud completa, truncado o sintético. Si el al menos un ácido nucleico diana es ADN, entonces la, al menos una, sonda híbrida de polinucleótidos puede ser ARN y si el al menos un ácido nucleico diana es ARN, entonces la sonda puede ser ADN.

En un aspecto, una única sonda de polinucleótido se utiliza para purificar el ácido nucleico diana. La sonda de polinucleótido única puede ser específica de un solo ácido nucleico diana o se puede diseñar de manera que se hibride con una pluralidad de ácidos nucleicos diana en condiciones rigurosas. A modo de ejemplo y no de limitación, una sonda de polinucleótido se puede diseñar para una región altamente conservada de ácidos nucleicos que codifican un producto génico específico, de manera que se esperará que la sonda de polinucleótido se hibride en condiciones rigurosas con sustancialmente todos los ácidos nucleicos que codifican ese producto génico.

En otro aspecto, una pluralidad de sondas de polinucleótidos se utiliza para purificar el ácido nucleico diana. La pluralidad de sondas de polinucleótidos puede ser específica de un único ácido nucleico diana o puede ser específica de una pluralidad de ácidos nucleicos diana. A modo de ejemplo y no de limitación, se puede generar una pluralidad de sondas de polinucleótidos específica de un único ácido nucleico diana mediante la fragmentación del ácido nucleico diana. En un aspecto, se proporciona al menos una sonda híbrida de polinucleótido para cada ácido nucleico diana. En otro aspecto, se proporcionan al menos dos sondas híbridas de polinucleótidos para cada ácido nucleico diana.

En un aspecto, la sonda híbrida de polinucleótido es capaz de hibridarse o unirse a ácidos nucleicos que son al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 98%, al menos 99% o 100% idénticos a ácidos nucleicos asociados con HPV, variantes genéticas de HPV, ADN de HPV de un tipo de HR-HPV o ARN de HPV de un tipo de HR-HPV, o uno cualquiera de uno de los tipos de HR-HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82 o uno cualquiera de los tipos de LR-HPV 2, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 27, 28, 30, 32, 40, 42, 43, 53, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 74, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90 y 91. En otro aspecto, la sonda es complementaria a HPV, variantes genéticas de HPV, ADN de HPV de un tipo de HR-HPV, ARN de HPV de un tipo de HR-HPV, o uno cualquiera de uno de los tipos de HR-HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82 o uno cualquiera de los tipos de LR-HPV 2, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 27, 28, 30, 32, 40, 42, 43, 53, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 74, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90 y 91.

En otro aspecto, se proporciona una pluralidad de sondas híbridas de polinucleótidos, seleccionándose la pluralidad para que se hibride y purifique cada uno de un conjunto de ácidos nucleicos diana. En un aspecto, la pluralidad de sondas híbridas de polinucleótidos es capaz de hibridarse con cada ácido nucleico de un conjunto de ácidos nucleicos diana que consisten en los ácidos nucleicos de los tipos de HR-HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 82, o cualquier subconjunto del mismo. En un aspecto, la pluralidad de sondas híbridas de polinucleótidos

tidos es capaz de hibridarse con cada ácido nucleico de un conjunto de ácidos nucleicos diana que consisten en los tipos de LR-HPV 2, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 27, 28, 30, 32, 40, 42, 43, 53, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 74, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90 y 91, o cualquier subconjunto del mismo. En un aspecto, la pluralidad de sondas híbridas de polinucleótidos es capaz de hibridarse con cada ácido nucleico de un conjunto de ácidos nucleicos diana que consiste en los tipos de HR-HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82 o cualquier subconjunto del mismo; y los tipos de LR-HPV 2, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 27, 28, 30, 32, 40, 42, 43, 53, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 74, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90 y 91 o cualquier subconjunto del mismo.

Si el al menos un ácido nucleico diana se había desnaturalizado mediante un tratamiento alcalino, una o varias sondas de polinucleótidos se pueden diluir en un diluyente de sondas que también puede actuar como tampón neutralizante de la hibridación (para neutralizar el reactivo básico para la desnaturalización).

El diluyente de la sonda, utilizado para las sondas de ADN o ARN, diferirá debido a los diferentes requisitos necesarios para la estabilidad del ADN frente al ARN. Por ejemplo, si las sondas son de ARN, es preferible neutralizar primero la muestra y luego añadir la sonda o, alternativamente, añadir la sonda de ARN y el agente neutralizante (diluyente de la sonda) a la muestra al mismo tiempo, ya que una alcalinidad excesiva puede destruir el ARN. El diluyente de la sonda se puede utilizar para disolver y diluir la sonda y también para ayudar a restaurar la muestra a aproximadamente un pH neutro, por ejemplo, desde aproximadamente pH 6 a aproximadamente pH 9, para proporcionar un entorno más favorable para la hibridación. Un volumen suficiente de diluyente de la sonda, preferiblemente la mitad del volumen de la muestra, se puede utilizar para neutralizar la muestra tratada con una base.

Para las sondas de longitud completa, una solución alcalina calentada se puede añadir a la muestra, a continuación, se puede añadir el diluyente de la sonda a la muestra a temperatura ambiente y, a continuación, la muestra se puede recalentar. Un procedimiento de este tipo puede inhibir la formación de una estructura secundaria. Los anticuerpos tienden a unirse de forma irreversible a estructuras con estructura secundaria. Cuando se utilizan sondas de longitud no completa, tales como sondas truncadas o sintéticas, puede no ser necesario calentar las soluciones o la muestra, debido a que las cuestiones de estructuras secundarias no están presentes. En un aspecto, la muestra no se calienta cuando se emplea con sondas truncadas o sintéticas.

Después del tratamiento con el reactivo para la desnaturalización, se puede añadir a la muestra una parte alícuota de tampón de neutralización, en un aspecto el diluyente de la sonda descrito, en el que se disuelven una o varias sondas, en condiciones adecuadas para permitir que se produzca la hibridación o la unión de la sonda y el al menos un ácido nucleico diana. El tampón de neutralización puede contener una única sal de tamponamiento. En un aspecto, el tampón de neutralización no contiene más de una sola sal de tamponamiento. Las condiciones de la hibridación son suficientes para permitir que una o varias sondas de polinucleótidos se apareen con una secuencia de ácido nucleico complementaria correspondiente, si está presente, en la muestra para formar un híbrido de ácido nucleico de cadena doble.

Se emplean condiciones de hibridación adecuadas para las sondas y diluyentes particulares descritos en el presente documento. Por ejemplo, las sondas y los ácidos nucleicos de la muestra se pueden incubar durante un tiempo de hibridación, preferiblemente desde al menos aproximadamente 5 hasta aproximadamente 30 minutos, desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 20 minutos o desde aproximadamente 7 hasta aproximadamente 15 minutos, o aproximadamente 10 minutos, así como cualquier otro espacio de tiempo dentro de los intervalos citados, suficiente para permitir que una o varias sondas de polinucleótidos se apareen con una secuencia de ácido nucleico complementaria correspondiente. Las condiciones de hibridación pueden incluir una temperatura de hibridación de al menos aproximadamente 65°C, aproximadamente 68,5°C y de aproximadamente 67°C hasta aproximadamente 70°C, así como cualquier valor de temperatura dentro de los intervalos citados. Para al menos un ácido nucleico diana dado y una sonda dada, un experto ordinario en la técnica puede determinar fácilmente las condiciones de hibridación deseadas mediante experimentación de rutina. Un experto ordinario en la técnica apreciará además que el tiempo y la temperatura de la hibridación se deben optimizar, uno con respecto al otro. Por lo tanto, se pueden desarrollar temperaturas de hibridación más altas durante períodos de tiempo más cortos y viceversa. Sin limitaciones, unas condiciones de hibridación rigurosas se pueden controlar mediante el aumento de la temperatura, el aumento de las condiciones iónicas a superiores a 0,5 M (por ejemplo, NaCl), o la reducción de la concentración de PAA. A modo de ejemplo no limitante, unas condiciones de hibridación rigurosas pueden incluir la realización de una reacción de hibridación a temperaturas elevadas, tales como de al menos aproximadamente 65°C, al menos aproximadamente 68,5°C, entre aproximadamente 67°C y aproximadamente 70°C, y entre aproximadamente 69°C y aproximadamente 70°C. Unas condiciones de hibridación rigurosas pueden incluir también temperaturas elevadas, tales como de al menos aproximadamente 65°C, al menos aproximadamente 68,5°C y entre aproximadamente 67°C y aproximadamente 70°C. Una guía extensa para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Parte I, Capítulo 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, New York (1993); y *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 2, Ausubel, et al., compiladores, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1995).

Para los fines actuales, unas "condiciones rigurosas" incluyen condiciones con las que solo se producirá la hibridación si existe una falta de apareamiento del 25% o menos entre la molécula de la hibridación y la secuencia diana. Las "condiciones rigurosas" se pueden dividir en determinados niveles de rigor para una definición más precisa. Por

lo tanto, tal como se usa en el presente documento, unas condiciones "moderadamente rigurosas" son aquellas en las que moléculas con más de un 25% de falta de apareamiento de la secuencia, no se hibridan; unas condiciones "medianamente rigurosas" son aquellas en las que moléculas con más de un 15% de falta de apareamiento no se hibridan y unas condiciones "muy rigurosas" son aquellas en las que las secuencias con más de un 10% de falta de apareamiento, no se hibridan. Unas condiciones "altamente rigurosas" son aquellas en las que las secuencias con más de un 6% de falta de apareamiento, no se hibridan. Los cálculos relativos a las condiciones de hibridación requeridas para conseguir determinados grados de rigor, también están descritos por Sambrook et al. (compilador), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, capítulos 9 y 11.

En un aspecto, la etapa de hibridación/captura se completa a 50°C en aproximadamente 15 - 25 minutos, a 50°C en aproximadamente 20 - 25 minutos; o a 50°C en aproximadamente 22,5 minutos.

En un aspecto, la muestra se suspende en un medio de recogida, el al menos un ácido nucleico diana se desnatura con un reactivo para la desnaturalización y se hibrida con sondas de ácido nucleico suspendidas en un tampón de neutralización. En otro aspecto, el tampón de neutralización es el diluyente de la sonda. En otro aspecto, el diluyente de la sonda comprende BES 2,2 M (ácido (N,N-bis(2-hidroxiethyl)-2-aminoetanosulfónico)), 2,6% de poli(ácido acrílico), NaOH 0,7 M y 0,05% de azida sódica.

B. Formación de complejos y captura del híbrido de ácido nucleico de cadena doble

Después, de permitir que las sondas se hibriden con al menos un ácido nucleico diana y formen un híbrido de ácido nucleico de cadena doble, el híbrido es capturado por una molécula que es específica del híbrido de ácido nucleico de cadena doble. Las moléculas específicas de los híbridos de ácido nucleico de cadena doble incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, proteínas tales como, pero no limitadas a ARNasa H, ácidos nucleicos que incluyen pero no se limitan a aptámeros, o ácidos nucleicos de secuencia específica. Los aptámeros son segmentos cortos de secuencias al azar que se seleccionan sucesivamente a partir de un banco de secuencias, mediante la hibridación con una diana, amplificación de los aptámeros hibridados y repetición del proceso de selección.

En un aspecto, la molécula específica del híbrido de ácido nucleico de cadena doble es capturada por un anticuerpo conocido, como un anticuerpo anti-híbrido. En otro aspecto, los anticuerpos anti-híbridos se inmovilizan sobre un soporte antes de capturar el híbrido de ácido nucleico de cadena doble. Los métodos para inmovilizar anticuerpos sobre soportes sólidos son bien conocidos en la técnica. A modo de ejemplo y no de limitación, los anticuerpos se pueden unir covalentemente al soporte sólido. A modo de otro ejemplo, el anticuerpo se puede adsorber sobre la adsorción, por ejemplo, interacciones proteína-proteína, perlas de proteína-G, interacción entre biotina-estreptavidina, EDAC para unirse con un grupo carboxilo o tosilo, etc., o una hibridación directa sobre el soporte sólido usando, por ejemplo, ácidos nucleicos específicos de una secuencia en una columna de afinidad.

En otro aspecto, los anticuerpos anti-híbridos pueden formar complejos con el híbrido de ácido nucleico de cadena doble antes de ser inmovilizados sobre el soporte sólido. A modo de ejemplo y no de limitación, el anticuerpo anti-híbrido se puede conjugar con un marcador de biotina, mientras que el soporte se puede conjugar con un resto de estreptavidina. Los complejos de híbrido de ácido nucleico de cadena doble/anticuerpo anti-híbrido se pueden permitir, a continuación, en ausencia del soporte sólido. Cuando se añade el soporte sólido a la mezcla de reacción, los complejos de híbrido de ácido nucleico de cadena doble/anticuerpo anti-híbrido se pueden inmovilizar sobre el soporte sólido gracias a la interacción entre el conjugado de biotina y el resto de estreptavidina.

Los soportes incluyen, pero no se limitan a perlas; perlas magnéticas que incluyen perlas paramagnéticas, diamagnéticas, ferromagnéticas, ferromagnéticas y diamagnéticas, columnas, placas, papel de filtro, polidimetilsiloxano (PDMS); tiras reactivas; tubos revestidos, placas y placas de cultivo; y columnas de resina. Se puede emplear cualquier soporte siempre que permita una extracción de la fase líquida y proporcione la capacidad de separar anticuerpos unidos y no unidos. Las perlas paramagnéticas son particularmente útiles porque se pueden dejar en la solución y la fase líquida se puede extraer o decantar, si se aplica un campo magnético para inmovilizar las perlas. Las perlas que son pequeñas y tienen un área superficial alta son preferibles, tales como perlas con un diámetro de aproximadamente 1 µm. Otras perlas que emplean conmutación de carga o captura en sílice (en contraposición a los campos magnéticos) se pueden usar también.

Los híbridos se incuban con el anticuerpo anti-híbrido fijado al soporte durante un tiempo suficiente para permitir la captura de los híbridos de ácido nucleico de cadena doble a través de los anticuerpos anti-híbridos inmovilizados. En un aspecto, el soporte es una perla.

El anticuerpo anti-híbrido puede ser monoclonal o policlonal. En un aspecto, el anticuerpo es monoclonal. En un aspecto, el anticuerpo se acopla al soporte a través de un enlazador de clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDAC). En un aspecto, el soporte es una perla de poliestireno. En un aspecto, el soporte o la perla acoplada con el anticuerpo se diluye en un tampón de dilución de perlas. El tampón de dilución de perlas es útil para minimizar la desnaturalización de proteínas sobre la perla. Un ejemplo de un tampón de dilución de perlas comprende 6% de caseína, Tris-HCl 100 mM, NaCl 300 mM y 0,05% de azida de sodio.

En un aspecto, las perlas recubiertas con el anticuerpo anti-híbrido se incuban con la muestra desde aproximadamente 67°C a aproximadamente 70°C durante aproximadamente 30 minutos. En otro aspecto, las perlas y la muestra se incuban desde aproximadamente 68°C a aproximadamente 69°C durante aproximadamente 30 minutos. En otro aspecto adicional, las perlas y la muestra se incuban a aproximadamente 68,5°C durante 30 minutos. El tiempo de incubación puede variar desde aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 60 minutos, desde aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 45 minutos, desde aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 40 minutos, o cualquier duración dentro de los intervalos citados y generalmente es inversamente proporcional a la temperatura. Los expertos en la técnica entenderán que el tiempo de incubación, la temperatura y/o las condiciones de agitación se pueden variar para conseguir cinéticas de captura alternativas, tal y como se desee.

Después de la captura de al menos un híbrido de ácido nucleico diana/sonda como se ha descrito anteriormente, el híbrido capturado se puede separar del resto de la muestra mediante eliminación por lavado de los ácidos nucleicos no capturados.

III. Amplificación

Una vez que se ha purificado el al menos un ácido nucleico diana, se amplifica. La amplificación se lleva a cabo en ese momento para aumentar la sensibilidad del método mediante el aumento de la cantidad del al menos un ácido nucleico diana.

Las amplificaciones de ácidos nucleicos se pueden dividir a groso modo en dos categorías: amplificaciones con ciclos de temperatura y amplificaciones isotérmicas.

En las amplificaciones con ciclos de temperatura, la temperatura normalmente se eleva por encima del punto de fusión del ácido nucleico diana, para "fundir" cualquier porción de cadena doble y luego se baja hasta un punto en el que los cebadores de oligonucleótidos se aparean con una porción de cadena sencilla del ácido nucleico diana, después se eleva de nuevo hasta una temperatura en la que los cebadores permanecen apareados y la polimerasa es activa.

En las amplificaciones isotérmicas, se añade un agente a la mezcla de reacción para permitir una amplificación sin ciclos de temperatura. Por ejemplo, en la amplificación dependiente de helicasa ("HDA"), se añade una enzima que tiene actividad helicasa a la mezcla de amplificación. Tal y como se emplea en este documento, "helicasa" o "una enzima con, o que tiene, actividad helicasa" se refiere a cualquier enzima capaz de desenrollar un ácido nucleico de cadena doble. La helicasa actúa desenrollando los ácidos nucleicos de cadena doble, obviando de este modo la necesidad de ciclos de fusión repetidos. Helicasas a modo de ejemplo incluyen la helicasa de *E. coli* I, II, III y IV, Rep, DnaB, PriA, PcrA, helicasa T4 Gp41, helicasa T4 Dda, helicasas T7 Gp4, antígeno T grande de SV40, RAD de levadura. Helicasas adicionales que pueden ser útiles incluyen la helicasa RecQ, helicasas UvrD termoestables de *T. tengcongensis* y *T. thermophilus*, helicasa termoestable DnaB de *T. aquaticus* y helicasa MCM procedente de organismos de tipo arquea y eucariotas. Como otro ejemplo, en la amplificación iniciada por una mella ("NIA", del inglés "nick-initiated amplification"), un agente inductor de mellas se utiliza para inducir roturas en los enlaces fosfodiéster de la cadena principal del ácido nucleico. Una polimerasa que tiene actividad de desplazamiento de cadena puede iniciar a continuación la amplificación en el sitio de la mella, usando una cadena del ácido nucleico como cebador y la otra cadena como molde. En la presente memoria, "agente que induce una mella" se refiere a cualquier reactivo enzimático o químico o tratamiento físico que introduce roturas en el enlace fosfodiéster entre dos nucleótidos adyacentes en una cadena de un ácido nucleico de cadena doble. Ejemplos de enzimas que inducen mellas incluyen Bpu10 I, BstNB I, Alw I, BbvC I, Bsm I, BsrD y endonucleasa I de *E. coli*.

La amplificación en los métodos descritos puede ser una amplificación con ciclos de temperatura o una amplificación isotérmica. Los métodos ejemplares de amplificación incluyen, pero no se limitan a: reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"), reacción de transcriptasa inversa ("RT"), RT-PCR, HDA, RT-HDA, amplificación termófila dependiente de helicasa ("tHDA"), RT-tHDA, amplificación del genoma completo ("WGA"), RT-WGA, reacción en cadena de la ligasa ("LCR"), RT-LCR, NIA y RT-NIA.

Las reacciones de amplificación se pueden dividir adicionalmente en amplificaciones dependientes de la secuencia o independientes de la secuencia.

Una "amplificación dependiente de la secuencia" se refiere a una amplificación de una secuencia diana con respecto a secuencias no diana presentes en una muestra, con el uso de cebadores específicos de la diana. Tal y como se emplea en este documento, "cebador específico de la diana" se refiere a un ácido nucleico de cadena sencilla capaz de unirse a una región predeterminada de cadena sencilla en un ácido nucleico diana, para facilitar la replicación dependiente de polimerasa del ácido nucleico diana que se va a amplificar selectivamente.

En un aspecto, la amplificación es una amplificación específica de la secuencia. En otro aspecto, una pareja de cebadores específicos de la diana, en donde uno se hibrida con el lado 5' de una secuencia diana dentro de cada ácido nucleico diana y el otro se hibrida con el lado 3' de la secuencia diana, se utiliza para lograr una amplificación exponencial de la secuencia diana. Una disposición de este tipo es útil cuando todos los ácidos nucleicos diana comprenden una región variable que se busca para la genotipificación y cuando la región variable está flanqueada en ambos lados por regiones conservadas. En otro aspecto, se emplean múltiples parejas de cebadores específicos

de la diana en una única reacción para la amplificación simultánea de múltiples ácidos nucleicos diana.

En general, las parejas adecuadas de cebadores específicos de una diana, son oligonucleótidos cortos sintéticos, por ejemplo, que tienen una longitud de más de 10 nucleótidos y menos de 50 nucleótidos. El diseño de cebadores de oligonucleótidos específicos de una diana implica diversos parámetros, tales como puntuaciones de la alineación basadas en una cadena, temperatura de fusión, longitud del cebador y contenido en GC. Cuando se diseña un cebador específico de una diana, uno de los factores importantes es seleccionar una secuencia dentro del fragmento diana que sea específica de la molécula de ácido nucleico que se va a amplificar. Otro factor importante es calcular la temperatura de fusión de un cebador específico de una diana para la reacción. La temperatura de fusión de un cebador específico de una diana se determina por la longitud y el contenido en GC de ese oligonucleótido. Preferiblemente, la temperatura de fusión de un cebador es aproximadamente 10 a 30°C más elevada que la temperatura a la que se llevará a cabo la hibridación del cebador y la amplificación de la diana.

"Hibridación del cebador" se refiere a la unión de un cebador de oligonucleótido a una región del molde de ácido nucleico de cadena sencilla, en condiciones en las que el cebador se une específicamente solo con su secuencia complementaria en una de las cadenas del molde y no a otras regiones en el molde. La especificidad de la hibridación puede estar afectada por la longitud del cebador de oligonucleótido, la temperatura a la que se realiza la reacción de hibridación, la fuerza iónica y el pH de la mezcla de reacción.

Cada cebador específico de una diana se hibrida con cada extremo del ácido nucleico diana y se puede extender en dirección 3'→5' mediante una polimerasa, utilizando la secuencia del nucleótido diana como molde. Para lograr una amplificación específica, se prefiere un cebador específico de la diana homólogo o que se empareje perfectamente. Sin embargo, los cebadores específicos de una diana pueden incluir secuencias en el extremo 5' que no son complementarias con la o las secuencias de nucleótidos diana. Alternativamente, los cebadores específicos de una diana pueden contener nucleótidos o secuencias de principio a fin que no son exactamente complementarias al ácido nucleico diana.

Los cebadores específicos de una diana pueden incluir cualquiera de las bases de desoxirribonucleótidos A, T, G o C y/o una o varias bases de ribonucleótidos A, C, U, G y/o uno o varios nucleótidos modificados (desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos) en donde la modificación no impide la hibridación del cebador con el ácido nucleico o la elongación del cebador específico de la diana o la desnaturalización de las moléculas de cadena doble. Los cebadores específicos de una diana se pueden modificar con grupos químicos tales como fosforotioatos o metilfosfonatos o con enlazadores no nucleótidos para mejorar su rendimiento o para facilitar la caracterización de los productos de la amplificación.

En general, la temperatura de la desnaturalización adecuada para permitir una especificidad del reconocimiento del cebador-molde específico de una diana y un posterior apareamiento, puede estar en un intervalo de temperaturas, por ejemplo, de 20°C a 75°C. Una temperatura de desnaturalización preferida se puede seleccionar según qué helicasa se selecciona para el proceso de fusión. Las pruebas para determinar las temperaturas óptimas de la amplificación de un ácido nucleico en presencia de una helicasa seleccionada, se pueden determinar mediante experimentación de rutina, variando la temperatura de la mezcla de reacción y comparando los productos de la amplificación utilizando electroforesis en gel.

En un aspecto adicional, la amplificación es una amplificación independiente de la secuencia. Tal y como se emplea en la presente memoria, una "amplificación independiente de la secuencia" se refiere a cualquier amplificación que no amplifica una secuencia específica. A modo de ejemplo y no como una limitación, se pueden emplear mezclas de cebadores aleatorios o agentes inductores de mellas para iniciar una amplificación independiente de la secuencia.

Tal y como se emplea en la presente memoria, "mezcla de cebadores aleatorios" se refiere a mezclas de secuencias de oligonucleótidos cortas generadas al azar.

Tal y como se emplea en la presente memoria, una "actividad polimerasa iniciada por una mella" se refiere a una actividad polimerasa en ausencia de cebadores exógenos, que se inicia por rupturas en una cadena sencilla en el molde. La síntesis se inicia en la ruptura de la cadena sencilla en el ADN, en lugar de en el extremo terminal de un cebador sintético exógeno. Con una síntesis iniciada en una mella, la eliminación de los cebadores es innecesaria, reduciendo el coste, el tiempo de manejo y el potencial de pérdida o degradación del producto. Además, la síntesis iniciada en una mella reduce las señales de amplificación falsas causadas por una autoextensión de los cebadores. Las mellas se pueden introducir en lugares definidos, mediante el uso de enzimas que producen una mella en una secuencia de reconocimiento, o se pueden introducir al azar en un polinucleótido diana. Tal y como se emplea en la presente memoria, un "agente que induce una mella" se refiere a cualquier reactivo enzimático o químico o tratamiento físico que introduce rupturas en el enlace fosfodiéster entre dos nucleótidos adyacentes en una cadena de un ácido nucleico de cadena doble. Ejemplos de enzimas que inducen mellas incluyen Bpu10 I, BstNB I, Alw I, BbvC I, BbvC I, Bsm I, BsrD y endonucleasa de *E. coli*. En un aspecto, al menos una enzima inductora de mellas está incluida como un sustituto de una helicasa en una mezcla de reacción. En otro aspecto, al menos una enzima inductora de mellas se añade a una mezcla de reacción, además de al menos una helicasa.

En un aspecto, la amplificación es una amplificación isotérmica. En otro aspecto, la amplificación isotérmica es una

amplificación del genoma completo ("WGA", del inglés "whole genome amplification"). La WGA es un proceso isotérmico que utiliza cebadores no específicos para generar amplicones utilizando la secuencia de ácido nucleico diana como molde. Como se utilizan cebadores aleatorios múltiples, se puede amplificar sustancialmente toda la molécula que comprende el ácido nucleico diana, utilizando la WGA. Por ejemplo, la ADN polimerasa *Phi* 29 se puede utilizar en combinación con cebadores no específicos para amplificar las secuencias de ácido nucleico diana. La polimerasa se puede mover a lo largo de la secuencia de ácido nucleico diana, desplazando la cadena complementaria. La cadena desplazada se vuelve un molde para la replicación, lo que permite generar rendimientos elevados de ADN de peso molecular alto. En un aspecto, la reacción de WGA se modifica para incluir al menos una helicasa, al menos un agente inductor de mellas o ambos.

En un aspecto adicional, los amplicones generados por la etapa de amplificación se pueden fragmentar después de la amplificación.

IV. Genotipificación

A. Captura

Después de amplificar el al menos un ácido nucleico diana, se pone en contacto con al menos una sonda de polinucleótido, en condiciones suficientes para que una o varias sondas de captura de polinucleótidos se hibriden con el al menos un ácido nucleico diana. La al menos una sonda de captura de polinucleótido puede ser ADN de longitud completa, truncado o sintético, o ARN de longitud completa, truncado o sintético.

Cuando se desea genotipificar una pluralidad de ácidos nucleicos diana, se debe proporcionar por lo menos una sonda de captura de polinucleótidos específica para cada ácido nucleico diana. En un aspecto, una pluralidad de sondas de polinucleótidos se utiliza para purificar el ácido nucleico diana. La pluralidad de sondas de polinucleótidos puede consistir en solo una única sonda de ácido nucleico específica para cada ácido nucleico diana o puede consistir en una pluralidad de sondas de ácido nucleico específica para cada ácido nucleico diana. En un aspecto, se pueden proporcionar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sondas de captura de polinucleótidos específicas para cada ácido nucleico diana aislado. En otro aspecto, cada sonda de captura de polinucleótidos se selecciona de modo que es específica solo de un ácido nucleico diana y no reacciona de forma cruzada con cualquier otro ácido nucleico diana en condiciones rigurosas. En aún otro aspecto, se proporcionan al menos dos sondas de captura de polinucleótidos para cada ácido nucleico diana, en donde cada sonda de captura de polinucleótidos se hibrida con una región distinta del ácido nucleico diana. El conjunto de sondas de la presente invención se define en las reivindicaciones. También se describe que, cuando los ácidos nucleicos diana comprenden ácidos nucleicos de HPV, se puede seleccionar al menos una sonda de captura de polinucleótidos para hibridar con cada una de las regiones E6/E7 y L1 de cada ácido nucleico de HPV que se va a someter a ensayo.

Las sondas de captura de polinucleótidos se pueden adaptar para estar inmovilizadas sobre un segundo soporte sólido. En un aspecto, las sondas de captura de polinucleótidos se inmovilizan sobre el segundo soporte sólido antes de que se hibriden con el al menos un ácido nucleico diana. Los soportes incluyen, pero no se limitan a, perlas; perlas magnéticas, incluyendo perlas paramagnéticas, diamagnéticas, ferromagnéticas, ferromagnéticas y diamagnéticas; columnas; placas; papel de filtro; polidimetilsiloxano (PDMS); tiras reactivas; tubos; placas de cultivo; chips de mica.

En un aspecto adicional, el segundo soporte sólido comprende perlas. En un aspecto, se proporciona una pluralidad de perlas, en donde cada perla de la pluralidad inmoviliza solamente sondas de captura de polinucleótidos específicas de un solo ácido nucleico diana único, de tal manera que cada perla inmovilizará específicamente solamente un ácido nucleico diana único. En un aspecto adicional, cada perla de la pluralidad es portadora de un marcador detectable, en donde el marcador detectable se corresponde con el genotipo del ácido nucleico diana para el que es específica la perla.

En un aspecto, se proporcionan microesferas de poliestireno como el segundo soporte sólido. Las microesferas de poliestireno se pueden cargar con diversos colorantes, permitiendo que cada microesfera individual se marque de forma detectable. En un aspecto, se utilizan microesferas de poliestireno comercializadas bajo el nombre de marca Luminex[®]. Las microesferas Luminex[®] se tiñen internamente con diversas concentraciones de fluoróforos rojos e infrarrojos, de tal manera que se pueden generar 100 firmas espectrales diferentes. De esta manera, se pueden generar microesferas específicas para 100 ácidos nucleicos diana diferentes, mediante una inmovilización de sondas de captura de polinucleótidos específicas para un único ácido nucleico diana con un conjunto de perlas con un marcador de identificación individual.

En un aspecto, la sonda de captura de polinucleótidos es capaz de hibridarse o de unirse a ácidos nucleicos que son al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 98%, al menos 99% o 100% idénticos a los ácidos nucleicos asociados con HPV, variantes genéticas de HPV, ADN de HPV de un tipo de HR-HPV o ARN de HPV de un tipo de HR-HPV, o uno cualquiera de los tipos de HR-HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82; o uno cualquiera de los tipos de LR-HPV 2, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 27, 28, 30, 32, 40, 42, 43, 53, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 74, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90 y 91. En otro aspecto, la sonda de inmovilización es complementaria a HPV, variantes genéticas de HPV,

ADN de HPV de un tipo de HR-HPV, ARN de HPV de uno cualquiera de los tipos de HR-HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82 o uno cualquiera de los tipos de LR-HPV 2, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 27, 28, 30, 32, 40, 42, 43, 53, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72 El HPV, 74, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90 y 91.

5 En otro aspecto, se proporciona una pluralidad de sondas de captura de polinucleótidos, seleccionándose la pluralidad para que se hibride con cada uno de un conjunto de ácidos nucleicos diana. En un aspecto, la pluralidad de sondas de captura de polinucleótidos es capaz de hibridarse con cada ácido nucleico de un conjunto de ácidos nucleicos diana que consiste en ácidos nucleicos de los tipos de HR-HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82, o cualquier subconjunto del mismo. En un aspecto, la pluralidad de sondas de captura de polinucleótidos es capaz de hibridarse con cada ácido nucleico de un conjunto de ácidos nucleicos diana que consiste en los tipos de LR-HPV 2, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 27, 28, 30, 32, 40, 42, 43, 53, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 74, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90 y 91, o cualquier subconjunto del mismo. En un aspecto, la pluralidad de sondas de captura de polinucleótidos es capaz de hibridarse con cada ácido nucleico de un conjunto de ácidos nucleicos diana que consiste en los tipos de HR-HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82, o cualquier subconjunto del mismo; y los tipos de LR-HPV 2, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 27, 28, 30, 32, 40, 42, 43, 53, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 74, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90 y 91, o cualquier subconjunto del mismo. En un aspecto adicional, se proporciona una pluralidad de soportes sólidos secundarios, que consiste en soportes sólidos específicos para cada ácido nucleico de un conjunto de ácidos nucleicos diana que consiste en los tipos de HR-HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82, o cualquier subconjunto del mismo; y los tipos de LR-HPV 2, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 27, 28, 30, 32, 40, 42, 43, 53, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 74, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90 y 91, o cualquier subconjunto del mismo.

Se emplean condiciones de hibridación adecuadas para las sondas y diluyentes particulares, descritos en este documento. Por ejemplo, las sondas y los ácidos nucleicos de la muestra se pueden incubar durante un tiempo de hibridación, preferiblemente desde al menos aproximadamente 5 a aproximadamente 30 minutos, desde aproximadamente 5 a aproximadamente 20 minutos o desde aproximadamente 7 a aproximadamente 15 minutos, o aproximadamente 10 minutos, así como cualquier duración dentro de los intervalos citados, que sea suficiente para permitir que una o varias sondas de polinucleótidos se apareen con una secuencia de ácido nucleico complementaria correspondiente. Las condiciones de hibridación pueden incluir una temperatura de hibridación de al menos aproximadamente 65°C, aproximadamente 68,5°C y desde aproximadamente 67°C a aproximadamente 70°C, así como cualquier temperatura dentro de los intervalos citados. Para al menos un ácido nucleico diana dado y una sonda dada, un experto ordinario en la técnica puede determinar fácilmente las condiciones de hibridación deseadas mediante una experimentación de rutina. Un experto ordinario en la técnica apreciará además que el tiempo y la temperatura de hibridación deben ser optimizados, uno con respecto al otro. Por lo tanto, se pueden desarrollar temperaturas de hibridación más altas durante períodos de tiempo más cortos y viceversa. Sin limitaciones, unas condiciones de hibridación rigurosas se pueden controlar mediante el aumento de la temperatura, el aumento de las condiciones iónicas a superiores a 0,5 M (empleando, por ejemplo, NaCl) o reduciendo la concentración de PAA. A modo de ejemplo no limitante, unas condiciones de hibridación rigurosas pueden incluir la realización de una reacción de hibridación a temperaturas elevadas, tales como de al menos aproximadamente 65°C, al menos aproximadamente 68,5°C, entre aproximadamente 67°C y aproximadamente 70°C, y entre aproximadamente 69°C y aproximadamente 70°C.

40 B. Detección

En un aspecto, la sonda de inmovilización forma un híbrido de ADN:ARN con el amplicón cuando se hibrida con el mismo. En tal circunstancia, la detección puede realizarse usando y proporcionando un segundo anticuerpo que también es específico de híbridos de ADN:ARN de cadena doble. El segundo anticuerpo puede estar marcado de manera detectable, ya sea de forma directa o indirecta y puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal.

45 Como alternativa, el amplicón se puede hibridar adicionalmente con al menos una sonda de detección de polinucleótidos específica de al menos un ácido nucleico diana. La sonda de detección puede ser ADN, ARN, synARN o PNA y, opcionalmente, puede estar marcada de forma detectable. En un aspecto, el marcador detectable es biotina, que se puede detectar conjugando la biotina con una estreptavidina marcada con un fluoróforo, incluyendo ficoeritrina.

50 En un aspecto, cada sonda de detección es específica de un solo ácido nucleico diana y no reacciona de forma cruzada con otro ácido nucleico diana.

En otro aspecto, se utiliza una pluralidad de sondas de detección de polinucleótidos. La pluralidad de sondas de polinucleótidos puede consistir en una sola sonda de ácido nucleico única, específica de cada ácido nucleico diana o puede consistir en una pluralidad de sondas de ácido nucleico, específicas de cada ácido nucleico diana. En un aspecto, se pueden proporcionar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sondas de captura de polinucleótidos que son específicas de cada ácido nucleico diana único. En otro aspecto, cada sonda de captura de polinucleótidos se selecciona de modo que es específica solo de un ácido nucleico diana y no reacciona de forma cruzada con ningún ácido nucleico diana en condiciones rigurosas. En aún otro aspecto, se proporcionan al menos dos sondas de captura de polinucleótidos para cada ácido nucleico diana, en donde cada sonda de captura de polinucleótidos se hibrida con una región distinta del ácido nucleico diana. A modo de ejemplo, cuando los ácidos nucleicos diana comprenden ácidos nucleicos de HPV, se puede seleccionar al menos un polinucleótido para cada una de las regiones E6/E7 y L1 del

ácido nucleico de HPV.

En otro aspecto, se proporciona una única sonda de detección de polinucleótidos que es capaz de hibridarse con todos los ácidos nucleicos diana en condiciones rigurosas.

5 En un aspecto, la sonda de detección de polinucleótidos es capaz de hibridarse o unirse a ácidos nucleicos que son al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 98%, al menos 99% o 100% idénticos a los ácidos nucleicos asociados con HPV, variantes genéticas de HPV, ADN de HPV de un tipo de HR-HPV o ARN de HPV de un tipo de HR-HPV, entre los tipos de HR-HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 o 82, o los tipos de LR-HPV 2, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 27, 28, 30, 32, 40, 42, 43, 53, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 74, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90 o 91. En otro aspecto, 10 la sonda de detección es complementaria a HPV, variantes genéticas de HPV, ADN de HPV de un tipo de HR-HPV, ARN de HPV de un tipo de HR-HPV, o uno cualquiera de los tipos de HR-HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82; o uno cualquiera de los tipos de LR-HPV 2, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 27, 28, 30, 32, 40, 42, 43, 53, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 74, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90 y 91.

15 En otro aspecto, se proporciona una pluralidad de sondas de detección de polinucleótidos, seleccionándose la pluralidad para que se hibride con cada uno de un conjunto de ácidos nucleicos diana. En un aspecto, la pluralidad de sondas de detección de polinucleótidos es capaz de hibridarse con cada ácido nucleico de un conjunto de ácidos nucleicos diana que consiste en ácidos nucleicos de los tipos de HR-HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82, o cualquier subconjunto del mismo. En un aspecto, la pluralidad de sondas de detección de polinucleótidos es capaz de hibridarse con cada ácido nucleico de un conjunto de ácidos nucleicos diana que consiste en los tipos de LR-HPV 6, 11, 40, 43, 53, 61, 67, 69, 70, 71, 72, 81 y 83. En un aspecto, la pluralidad de sondas de detección de polinucleótidos es capaz de hibridarse con cada ácido nucleico de un conjunto de ácidos nucleicos diana que consiste en los tipos de HR-HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82, o cualquier subconjunto del mismo; y los tipos de LR-HPV 2, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 27, 28, 30, 32, 40, 42, 43, 53, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 74, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90 y 91, o cualquier subconjunto del mismo.

25 En otro aspecto, cada sonda de detección de polinucleótidos es portadora del mismo marcador detectable.

En otro aspecto, las sondas de detección de polinucleótidos se utilizan para generar híbridos de ácidos nucleicos de cadena doble, que luego se pueden detectar proporcionando un segundo anticuerpo que también es específico de los híbridos de ácidos nucleicos de cadena doble. El segundo anticuerpo puede estar marcado de manera detectable, ya sea de forma directa o indirecta y puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal. En un aspecto, el segundo anticuerpo es monoclonal. En otro aspecto, el segundo anticuerpo está marcado directamente con un marcador detectable y es monoclonal. El segundo anticuerpo se utiliza para detectar la presencia de híbridos de ácidos nucleicos de cadena doble. En un aspecto, el segundo anticuerpo tiene un marcador que debe reaccionar con un sustrato para proporcionar una señal que puede ser detectada. El segundo anticuerpo se puede disolver en un tampón adecuado. En un aspecto, el tampón comprende Tris HCl 100 mM, pH 7,4, NaCl 0,5 M, ZnCl₂ 0,1 mM, MgCl₂ 1,0 mM, 0,25% de Tween 20, 0,2 mg/ml de ARNasa A, 4% de hidroxipropil-b-ciclodextrina (ciclodextrina), 30% de tampón de dilución de perlas como se ha descrito anteriormente, 0,05% de IgG de cabra, 0,05% de azida de sodio.

Los expertos en la técnica entenderán que se puede utilizar cualquier marcador detectable, tal como pero no limitado a, una enzima, molécula radioactiva, molécula fluorescente o partícula de metal, tal como una partícula de oro. En ciertos aspectos, el marcador detectable puede ser fosfatasa alcalina. Se conocen métodos de conjugación de un marcador con un anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo se puede reducir con ditiotreitól (DTT) para producir fragmentos de anticuerpos monovalentes. El anticuerpo reducido, a continuación, se puede conjugar directamente con fosfatasa alcalina maleinada por los métodos de Ishikawa et al., J. Immunoassay 4:209-237 (1983) y Means et al., Chem. 1:2-12 (1990), y el conjugado resultante se puede purificar por HPLC. El conjugado también se puede purificar usando cualquier tipo de cromatografía de exclusión por tamaño. Uno de los beneficios de la purificación es que los conjugados de una proteína con un anticuerpo se pueden separar de los conjugados con otras relaciones de proteína a anticuerpo.

En otro aspecto, los híbridos de ácido nucleico de cadena doble se pueden detectar con un segundo anticuerpo anti-híbrido que no está marcado directamente. Por ejemplo, el segundo anticuerpo puede ser una inmunoglobulina de ratón que se detecta mediante un anticuerpo anti-ratón de cabra marcado.

50 El marcador presente sobre el soporte sólido marcado se puede utilizar para identificar el genotipo particular del ácido nucleico diana. El marcador de la sonda de detección o el anticuerpo de detección puede transmitir información acerca de la cantidad de cada ácido nucleico diana purificado y, además, puede transmitir información adicional sobre el genotipo de los ácidos nucleicos diana.

Los métodos para detectar diversos marcadores son conocidos en la técnica. Por ejemplo, métodos de colorimetría, radiactivos, de resonancia de plasmón superficial o de quimioluminiscencia se describen, por ejemplo, en Coutlee et al., J. Clin. Microbiol. 27:1002-1007 (1989). Por ejemplo, un conjugado de fosfatasa alcalina unido se puede detectar por quimioluminiscencia con un reactivo tal como un reactivo LUMI-PHOS 530 (Lumigen, Detroit, MI) o DR2 (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando un detector tal como un luminómetro E/LUMINA (Source Scientific Systems,

Inc., Garden Grove, CA), un luminómetro OPTOCOMP I (MGM Instruments, Hamden, CT) o similares, tal como un luminómetro de microplacas Veritas de Turner Biosystems. También se pueden emplear técnicas de detección múltiples en secuencia o en paralelo. Por ejemplo, el conjugado se puede detectar por quimioluminiscencia y fluorescencia. En otro aspecto, el conjugado se puede detectar por quimioluminiscencia.

- 5 Los detectores que utilizan diferentes técnicas de detección para el conjugado, se pueden fijar de forma reversible o irreversible, por ejemplo, de una manera modular, a un aparato que es capaz de realizar el método para determinar la presencia de al menos un ácido nucleico diana en una muestra.

10 Todas las sondas utilizadas en el presente documento (incluyendo sondas de híbrido, de captura y de detección) pueden ser sondas de ARN sintético corto que se unen específicamente solo a al menos un ácido nucleico diana. Ejemplos se describen en el documento de Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. n° US 2009-0298187 A1.

15 La presente descripción también proporciona composiciones de ensayo, sondas y condiciones en las que la reactividad cruzada entre los conjuntos de sondas de HR-HPV y los tipos de LR-HPV se reduce drásticamente, en comparación con el ensayo de HPV y el conjunto de sondas estándar aprobado por la FDA. En un aspecto, el conjunto de sondas de HPV de alto riesgo se selecciona a partir del grupo que consiste en los tipos de HPV de alto riesgo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82 o los tipos de LR-HPV 2, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 27, 28, 30, 32, 40, 42, 43, 53, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 74, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90 y 91. Usando el presente ensayo con estas sondas de HR-HPV, la reactividad cruzada entre los tipos de LR-HPV y las sondas de HR-HPV se reduce. Véase, por ejemplo, el documento de Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. n° 2009-0298187 A1.

20 La presente descripción también proporciona métodos y ensayos para la detección del cáncer, por ejemplo, cáncer de cuello uterino, detectando la presencia de al menos un ácido nucleico diana, tal como HPV, en una muestra.

25 Los expertos en la materia entenderán que la presente invención puede llevarse a cabo sobre varias plataformas incluyendo, pero no limitadas a, tubos, varillas, micromatrices, microplacas, placas de 384 pocillos, otras placas de microtitulación y sistemas de microfluidos. Los expertos en la materia entenderán que la presente, como es relevante para los países en desarrollo, puede utilizar métodos con bajo nivel tecnológico, tales como botellas cuentagotas, peras de succión de goma, pipetas Pasteur o botellas rociadoras, para etapas que implican un movimiento de líquido. Estos dispositivos proporcionan volúmenes relativamente precisos dentro de los intervalos aproximados que son necesarios para el ensayo. En un aspecto, los métodos de la descripción no incluyen pipetas automáticas u otros dispositivos para pipetear basados en baterías o energía.

30 En un aspecto, se pueden purificar y genotipificar 10 copias o menos del al menos un ácido nucleico diana a través de los métodos descritos en este documento, en un volumen de aproximadamente 1 ml - 20 ml de medio de recogida, en un periodo de tiempo de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 3 horas. En otros aspectos, 10 copias o menos, 25 copias o menos o 50 copias o menos de al menos un ácido nucleico diana se pueden detectar por los métodos descritos en este documento, en un volumen de aproximadamente 1 ml de medio de recogida en un periodo de tiempo de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 1 hora. En un aspecto, el al menos un ácido nucleico diana es al menos un ácido nucleico de HPV seleccionado a partir del grupo que consiste en los tipos de HPV de alto riesgo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82 y los tipos de LR-HPV 6, 11, 40, 43, 53, 61, 67, 69, 70, 71, 72, 81 y 83.

V. Kit

40 También se proporciona un kit para la detección de al menos un ácido nucleico diana en una muestra, en donde el kit comprende, consiste o consiste esencialmente en:

- i. un medio de recogida;
- ii. un reactivo para la desnaturalización;
- iii. al menos una sonda híbrida de polinucleótidos;
- iv. una perla recubierta con un primer anticuerpo anti-híbrido;
- 45 v. una polimerasa;
- vi. una helicasa;
- vii. una pluralidad de perlas recubiertas con sondas de inmovilización, en donde cada perla está recubierta con una sonda inmovilizada, específica de un ácido nucleico diana único y en donde cada perla está marcada de forma detectable;
- 50 viii. una sonda de detección, en donde la sonda de detección puede estar opcionalmente marcada, en donde el marcador opcional se selecciona a partir del grupo que consiste en: biotina, un marcador His, proteína G, un fluoróforo; y

ix. que comprende opcionalmente un reactivo de detección seleccionado a partir del grupo que consiste en: un compuesto que reacciona con un marcador detectable sobre la sonda de detección, incluyendo complejos de estreptavidina:HRP; un segundo anticuerpo anti-híbrido que es portador de un segundo marcador detectable; y

x. un tampón de lavado.

5 El medio de recogida, el reactivo para la desnaturalización, las perlas, los anticuerpos primero y segundo, las sondas de polinucleótidos, los reactivos de detección y los tampones de lavado se han descrito anteriormente.

En un aspecto, una pluralidad de sondas híbridas, una pluralidad de sondas de captura y una pluralidad de sondas de detección se proporcionan con el kit, en donde la pluralidad de cada sonda es específica de un conjunto de ácidos nucleicos diana que consiste en los tipos de HR-HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82, o cualquier subconjunto del mismo; y los tipos de LR-HPV 2, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 27, 28, 30, 32, 40, 42, 43, 53, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 74, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90 y 91, o cualquier subconjunto del mismo.

10 El kit también puede incluir instrucciones para describir procedimientos asociados con los métodos y ensayos descritos. El kit puede incluir también un medio para transcribir información del paciente. En un aspecto, el medio incluye papel, un ordenador o un dispositivo capaz de transmitir información del paciente. El kit puede incluir todos los componentes necesarios para completar los métodos en el mismo lugar en donde se toma la muestra del paciente.

15 En un aspecto, el kit puede incluir reactivos codificados por un color, asociados con el ensayo de detección. Los viales de reactivos están codificados por colores para facilitar su uso y se pueden incluir en un kit. Las botellas de reactivos también se pueden identificar por símbolos, letras u otros identificadores conocidos.

20 Ya que los componentes individuales del kit se reúnen en una plataforma de uso facilitado, una de las ventajas del kit descrito en el presente documento es que proporciona un análisis inmediato de las muestras. Esto permite una determinación rápida de los resultados del paciente.

En un aspecto, los métodos de la descripción pueden incluir la recogida, el procesamiento y la realización de la etapa de purificación de muestras de los pacientes de forma local. En un aspecto, después de recoger las muestras, algunas de las etapas del método se llevan a cabo en el mismo lugar en el que se recogen las muestras de los pacientes. El lugar puede ser un pueblo, una clínica, un laboratorio o un área comunal en donde las personas se someten a chequeos médicos y evaluaciones. El lugar puede ser permanente o temporal. En un aspecto, el ácido nucleico se detecta en un lugar, tal como un laboratorio o una clínica, que es diferente de donde se han tomado las muestras. En un aspecto, el kit está diseñado para uso en un país en desarrollo o en áreas geográficas en las que no es fácil tener un acceso a asistencia médica.

30 Este método es compatible además con muestras de STM y PC.

Los siguientes ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden limitar la descripción de ninguna manera.

Ejemplos

35 Entre las muchas secuencias posibles de ácido nucleico diana que se pueden purificar, detectar y/o caracterizar por el método descrito anteriormente, las secuencias de ácido nucleico de HPV proporcionan un excelente ejemplo ilustrativo.

Los miembros de la familia de HPV están asociados con una variedad de diferentes trastornos y/o infecciones, incluyendo verrugas comunes, verrugas genitales y cánceres de cabeza, cuello, garganta, pene, ano, cuello uterino, vulva y vagina. Se han descrito más de 100 tipos de virus HPV, 56 de los cuales hasta la fecha se han asociado con lesiones de la mucosa y/o cutáneas. Estos 56 tipos de HPV asociados con lesiones de la mucosa y/o cutáneas están separados normalmente en grupos de "alto riesgo" y de "bajo riesgo". HR-HPV son aquellos que están asociados con lesiones malignas y pueden incluir, por ejemplo, los tipos de HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82. LR-HPV están asociados con lesiones benignas y pueden incluir, por ejemplo, los tipos de HPV 2, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 27, 28, 30, 32, 40, 42, 43, 53, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 74, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90 y 91.

45 Sin embargo, antes del desarrollo del método descrito anteriormente, no había pruebas disponibles que fueran capaces de genotipificar todos los tipos conocidos de HR-HPV y LR-HPV. Otros métodos de diagnóstico molecular para la detección de HPV están limitados en su capacidad de multiplexado, disminuyendo la utilidad de estos métodos para la genotipificación. Métodos quimioluminiscentes, tales como Hybrid Capture 2, son sensibles y fiables, pero tienen un rendimiento homogéneo, lo que exige pocillos distintos para detectar cada genotipo. La PCR y pruebas similares a la PCR se basan en el uso de un cebador de consenso (por ejemplo GP5+/6+, MY09/MY11, etc.). Estas pruebas tienen de forma inherente unas eficacias diferentes para diferentes dianas, lo que produce un sesgo de la amplificación, por lo que la detección de una infección múltiple con HPV se vuelve difícil y poco fiable. Además, la diafonía entre los fluoróforos, la competencia durante la amplificación y los problemas crecientes con dímeros de cebadores, afectan negativamente y limitan el número de dianas que se pueden amplificar y detectar de forma simultánea. Además, otra limitación es el tamaño relativamente pequeño de la región del amplicón que se dirige, que a su

vez en los ensayos da como resultado que es sensible a deleciones, mutaciones o inserciones. Por ejemplo, si se elimina esta región diana durante la integración vírica en el genoma hospedador (como se ha observado con la región L1), se puede perder la infección. Adicionalmente, se pueden producir falsos negativos cuando hay mutaciones o deleciones en la región a la que se dirige la sonda de detección.

- 5 En los siguientes ejemplos, se utilizaron los métodos descritos anteriormente para purificar, detectar y caracterizar 26 tipos de HPV, incluyendo todos los HR-HPVs actualmente conocidos.

Ejemplo 1: Diseño del ensayo

Los siguientes ejemplos utilizan todos el mismo diseño general del ensayo. En primer lugar, los ácidos nucleicos de HPV se aíslan a partir de la muestra mediante el uso de captura de híbridos. Después, los ácidos nucleicos de HPV aislados se amplifican utilizando una amplificación del genoma completo. Los ácidos nucleicos de HPV amplificados se separan después, de acuerdo con el serotipo de HPV, usando sondas de captura específicas para cada serotipo individual de HPV inmovilizado sobre una perla marcada de forma exclusiva. Una sonda de detección biotinilada se hibrida después con los ácidos nucleicos de HPV separados y un conjugado de estreptavidina/ficoeritrina (SA-PE) se une a la sonda de detección para generar una señal. Tanto el marcador único de la perla como la señal generada por el SA-PE se miden usando citometría de flujo. El marcador de la perla se utiliza para indicar el genotipo unido a la perla, mientras que la señal de SA-PE se utiliza para indicar la presencia o ausencia de ácido nucleico de HPV unido a cada perla.

A. Preparación de la sonda de purificación.

Se diseñó un conjunto de sondas de purificación de modo que era capaz de aislar ácidos nucleicos de todos los serotipos de HPV existentes. Aunque en principio las sondas podían tener cualquier longitud, se seleccionaron sondas cortas de 25-meros para proporcionar flexibilidad al diseño de la sonda y una preparación sencilla.

El conjunto de sondas de purificación se preparó usando dos criterios básicos. En primer lugar, las sondas se seleccionaron de tal manera que se dispersaron por todo el genoma diana para capturar todas las regiones del genoma. En segundo lugar, se agruparon sondas múltiples en torno a regiones específicas para garantizar que se había purificado cada región que se estaba analizando.

Para reducir al mínimo el número total de sondas requeridas, las sondas se diseñaron de manera que se podía utilizar una única sonda como una sonda de consenso para dos o más tipos de HPV. Para descubrir las secuencias de consenso, se realizaron alineaciones de las secuencias de HPV que se estaban sometiendo a ensayo, por familias. Por ejemplo, todos los miembros de la familia A9 (HPV16), que comprende los HPVs 16, 31, 33, 35, 52, 58 y 67, o la familia A7 (HPV18), que comprende HPV18, HPV39, HPV45, HPV59, HPV68, HPV70 y HPV85, se alinearon mediante ClustalW y la secuencia de consenso se analizó en busca de presencia de una secuencia de 25-meros contigua. Tal secuencia se podía elegir entonces como una sonda candidata. Basándose en el árbol filogenético construido durante el análisis, las dos secuencias relacionadas más estrechamente se alineaban entre sí y se repitió la búsqueda de secuencias de consenso. Por lo tanto, se diseñaron las sondas enumeradas en la Tabla 1 (abajo).

35 Tabla 1: SECUENCIAS DE LAS SONDA DE PURIFICACIÓN PARA 27 TIPOS DE HPV

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
1	HPV16-E6E7-1	AACCGAAACCGGUUAGUAUAAAAGC
2	HPV16-E6E7-2	UUAGAAUGUGUGUACUGCAAGCAAC
3	HPV16-E6E7-3	GGUAUAUGACUUUGCUUUUCGGGAU
4	HPV16-E6E7-4	AGUAUAUAGAGAUGGGAAUCCAUAU
5	HPV16-E6E7-5	ACAACAAACCGUUGUGUGAUUUUGUU
6	HPV16-E6E7-6	UUAGGUGUAUUAACUGUCAAAGCC
7	HPV16-E6E7-7	GAUCCAUAUAUAAGGGGUCGGUG
8	HPV16-L1-1	AUGUUGCACGCACAAACAUUAUUA
9	HPV16-L1-2	GUUCCUAAAGUAUCAGGAUUACAAU
10	HPV16-L1-3	UCCCUAUUUUCCUAUUA AAAA ACCU
11	HPV16-L1-4	GUUUGGGCCUGUGUAGGUGUUGAGG
12	HPV16-L1-5	GUCAGCCAUUAGGUGUGGGCAUUAG
13	HPV16-L1-6	UGUGUUUAUUUGGUUGCAAACCACC
14	HPV16-L1-7	GGUGAUUGUCCACCAUUAAGAGUUA

ES 2 615 728 T3

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
15	HPV16-L1-8	CAGUUUUCAGGAUGGUGAUUUGGU
16	HPV16-A9-1	GAAAUCCUUUUUCUCAAGGACGUGG
17	HPV16-A9-2	CAAUGUGUAGACAUUUAUAAACGAGC
18	HPV16-A9-3	UUAGACAUUUUAAUUAAUAGGGCUGG
19	HPV16-A9-5	CAUAUGAUAAUCCUGCAUAUGAAGG
20	HPV16-A9-6	AAUAUGAUUUACAGUUUAAUUUUUCA
21	HPV16-A9-7	AUCCUUUAAUAAAUAUUUUGGAUGA
22	HPV16/35-A9-8	CUAUUAGUACACAUAUUUUGAAGA
23	HPV31/35-A9-1	GGUACAAUGGGCAUAUGACAAUGAU
24	HPV31/35-A9-2	GACAAACAGUAAUACAGCAUAGUUU
25	HPV31/35-A9-3	GAUGGUUAGAUUAGUGUGUAUGG
26	HPV31/35-A9-4	GAUUAAAUUUGCACGAGGAAAGAGG
27	HPV31-E6E7-1	ACGAUGAACUAAGAUUGAAUUGUGU
28	HPV31-E6E7-2	ACAGAGGUAAUAGAUUUUGCAUUUA
29	HPV31-E6E7-3	UUAAUUAGGUGUAUAACGUGUCAAA
30	HPV31-E6E7-4	AGAAGAAAAACAAAGACAUUUGGAU
31	HPV31-E6E7-5	AGGAAGGUGGACAGGACGUUGCAUA
32	HPV31-L1-1	GAACCAACAUUAAUUUACACGCAGG
33	HPV31-L1-2	AUCCAUAUUUUAUCCAUACCUAAAUC
34	HPV31-L1-3	UCAGGAUUACAUAUAGGGUAAUUUA
35	HPV31-L1-4	GACACUGAAAACUCUAAUAGAUUUG
36	HPV31-L1-5	AAUGUAUAUCAUUGGAUUUAAACA
37	HPV31-L1-6	CUAUUGGAGAGCAUUGGGGUAAAAGG
38	HPV31-L1-7	GGUGAUUGUCCUCAUUAGAAUUAA
39	HPV31-E6E7-6	UAGUAUAUAGGGACGACACACCACA
40	HPV31-E6E7-7	CUGAAACCCAAGUGUAAACAUGCGU
41	HPV35-E6E7-1	GCUAUGAUUUUGUAUAGUAUUAUAG
42	HPV35-E6E7-2	UCCAGUUGAAAAGCAAAGACAUUUUA
43	HPV35-E6E7-3	UUGUAAAUGUGAGGGCAGACUACGU
44	HPV35-E6E7-4	AAGAUUUUAAUUGGGCACAUUUGG
45	HPV35-L1-1	GCACAAACAUCUACUAUCAUGCAGG
46	HPV35-L1-2	CAAUACAGAGUAUUUAGAGUAAAAU
47	HPV35-L1-3	CUAAUAAGUUUGGAUUUCCAGACAC
48	HPV35-L1-4	UGGUUUUGGGCCUGUACAGGAGUUUGA
49	HPV35-L1-5	GUACAGAUAAACAGGGAAUGCAUUUC
50	HPV67-E6E7-1	UAACCGAAAACGGUUUGACCGAAAA
51	HPV67-E6E7-2	CGAAAAACCACGCAACCGCACGAA
52	HPV67-E6E7-3	CUUUGGAAACCACGGUGCAUGAAAU
53	HPV67-E6E7-4	CUUUGGACAGAAACGAGGUUAUUGA
54	HPV67-E6E7-5	UCUGUGAGUGCACUUUGCGUUUGUG

ES 2 615 728 T3

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
55	HPV67-E6E7-6	AAUCCAGCAGAUGCUIAUGAACACA
56	HPV67-L1-1	UAUUGAAAUAGGGCGAGGACAGCCU
57	HPV67-L1-2	CUGAUAAUAGGGAAUGCUUGUCUAU
58	HPV67-L1-3	UUUGGAACUUAUGAAUACUGUUUUU
59	HPV67-L1-4	GAGCAGGUAAAUUAGGGGAGGAUGU
60	HPV67-L1-5	GCAAACACUUCUGCACUGCAAACCU
61	HPV67-L1-6	GCUAAACCUAAAACUAAAACGUUCUU
62	HPV67-L1-7	CAAAACGUAAAAAGGUUAAAAGGUA
63	HPV52-E6E7-1	GUGUAGCUAACGCACGGCCAUGUUU
64	HPV52-E6E7-2	UGCACGAAUUGUGUGAGGUGCUGGA
65	HPV52-E6E7-3	UACAACGAAGAGAGGUUAUCAAGUU
66	HPV52-E6E7-4	ACGAAUAGUAUAUAGAGACAAUAU
67	HPV52-E6E7-5	GGCAUUUAUCAAUAUUCACUGUAUGG
68	HPV52-E6E7-6	CUAUGAGCAAUUAGGUGACAGCUCA
69	HPV52-E6E7-7	GCCAGAUGGACAAGCAGAACAAGCC
70	HPV52-L1-1	UAACAGUAGGACAUCCCUAUUUUUUC
71	HPV52-L1-2	AAAAAAGUUUUAGUUCCCAAGGUGU
72	HPV52-L1-3	UUUGAUGAUACUGAAACCAGUAACA
73	HPV52-L1-4	AGGGAAUGUUUAUCUAUGGAUUUAU
74	HPV52-L1-5	UGCAAACCUCCUAUAGGUGAACAUU
75	HPV52-L1-6	AGGAUGGGGACAUGGUAGAUACAGG
76	HPV33/58-A9-1	UAGAAGACAGCGGAUAUGGCAAUAC
77	HPV33/58-A9-2	GCUGUACAGAUUGGUGUAUAACAGG
78	HPV33/58-A9-3	AUUGGUUUAGAACAGCAAUGUCAAA
79	HPV33/58-A9-4	UCAUAUUUUGGAAUGAGUUUAUAC
80	HPV33/58-A9-5	UUUUGGUUGCAGCCAUAUACAGAUG
81	HPV33/58-A9-6	AAUAGAGGAAGAGGACAAGGAAAAC
82	HPV33/58-A9-7	AUGGAGGAAUAUCAGCACGUUUAA
83	HPV33/58-A9-8	CAUCACAAAUUGAACAUUGGAAACU
84	HPV33/58-A9-9	GGACAUUGCAACAAACAAGCUUAGA
85	HPV33/58-A9-10	AUUUUAAAUAUUUUAAAAGAGGAUGC
86	HPV33/58-A9-11	AAUAUCCACUACUGAAACUGCUGAC
87	HPV33/58-A9-12	CAAAUAGUUUAAAUGUUUAAGUAU
88	HPV33/58-A9-13	UGAUGUGUAUUAAUUUUCAUUGCACA
89	HPV33/58-A9-14	UCUACAAGGCGCAAGCGUGCAUCUG
90	HPV33/58-A9-15	GAAAACAUACCAAUGGAUACCUUUG
91	HPV33/58-A9-16	GCCCUGUGGCACGCCUUGGUUUUAU
92	HPV33/58-A9-17	CAGAUGUCCGUGUGGCGGCCUAGUG
93	HPV33/58-A9-18	ACAUUGCAGGCUAAUAAAAGUGAUG
94	HPV33/58-A9-19	CAGUACAUGCAAAUAUCCAGAUUAU

ES 2 615 728 T3

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
95	HPV52/67-A9-1	GAGAAAUGGUGCAAUGGGCAUAUGA
96	HPV52/67-A9-2	UUUUUAAAAGGUUACCUAAAAAAAA
97	HPV52/67-A9-3	UACAGUGCAAUACGAUAAUGAUAA
98	HPV52/67-A9-4	CAGAUGUCCGUGUGGCGCCUAGUG
99	HPV52/67-A9-5	AGGCCACUGUGUACCUGCCUCCUGU
100	HPV52/67-A9-6	UUAGAGGACUGGCAUUUGGCCUUA
101	HPV52/67-A9-7	CAUGUUUUAAACUGCUUUUAGGCAC
102	HPV18/45-A7-1	AUGCUGCAUGCCAUAUUUAGUUAAGA
103	HPV18/45-A7-2	UUAAAACGAAAGUUUGCAGGAGGCA
104	HPV18/45-A7-3	UCAGAUAGUGGCUAUGGCUGUUCUG
105	HPV18/45-A7-4	UUAGAAUUUUAAAAGUGAUAAAAC
106	HPV18/45-A7-5	UGUAAAUGGGGAGUAUUAAUUAUAG
107	HPV18/45-A7-6	CACCAAAUUGCGAAGUAGUGUUGC
108	HPV18/45-A7-7	AUGCAUUCCAUUUGAUAAAAAUGG
109	HPV18/45-A7-8	GAAAGGACAUGGUCCAGAUUAGAUU
110	HPV18/45-A7-9	UUGAUUGUAAUGACUCUAUGUGCAG
111	HPV18/45-A7-10	UACCAGUGACGACACGGUAUCCGCU
112	HPV18/45-A7-11	GUGGUAACACUACGCCUAUAAUACA
113	HPV18/45-A7-12	GUAUUAAAACUGCUUUUAGGCACAU
114	HPV18-E6E7-1	AGGAUCCAACACGGCGACCCUACAA
115	HPV18-E6E7-2	CUUCACUGCAAGACAUAGAAUAAC
116	HPV18-E6E7-3	AGGUUUUGAAUUUGCAUUUAAAGA
117	HPV18-E6E7-4	GAGGCCAGUGCCAUUCGUGCUGCAA
118	HPV18-L1-1	UGGUAAUCCAUAUUUUAGGGUUCU
119	HPV18-L1-2	UCCUAAGGUUUCUGCAUACCAUA
120	HPV18-L1-3	AUCCUGAAACACAACGUUUAGUGUG
121	HPV18-L1-4	AGGACGUUAGGGACAAUGUGUCUGU
122	HPV45-E6E7-1	UGACGAUCCAAGCAACGACCCUAC
123	HPV45-E6E7-2	UAGACACCUUAAGGACAAACGAAGA
124	HPV45-E6E7-3	GUGUGACGGCAGAAUUGAGCUUACA
125	HPV45-E6E7-4	UACAGCAGCUGUUUUUGAGCACCUU
126	HPV45-L1-1	UGUAGGCAAUCCAUAUUUUAGGGUU
127	HPV45-L1-2	UCCUAAGGUUUCGCAUAUCAGUA
128	HPV45-L1-3	AUAAUCCUGAAACACAACGUUUGGU
129	HPV45-L1-4	AGGAUGUUAGGGAUAAUGUGUCAGU
130	HPV39/68-A7-1	CCAUACAAAUUGCCAGACCUUGUCA
131	HPV39/68-A7-2	UCGGUGUAUGCAACUACAUUAGAAA
132	HPV39/68-A7-3	UACAAUGAAAUACAGCCGGUUGACC
133	HPV39/68-A7-4	UUGUAUGUCACGAGCAAUUAGGAGA
134	HPV39/68-A7-5	GAUGAAAUAGAUGAACCCGACCAUG

ES 2 615 728 T3

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
135	HPV39/68-A7-6	AGCGUGAGACAGCACAGGUACUUUU
136	HPV39/68-A7-7	AGUGCJAUAGAUAGUGAAAACCAGG
137	HPV39/68-A7-8	GUAAAAGAUUGUGCAACAAUGUGUA
138	HPV39/68-A7-9	AAUUUCCJAAUGCAUUUCCAUUUG
139	HPV39/68-A7-10	GAAAAGACUJGGUGCAGAUUAGACU
140	HPV39/68-A7-11	GACGAGGAUGAAGGAGACAAUGAUG
141	HPV39/68-A7-12	AAGCAUAUCAAGCUAUUGAACUGCA
142	HPV39/68-A7-13	CAUUGUCCUGACUCUAUGUGCAGUA
143	HPV39/68-A7-14	ACACCAGUACCAACAUUUACAGGCA
144	HPV39/68-A7-15	CAGGUJCGUGUUAGUAAUUUUGAUU
145	HPV39/68-A7-16	CACCCUJCAUCAUUUGUAACAUUUG
146	HPV39/68-A7-17	AUAAUCCUGCUUUUGAGCCUGUUGA
147	HPV39/68-A7-18	GAUCCGGAUUUUCUGGACAUUGUUC
148	HPV39/68-A7-19	UGCAAUGUCUGCAGAUGUGUAUGG
149	HPV39/68-A7-20	CUAAACACAAACGUAAACGUGUGUC
150	HPV59/70-A7-1	GCAACAGAUACAGGUUCAGACUJGG
151	HPV59/70-A7-2	AUUUGUGUACAGGCAGAGCGCGAGA
152	HPV59/70-A7-3	UUAGUCAUCAUCCUGUCCAGGUGCA
153	HPV70-E6E7-1	UAUAAAACCAUGCAAAGUUGCUUG
154	HPV70-E6E7-2	CCUGCAGAACGGCCAUACAAAUJGC
155	HPV70-E6E7-3	UGCAUGCCAAAAAUGUAUUAAAUUU
156	HPV70-E6E7-4	GACGUAUACGAAGAGAAACACAAGU
157	HPV70-E6E7-5	ACAUUGCAAGAGAUUGUUUJAGAUU
158	HPV70-E6E7-6	CUACACUGCACUUAGUAGUAGAAGC
159	HPV70-E6E7-7	GCAGCUGUUUAUGGAGACACUGUCA
160	HPV70-L1-1	GGJUAUCCCUACCUGAUCCUAAUAA
161	HPV70-L1-2	UAUAAUCCUGACACACAACGCCJGG
162	HPV70-L1-3	CUUCAGAGUUUAUUAUUAAAAGGCAC
163	HPV70-L1-4	AUGUAUAUJCCCCUJCCCAAGJGG
164	HPV70-L1-5	CACGUAGUACUAAUUUUACAUJGUC
165	HPV70-L1-6	CUGUAUAUAGCCCUACAAAGUUUAA
166	HPV70-L1-7	UCUAAACACAAACGGAAACGUGUGU
167	HPV59-E6E7-1	UUAUAGUGUAUAGAGACUGUACACC
168	HPV59-E6E7-2	UUUUAUJGCAAGAGUAAGAGAAUUAA
169	HPV59-E6E7-3	UAUUUAUAGAGAUJCCGUGUAJGGAG
170	HPV59-E6E7-4	UGCCUAAAACCUCUAUGUCCAACAG
171	HPV59-E6E7-5	ACCACAAAAUUAUGAGGAAGUJGAC
172	HPV59-E6E7-6	CUCCGAGAAUGAAAAAGAUGAACCA
173	HPV59-L1-1	UGGACAUCCAUAUUUUAAAAGUACCU
174	HPV59-L1-2	UJCCUAAGGUGUCUGCAUAUCAUA

ES 2 615 728 T3

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
175	HPV59-L1-3	UGGAUGACACUGAAAACUCUCAUGU
176	HPV59-L1-4	GAUAAUGUAUCUGUGGAUUUAUAAAC
177	HPV59-L1-5	UGAAUCACUAUAUAUUAAAGGUACU
178	HPV59-L1-6	UAUUCCCCUUCCCCAAGUGGGUCUG
179	HPV59-L1-7	GUGCAGCGCCUGCCCCUACCUCUAC
180	HPV59-L1-8	UCUCCAGAAAAUAGUGUUGUUUGU
181	HPV59-na-1	UGUAUUGUUUGCCUGUUUGUAUGUU
182	HPV59-na-2	CCGUUUUGUUCAAUCUGCUGCUGUA
183	HPV59-na-3	AAGACAGCAACGACAAGCGCGUAGU
184	HPV54-E6E7-1	AAGCGGAUGUAGAAAACAGUUUUUU
185	HPV54-E6E7-2	ACGGACCAGCCGCGUACUCUAGCUG
186	HPV54-E6E7-3	UAUGCAUAGUUUGCAACUCCUUGU
187	HPV54-E6E7-4	GCAGAGAUUUUAGCAUUUCAUAUA
188	HPV54-E6E7-5	GUGGAGACACGGCUUCCACAUGCU
189	HPV54-E6E7-6	AAAUAAAUAUAGAAGGCAUCGCGA
190	HPV54-na-1	UGCAUGGAAAUGUGGCUACA AUUGA
191	HPV54-E6E7-7	GUGGAGGUGUGUGUUGUAAGACAGU
192	HPV54-E6E7-8	CAUAAGGGUACUGCAGGAACUGCUU
193	HPV54-na-2	AAACGAAAGUAUAUAGGCAGUCCGU
194	HPV54-na-3	GAGUUUUAUGGACCUAGCACGGUCC
195	HPV54-L1-1	UUUUUGGUGUUGGACAUCCAUAUU
196	HPV54-L1-2	UAUCCUAAAAGUAUCAGGAUAUCAA
197	HPV54-L1-3	CUAUAGGUGAACACUGGGCUAAAGG
198	HPV54-L1-4	GCUGGUGACUGUCCUCCUUUGGAU
199	HPV54-L1-5	GGAUUUUAAAACCCUACAAACCUCA
200	HPV54-L1-6	AUUUGUAAAUAUCCUGAUUACCUUA
201	HPV54-L1-7	GUAGUACUAACCUAACAUUGUGUGC
202	HPV54-L1-8	UUCUGACUUUAGGGAGUAUAUUAGA
203	HPV54-na-4	UAUGCUGCAACUCCUAGUGGCUCUA
204	HPV70/85-A7-1	UAGAUGACAGUGUAUUUGACCUGUC
205	HPV70/85-A7-2	UAUGGGGACAGUAUGUUUUUUUGUU
206	HPV70/85-A7-3	GAGGAAUAUGAUUUACAAUUUAUAU
207	HPV85-E6E7-1	CUACCCGACCCUACAAACUACCAGA
208	HPV85-E6E7-2	AAGAUUAAGAAUAAGCUGUGUAUA
209	HPV85-E6E7-3	AUAGCGACUCUGUGUAUGGGGAAAC
210	HPV85-E6E7-4	AUGAUUAUUAAUAAGGUGUUUACG
211	HPV85-E6E7-5	AUAUAAUGAAGUGCAAGAGGUUGAC
212	HPV85-E6E7-6	AGGAAGAAUAGAUGAACAGAUAA
213	HPV85-L1-1	AUGACACAGAAAAUCCCAUGUUGC
214	HPV85-L1-2	GAUAAUGUGUCAGUGGAUUUAUAAAC

ES 2 615 728 T3

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
215	HPV85-L1-3	GGGAACAUUGGGCUAAGGGUACUGC
216	HPV85-L1-4	UGUCCUCCAUUAGAACUAGUAAAUA
217	HPV85-L1-5	GAAACUUUAUUAUAAAAGGUACUAA
218	HPV85-L1-6	UAUUCUCCAUCCACCUAGUGGGUCUA
219	HPV85-L1-7	CAUCUGCCAUUACAUGUCAGAAGGA
220	HPV85-L1-8	UAUGAAAAAUUAAAGUUUUGGAAUG
221	HPV85-na-1	GUUUUUACUUGCUIUAAUUACACUA
222	HPV85-na-2	ACAAGAAUAUCGUUAAAUAGCUAU
223	HPV85-na-3	CAAGGGAGCAUGGUCUAAAACAAU
224	HPV26/69-E6E7-1	GCAGGUACAGUGUGUAUUAUUGCAAG
225	HPV26/69-E6E7-2	GUGCCGCAACCCGAAAUUGACCUAC
226	HPV26/69-E6E7-3	GGACUAUGAACAAUUUGACAGCUCA
227	HPV26/69-E6E7-4	GUAAUAGUAUAGUGCAGCUAGCUGU
228	HPV26/69-E6E7-5	GUACAGGGUGUUUUCAGUAGAAGC
229	HPV26/69-E6E7-6	AGAACAGCCCGUUGCAAGACAUAAC
230	HPV26/69-E6E7-7	AUACUGAAGUGGAAACUCUJACGCC
231	HPV26/69-E6E7-8	AGUGUGUGUAGUCAGGGGGGGUCA
232	HPV26/69-na-1	UGUGGCAGGCUCUGUAGCAGAAAGU
233	HPV26/69-na-2	AUUUAUCAAAAAUGGUGCAAUGGGC
234	HPV26/69-na-3	GGCAAAUAUGUAAAAGACUGUGCA
235	HPV26/69-na-4	GACAGCAAUGGGAAUCCUGUAUAUG
236	HPV26/69-na-5	UGGUCCAGAUUAGAUUUGGAGGAGG
237	HPV26/69-na-6	AUCUACCUGGCAUUGGACCAGUAAU
238	HPV26/69-na-7	GUUUGUGCUUUGCGUGUGUGUGUGU
239	HPV26/69-L1-1	CCUUUGAUAAUCCUGCAUAUGAACC
240	HPV26/69-L1-2	GUACUAGUGACAGCAAGGUUAUUCU
241	HPV26/69-L1-3	GAAACAGCAUGUUUUUUUUUCUUCG
242	HPV26/69-L1-4	ACAACACAUCCUGCCUCCUACGCUU
243	HPV26/69-L1-5	AAUAAAACUGCUGUUAGGCACAUAU
244	HPV51/82-E6E7-1	CACUUGGGCCUGAAGAAAAGCAAAA
245	HPV51/82-E6E7-2	GUGUAAUAAAGCCAUGCGUGGUAUU
246	HPV51/82-E6E7-3	AAAUUGACUUGCAAUGCUACGAGCA
247	HPV51/82-E6E7-4	UGGACAGGCUACGUGUACAGAAUU
248	HPV51/82-E6E7-5	AGCAGCCCAUAGGAGACAUUACAA
249	HPV51/82-E6E7-6	GAUUACUGGACAGUUAUCCGGACAG
250	HPV51/82-E6E7-7	UGUGGAAGCAACGUUGCAGGUAGAU
251	HPV51/82-na-1	ACAGCCACUAGAGGAUGCUAAAUA
252	HPV51/82-na-2	GUCCAGAUUAGAUUUGGAGGAGGAA
253	HPV51/82-na-3	UGCCAGGAGAAAAUACUAGACUGUU
254	HPV51/82-na-4	UCAACCUGGCAUUGGACCAGUAAUA

ES 2 615 728 T3

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
255	HPV51/82-na-5	ACAAGCCAAUAUGUGCUGCUAAUUG
256	HPV51/82-na-6	UGUGUGUGUGUCUUGUGUUGUGUUG
257	HPV51/82-na-7	ACAUGCAAAGCUGCUGGUACAUGUC
258	HPV51/82-na-8	UGGAGUGGGUUGGGUAUAAAAUUGG
259	HPV51/82-L1-1	GAACUUGAAAUGCAGCCUUUACUUU
260	HPV51/82-L1-2	UGUCUUCAUUCUUAUGCAAUUGUAC
261	HPV51/82-L1-3	UGGGGAUUACUAAUUUGUGGCCCUAU
262	HPV51/82-L1-4	AAACGCCGUAACGUAUACCCUAAU
263	HPV51/82-L1-5	UCUUCUCUUCUUCUUCAGCCAAAC
264	HPV30/53-E6E7-1	CCGAAAACGGUACAUAUAAAAGCAC
265	HPV30/53-E6E7-2	GACACCAGAGGAAAAACAGUUACAC
266	HPV30/53-E6E7-3	AUGAGCAAUUGAACAGCUCAGAGGA
267	HPV30/53-E6E7-4	CAAUGGCGUCACCUGAAGGUACAGA
268	HPV30/53-E6E7-5	UAAAACGAAAGUAAUUUAGGCAGUCC
269	HPV30/53-na-1	CAGCGGGUAUGGCAAUACUUUGGAA
270	HPV30/53-na-2	ACACAGUCACUUUUGGUUACAACCG
271	HPV30/53-na-3	GAAAGGACAUGGUCCAGAUUAGAUU
272	HPV30/53-na-4	CGUGCCAGGAGAAAAUUCUAGACUG
273	HPV30/53-na-5	UACAAGUGUGUAAAGCAAAGGCAUG
274	HPV30/53-na-6	UAAAGGCACAUGGGAAGUGCAUAUG
275	HPV30/53-na-7	GUUUUUUUGUCCCGACUCUGUGUC
276	HPV30/53-L1-1	GAAAUACCUAUGCAAACAUUUGCUG
277	HPV30/53-L1-2	CACAGACCUGCCUUACAACACGUA
278	HPV30/53-L1-3	GGUGGUGUGCGUUUUAGUAGGCUUG
279	HPV30/53-L1-4	AGAAGUGGCAAACAAAUAGGUGCUC
280	HPV30/53-L1-5	GAUGGCCUAUAUGAUUUUAUGCAA
281	HPV30/53-L1-6	UUCCCUAUUUUCUUGCAGAUGGCGG
282	HPV30/53-L1-7	GCUUAGAGGACAAAACAGAUUUGU
283	HPV30/53-L1-8	UGUAUGACUGUAUGUAUGUGUAAUG
284	HPV56/66-E6E7-1	CCGAAAACGGUACAUAUAAAAGGCA
285	HPV56/66-E6E7-2	CUCAGAGGAUGAGGAUGAGGAUGAA
286	HPV56/66-E6E7-3	GCGGCCACAGCAAGCUAGACAAGCU
287	HPV56/66-E6E7-4	GCGUUAACAGUAACGUGCCCACUCU
288	HPV56/66-E6E7-5	GCAAGUACAAACAGCACAUAGCAGAU
289	HPV56/66-na-1	ACAGACGUUGCAAAAACUAAAACGA
290	HPV56/66-na-2	AUGAAUAUGUGCCAGUGGAUAAAGC
291	HPV56/66-na-3	UGAAGGGGGUGAUUGGAAACCCAUU
292	HPV56/66-na-4	GGAUAAACGACGAGGACAAAGAAAAC
293	HPV56/66-na-5	UGUAAAGCAAAGCAUGUAGUGCAA
294	HPV56/66-na-6	GUCCUGACUCUGUGUCUAGUACCUUG

ES 2 615 728 T3

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
295	HPV56/66-na-7	GUAUCCACAGACCAGGAAAACGAC
296	HPV56/66-na-8	GUUUGCGCUUUGCUUUUGUGUUUGU
297	HPV56/66-na-9	AUAGGCCUGCAUUUACUACACGUAG
298	HPV56/66-L1-1	GAUAUAAGUCCUAUUGCAGGCUG
299	HPV56/66-L1-2	AGGCGCCGUAAACGUUUCUUAUU
300	HPV56/66-L1-3	CUACCUCCAACACCUUUUCAAGG
301	HPV56/66-L1-4	UUCUAUGUGUUUUACUJACGCAGG
302	HPV56/66-L1-5	AUAAACCUUAUUGGUUGCAACGUGC
303	HPV56/66-L1-6	ACGCGUGGUUGCAUAAACUAAGGUG
304	HPV34/73-E6E7-1	UAAUAAGGUGCGGAAAAUGCCAAA
305	HPV34/73-E6E7-2	GACAACUCAGAGGAUGAGGAUGAAA
306	HPV34/73-E6E7-3	AGAAGAUGGCUGAUUCAGGUAAUUG
307	HPV34/73-E6E7-4	CGGGAUGGUUUAAUGUAGAAGCCAU
308	HPV34/73-E6E7-5	UGGGGGAUUUUAUUGAUAAUGCACA
309	HPV34/73-E6E7-6	AAUGCAGACAAUGAGGCCUAUACGUG
310	HPV34/73-E6E7-7	GAUAUGGCAUACUGAAGUGGAAAC
311	HPV34/73-E6E7-8	UAGUGGGUCCAGUAGCAUUUCAAAU
312	HPV34/73-na-1	UUUAACAGAGGACGACGACAAGGAA
313	HPV34/73-na-2	AAGCCUUGCAGUAUCACGAUCCAAA
314	HPV34/73-na-3	UGUUGCAACCUCCUCCACCCUAGA
315	HPV34/73-na-4	GCCUCUGGCAGACUUUUUUUUCAA
316	HPV34/73-na-5	AACAGGUUAAGGUUGUAGACCCUGC
317	HPV34/73-na-6	CAGCACAGUGACUUGCAUAAUGCUC
318	HPV34/73-na-7	UACUAGAAGUGGCAAACGUUAGGU
319	HPV34/73-L1-1	AAAGGUUACCUGCCCCUGUGUCU
320	HPV34/73-L1-2	AAAGUUUCAGGUUUGCAAUACAGGG
321	HPV34/73-L1-3	CUGUUGUAGAUACUACUAGAAGCAC
322	HPV34/73-L1-4	UUUUGGCUUCCUGCAGGCAACUUGG
323	HPV34/73-L1-5	UGCACACAUUUUUUACCCACCCU
324	HPV6/11-E6E7-1	GAAAACGGUUCAACCGAAAACGGUU
325	HPV6/11-E6E7-2	GACCAGUUGUGCAAGACGUUUAAUC
326	HPV6/11-E6E7-3	ACUGCUGGACAACAUGCAUGGAAGA
327	HPV6/11-E6E7-4	GACCCUGUAGGGUUACAUUGCUAUG
328	HPV6/11-E6E7-5	AGACAGCUCAGAAGAUGAGGUGGAC
329	HPV6/11-E6E7-6	GUUGCUGUGGAUGUGACAGCAACGU
330	HPV6/11-na-7	CGGACGAUUCAGGUACAGAAAAUGA
331	HPV6/11-na-8	CAUUAUGCGACUGUGCAGGACCUAA
332	HPV6/11-na-1	ACAGCCAAAAAAGGUAAAGCGACGG
333	HPV6/11-na-2	GAAAUGGGGGAGAUGGUCAGGAAA
334	HPV6/11-na-3	GAGGACGAGGAAGAUGGAAGCAAUA

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia
335	HPV6/11-na-4	GGCAGCACAGUUAUAUGUUCUCCUG
336	HPV6/11-na-5	CUACUACAUACACCCCCGCACAGAC
337	HPV6/11-na-6	CUAUGGGAACACCCUUUAGUCCUGU
338	HPV6/11-L1-7	ACGCCGUAAACGUUUUCCUUUAUUU
339	HPV6/11-L1-1	UAGCGACAGCACAGUAUAUGUGCCU
340	HPV6/11-L1-2	CAGGCUUUGGUGCUAUGAAUUUUGC
341	HPV6/11-L1-3	CUGUGGUAGAUACCACACGCAGUAC
342	HPV6/11-L1-4	GAGUAACCUAAGGUCACACACCUGC
343	HPV6/11-L1-5	CCACACCCUACAUUUUCCUUCUUA

B. Diseño de la sonda de inmovilización y detección

5 Para diseñar las sondas de inmovilización y detección, se alinearon todas las secuencias genómicas de HPV disponibles. A partir de esas alineaciones, se seleccionaron los subgrupos de tipos de HPV relacionados más estrechamente, de acuerdo con una clasificación del árbol filogenético. Estos subgrupos de HPV estrechamente relacionados se volvieron a alinear en grupos más pequeños para las regiones E6/E7 y L1 de longitud completa. Se extrajeron sondas de oligonucleótidos específicas para cada tipo de HPV a partir de las regiones de no consenso de las secuencias realineadas. Se seleccionaron las sondas que tenían de 25 a 32 pb y una T_m de 55°C a 70°C. Las sondas se compararon después frente a otros tipos de HPV presentes en la base de datos del NCBI, utilizando una búsqueda BLAST para confirmar su carácter único para cada tipo específico de HPV. Se diseñaron múltiples sondas para cada tipo de HPV. Una lista completa de las sondas generadas de acuerdo con este método se encuentra en la Tabla 2 (a continuación). Para proteger frente a una eliminación o mutación que causaría un falso positivo en el ensayo, se desarrolló una sonda para cada una de las regiones E6/E7 y L1 del genoma de HPV. Esto es especialmente útil para las dianas integradas, ya que algunas regiones se pueden alterar durante la integración.

15 Las sondas de inmovilización se modifican con el fin de facilitar la unión a las perlas de detección. En los siguientes ejemplos, se emplean microesferas Luminex[®] como perla de detección, las cuales están recubiertas con grupos carboxi para facilitar la inmovilización de las sondas de captura. Por lo tanto, todas las sondas de inmovilización contienen una modificación 5' amino-C12.

20 En los siguientes ejemplos, se utiliza SA-PE para detectar los ácidos nucleicos capturados. En consecuencia, todas las sondas de detección en los siguientes ejemplos tienen una modificación en la biotina 5' para facilitar la detección mediante SA-PE.

Tabla 2: SONDAS DE INMOVILIZACIÓN/DETECCIÓN ESPECÍFICAS DE E6/E7

TIPO DE HPV	ID DE LA SONDA	SEQ ID NO	SECUENCIA DE LA SONDA
HPV 2	E6__-2A	344	TGTATGGTGCAAACGGCCGTTATCAGAG
	E6__-2B	345	ACATTGCATGAACTGCGGGTCATC
HPV 3	E6__-3A	346	TCTACTGTGCAGAAACACCGGAATAGGA
	E6__-3B	347	TACGAAACAGCTGACTACAACCTGAACACAA
	E6__-3C	348	TCTGGTCATTGGAGGGGGAGCTGTCAGTAC
	E6__-3D	349	CAGCTGACTACAACCTGAACACAAAGC
HPV 6	E6__-6A	350	GGCTATCCATATGCAGCCTGCGCGTGC
	E6__-6B	351	CAAGACATCTTAGACGTGCTAATTCGG
	E6__-6C	352	CAAGACATTTTAGACGTGCTAATTCGG
	E6__-6D	353	GGTAAAACATATACTAACCAAGGCGCGG
	E6__-6E	354	GGTAAAACATATACTAACCAAGGCACGG
HPV 7	E6__-7A	355	ACAGCTAGAACTTTATTTGAATTATGTG
	E6__-7B	356	TAACAGCATTTTACAAACAGCTGAGGTGCTG

ES 2 615 728 T3

TIPO DE HPV	ID DE LA SONDA	SEQ ID NO	SECUENCIA DE LA SONDA
	E6__-7C	357	AGCGTGTGTAAAGTGTTTAGAATTTTAT
HPV 10	E6__-10A	358	TGCAGAAGCTATGTCCATGGGTGCACAGGA
	E6__-10B	359	GCTTTTGTGTAGAAATTGTGGAATACCTTTG
	E6__-10C	360	GGCAGCATTTCACCTTAGAGAATTAT
HPV 11	E6__-11A	361	GTGTGCCTGTTGCTTAGAACTGCAAGGG
	E6__-11B	362	ACTAAAGCACATATTGGGAAAGGCACGC
	E6__-11C	363	GAGTGCACAGACGGAGACATCAGACAACTAC
HPV 16	E6__-16A	364	CAGACATTTTATGCACCAAAAAAGAACT
	E6__-16B	365	AGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAAT
	E6__-16C	366	CATAAAGTTACCAGATTTATGCACAGAGC
	E6__-16D	367	CGATGTATGTCTTGTTCAGATCATCA
HPV 18	E6__-18A	368	GCTACCTGATCTGTGCACGGAAGTGAACA
	E6__-18B	369	GCAAGACAGTATTGGAAGTTACAG
	E6__-18C	370	CCGAGCACGACAGGAACGACTCCAACGACGC
HPV	E6__-26A	371	AGAGAACGACCCAGAACGCTACATGAGC
26	E6__-26B	372	TGCAATTTGTGACCTAAGAGTAGTATATAGAG
	E6__-26C	373	ACGTTTCGAGTGCTGGAGCAGATGTTAATGGAA
	E6__-26D	374	TCCTTGGTGTGCCATCAGTGTGCTGCACAGT
HPV 27b	E6__-27A	375	ACACTGCATGCAGTGCGGGTCAAC
	E6__-27B	376	GCGTGTATTGCAGACGAGCGCTTTCAGAC
	E6__-27C	377	GCGTGTATTGCAGACGAGCGCTTTCAGAC
	E6__-27D	378	AGCGCTTTCAGACGCTGATGTATT
	E6__-27E	379	AGCGCTTTCAGACGCTGATGTATT
HPV 28	E6__-28A	380	GCACTGCATATTCTGCGCCAAAGTGC
	E6__-28B	381	GCCAAAGTGCTGACCACAGCGGAGCTAT
	E6__-28C	382	ACTGCAGGGCATTGTGCGACGCCTGAAGCAC
	E6__-28D	383	TGCATAGCTGGCTACTGGAGAGGGAGCTGTC
HPV 29	E6__-29A	384	CAGCCCAGAACTGGCAGCATTTTGC
	E6__-29B	385	CGCTGCTTATTGTTTGAAGGCATAAAGC
	E6__-29C	386	GTGCCACAAGCCACTTGTTCAGAGAGG
	E6__-29D	387	CAAAATTTCTGGATACTGGAGAGGGAGTTGC
HPV 30	E6__-30A	388	GCACCATCTTTGTGAGGTACAAGAAACATCG
	E6__-30B	389	CAAGAAGGAATTATCCAGCTCAGAGG
	E6__-30C	390	GACTGGTATATAGGGAGGACAGCCCA
	E6__-30D	391	CACAACGTCCACTGAGACAGCAGTATAAT
	E6__-30-E	392	CTGCGTGCCCTACAACAGATGCTTATGGGC
HPV 31	E6__-31A	393	CTACTGCAAAGGTCAGTTAACAGAAA
	E6__-31B	394	CTACTGCAAAGGTCAGTTAACAGAAACA
	E6__-31C	395	TTGACAAACAAAGGTATATGTGATTTG
	E6__-31D	396	AAAAAGAAACGATTCCACAACATAGG

ES 2 615 728 T3

TIPO DE HPV	ID DE LA SONDA	SEQ ID NO	SECUENCIA DE LA SONDA
HPV 32	E6__-32A	397	ACCACTTAACCAGTGTGCTGAAGCGTATGCA
	E6__-32B	398	GCATACAGTAGAACAAGAAACAGGACTACTG
	E6__-32C	399	CCTGCCAACGTGTGACCCGACAACGTGC
	E6__-32D	400	GCCAGTGTAGTAACCGGGGAAACACC
	E6__-33A	401	CTGTGTTTGC GGTTCTTATCTAAAATTAGTG
	E6__-33B	402	CACAACATTGAACTACAGTGC GTGGAATGC
	E6__-33C	403	ATTATTCTGTATATGGACATACATTAGAACA
	E6__-33D	404	ATTATTCTGTATATGGAAATACATTAGAACA
	E6__-33E	405	TGTA AAAACGCCATGAGAGGACACAAGCC
HPV 33	E6__-33F	406	ACACAACATTGAACTACAGTGC GTGGA
	E6__-33G	407	ACACCACATTGAACTACAGTGC GTGGA
	E6__-33H	408	ATTATTTCGCTATATGGAGAAACATTAGAACA
	E6__-33I	409	CAGGATATAAATCTAAAACATATTC
	E6__-33J	410	CAGGATGTAAATCTAAAATATATTC
	E6__-33K	411	ATCTGCAAATGCAAATCATATACCTCAG
	E6__-33L	412	ATCTGCAAATACAAAGTCATATACCTCAG
HPV 34	E6__-34/64A	413	CAGCCTTATGTGAAGAGGTCAACATTTCA
	E6__-34/64B	414	GCAGGACATTGTGTTAGATCTGAAACCAACG
	E6__-34/64C	415	CACACGCTGACCTATTAGTGT TAGAAGACC
HPV	E6__-35A	416	AGAAGGCCAGCCATATGGAGTATGCATG
35	E6__-35B	417	GAAGAAAAAAAAACGATTCCATAACATCGG
	E6__-35C	418	ACAGAGCACACACATTGACATACGTAAATTGG
HPV 39	E6__-39A	419	TGCAGACGACCACTACAGCAAACCGAGG
	E6__-39B	420	GCAGACGACCACTACAGCAAACCGAGG
	E6__-39C	421	CCAGCAGAAAAATTAAGACACCTAAATAGC
	E6__-39D	422	AAGAGAAACCCAAGTATAACATCAGATATGCG
	E6__-39E	423	CTAACACGAAGAGAAACCCAAGTATAACATC
HPV 40	E6__-40A	424	CAGGCCAGGACCCTGTATGAACTGTGTG
	E6__-40B	425	AAGACGGTCCTAAAAACAGCTGAGGTA CTG
	E6__-40C	426	CGCATGTCCACGGTGCCTGGACCTGCAC
HPV 42	E6__-42A	427	GCACTTAACAGGCGCAGAGGTGCTCGCG
	E6__-42B	428	GTATACAGTGGAGAAAGAAACTGGACTACTT
	E6__-42C	429	GTACAGCAGACACAGGTAGAACACGGAC
HPV 43	E6__-43A	430	CTTTGACTACGCAGCATATGCAGATACTGT
	E6__-43B	431	CAGTGT TTTGATTTGTGCATTAGATGC
	E6__-43C	432	ATCACCAGTGAAAAAGTACAGCATA
	E6__-43D	433	GCACATCCTGTCTGTGTGTAATTTCGAC
HPV 44	E6__-44A	434	GAAAAACGTTAAGTACTGCAGAGGTTT
	E6__-44B	435	TAAGTCAATTCTGGACGTGCTGATACG
	E6__-44C	436	CCACCTGTGGTACATGTAGTCGGAAGG

ES 2 615 728 T3

TIPO DE HPV	ID DE LA SONDA	SEQ ID NO	SECUENCIA DE LA SONDA
HPV 45	E6__-45A	437	GCATTACAGGATGGCGCGCTT
	E6__-45B	438	CCATTGAACCCAGCAGAAAAACG
	E6__-45C	439	GTAGAGAGCTCGGCAGAGGACCTTAGAACAC
HPV 51	E6__-51A	440	GAAGCTTTGAACGTTTCTATGCACAATATA
	E6__-51C	441	CAAAAATTAGAGAGTATAGACGTTATAGCAGG
	E6__-51D	442	ATGCGCTAATTGCTGGCAACGTACACGAC
	E6__-52A	443	GAGGATCCAGCAACACGACCCCGGACCC
	E6__-52B	444	GGCTGCAGTGTGTGCAGTGCAAAAAAGAGC
	E6__-52C	445	CCATATGGCGTGTATTATGTGCCTACGC
	E6__-52D	446	GATGAGGAGGATACAGATGGTGTGGACCG
	E6__-52E	447	GAGGATCCAGCGACACGACCCCGG
HPV 52	E6__-52F	448	AGGCTGCAGTGTGTGCAGTGCAAAAAAGAGC
	E6__-52G	449	AGGCTGCAGTGTGTGCAGTGTA AAAAAGAGC
	E6__-52H	450	TGTGCAGTGCAAAAAAGAGCTACAACGAAGA
	E6__-52I	451	GGAAAACATTAGAAGAGAGGGTAAAAAACCA
	E6__-52J	452	GGAAAACATTAGAAGAGAGGGTAAGAAAACCA
	E6__-52K	453	GGAAAACATTAGAAGAGAGGGTAAAAAGACCA
	E6__-52L	454	GGAAAACATTAGAAGAGAGGGTAAAAAACCA
	E6__-52M	455	GGAAAACATTAGAAGAGAGGGTCGAAAACCA
HPV 53	E6__-53A	456	TATATAATTTGCATATACAGATCTAAGAG
	E6__-53B	457	GCAAGAAGGCATTGACAGCGTCAGAGG
	E6__-53C	458	GTATAGAGACGGGTATCCGTATGG
	E6__-53D	459	ATGGTATAGAGACGGGTATCCGTATGG
HPV 54	E6__-54A	460	GGGGGCAATGTCTGCTACTGAACCCAC
	E6__-54B	461	GCCTTTTGAAGAAGACGGTGTGTACA
	E6__-54C	462	GCTTGTGCACTGTGCCTAGA ACTGCACGGGC
	E6__-54D	463	ACGGCTATGTGTGTATAGCACGCACACAGG
	E6__-54E	464	GGGGGCAATGTCTGCTACTGAAC
	E6__-54F	465	GACGGTGTGTACAGCAGATATTTATGCA
HPV 55	E6__-55A	466	TAAATTACAGAATACCTGGAAGGGTCCG
	E6__-55B	467	CCACCTGTGGTACATGTAACCGGAACG
HPV 56	E6__-56A	468	TTGCAAAAAAGAACTAACACGTGCTGAGG
	E6__-56B	469	AGTGTATAGGGATGATTTTCCTTATGC
	E6__-56C	470	AACATCTAGAGAACCTAGAGAATCTA
	E6__-56D	471	GAACTAACACGTGCTGAGGTATATAAT
HPV 58	E6__-58A	472	GCAATAAACACCATCTGCAATGGATGACC
	E6__-58B	473	CCTGTAACAACGCCATGAGAGGAAACAACCCAACGC
HPV 59	E6__-59A	474	GTATGCAGCGTGTCTGAAATGCATTTCA
	E6__-59B	475	GAACATTAGAGGCTGAAACCAAGACACC
	E6__-59C	476	CATGAGCTGCTGATACGCTGTTATAGA

ES 2 615 728 T3

TIPO DE HPV	ID DE LA Sonda	SEQ ID NO	SECUENCIA DE LA Sonda
	E6__-59D	477	CTTGTGTGCTACGAGCAATTACCTGACTCCGA
	E6__-59E	478	AACATTAGAGGCTGAAACCAAGACACC
HPV 61	E6__-61A	479	CCGTAGGGTCAGCAAAGCACACTCATCTAT
	E6__-61B	480	GCAGCAAACCGTTAAGTATACAGG
	E6__-61C	481	AGCAAACCGTTAAGTATACAGGAAAAGGAGC
	E6__-61D	482	GCTACATGAACTACTGCTGGGCGACTTGTCC
HPV 62	E6__-62A	483	TGTGGACCTGGACGACCTGCACCTA
	E6__-62B	484	ACGGCGGTGGCAGCACTCATGCTTT
	E6__-62C	485	GGAAAAGGAGTATCAGGTAGAGAGGGG
HPV 66	E6__-66A	486	GATTCCATATTCAGCAATACACAGGAA
	E6__-66B	487	GATCCCATATTCAGCAATACACAGGAA
	E6__-66C	488	CAAAAAGGAACTTACAAGTTTAGAGC
	E6__-66D	489	AGTATATAGAAACAATTGGCCATATGC
	E6__-66E	490	CCGGAGTATGGGGCAACATTAGAAAAGTA
	E6__-66F	491	GTATGGGGCAACATTAGAAAAGTA
	E6__-66G	492	TATATAGAAACAATTGGCCATATGC
	E6__-66H	493	ATTAGTATATAGAAACAATTGGCCATATGCAG
HPV 67	E6__-67A	494	CGGTAATATATAAAGCACACCAGTGTCCA
	E6__-67B	495	CAGTGCAAGAAATATGTTTCAGGACACAGA
	E6__-67C	496	AAGTTTGCCCTGCGTGCAAGTCAAAAAA
	E6__-67D	497	CATTCACAGTACAGCAGCAGACGTCCGAAC
HPV 68	E6__-68A	498	GCAGAAGGCAACTACAACGGACAGAGG
	E6__-68B	499	TCAAGAAACACAAGTTTAAGTAACTATGCA
HPV 69	E6__-69A	500	CGTCCGAGCGGTGGAGCAGCTGCTGATGGGC
	E6__-69B	501	GAGTTTGGTGTGCCACCAGTGTGCTACATAC
	E6__-69C	502	GAGTTTGGTGTGCCACCAGTGTG
	E6__-69D	503	ACGTCCGAGCGGTGGAGCAGCTGCTG
HPV 70	E6__-70A	504	CCCATACGGAATGGCGCGATTTCCAAT
	E6__-70B	505	ATAGTATATAGAAACGGGGAGCCATATGC
	E6__-70C	506	ATAAATATAAATATGCATGGACCACGGCCG
	E6__-70D	507	CTCACAAGAGAACCTGCGATCTCTACT
	E6__-70E	508	ACAAGTATAAATATAAATATGCATGGACCACG
HPV 71	E6__-71A	509	GTTTGCTGCATGTGCCTGCTGTTTGAAAT
	E6__-71B	510	TAGACACCGGAACGCCAGTTACAGAGCAAC
	E6__-71C	511	AGAAAGAATAATTACAGAAGGCAGGCG
HPV 72	E6__-72A	512	ACGATACTGGACGTATTCGGGCTACGG
	E6__-72B	513	GTCAGGAAAAGGAATATCAGGTGCAGACAGG
	E6__-72C	514	ATGAGAGGGACGGTGTGGTGTGCAG
HPV 73	E6__-73A	515	AACCTGGACTGTGTGTTTTGCCAACGTGG
	E6__-73B	516	GTATAGGCGATATAGACAATCAGTATATGGCA

ES 2 615 728 T3

TIPO DE HPV	ID DE LA SONDA	SEQ ID NO	SECUENCIA DE LA SONDA
	E6__-73C	517	ACTTTAGACCTGAAACCAACAACCGAAAT
	E6__-73D	518	ACAAAGCTGATTTAAGAGTGATAGAAGAGT
HPV 74	E6__-74A	519	CCATTTGCAGCGTGCGCCATTTGCTTA
	E6__-74B	520	AAACTAGGCGACACCTGGAAAGGGCGCTGC
	E6__-74C	521	GTGCAGTGTACAGGACCAGACATCAACAAT
HPV 81	E6__-81A	522	GCTGGGGCCAGCAAATCCTACCAATTTGTTT
	E6__-81B	523	CGCAGCGTGCTTGTGCAGAGAAGCTAAAGTAC
	E6__-81C	524	GCGGCGGTGGCAATATTCGTGCTTCGGACCA
HPV 82	E6__-82A	525	CCACAAGTAAAGGACATAGTGTTGGAG
	E6__-82B	526	GGTGGTGGACGACAAAAAAGGTTTCAT
	E6__-82C	527	GCCTGGTGGGCCCGTGTTCGCGGAACAAC
HPV 83	E6__-83A	528	CCACTGGCACAGCTGTATATACGATGCCAT
HPV 84	E6__-84A	529	TGTGCTGTGCCAGGAATACGAGGTGGAGTTCGACG
	E6__-84B	530	AGGAAGAATTAACGGAAGGCGAAGTGC
	E6__-84C	531	GTAAAGGAATTACTAATTGTTTGGAGG
HPV 85	E6__-85A	532	CCTATGCAACACACTGGACACATCACTGC
	E6__-85B	533	GTTAGAAAACTAACAATAGCAATATAT
	E6__-85C	534	CTGTATTGCTATGAGGAATTAACAACACTCAG
	E6__-85D	535	GACCTATGCAACACACTGGACACATCACTGC
HPV 86	E6__-86A	536	CTAAAGGAATTACTGGTCTGGAAA
	E6__-86B	537	CAAGACACAGGCGTATCATTGGCACACTT
	E6__-86C	538	CTGCATATGGTGAATTAATCTGCAT
HPV 87	E6__-87A	539	TTAAGGGAATTATTGCTGGTGTGGAGA
	E6__-87B	540	GGAATTATTGCTGGTGTGGAGATTTGG
	E6__-87C	541	GAGCATATGATACACGCGAATCTGCAC
HPV 89	E6__-89A	542	ATATTGCACCAAGGAGCTTACAAC
	E6__-89B	543	GGCAGCTGCCCATGGTGTATGTGCACCG
	E6__-89C	544	CGGCCGCACGCCGACCATCCAGGAT
	E6__-89D	545	CGTGTGGTGTGTGCTATCGTGCAGTTAGG
HPV 91	E6__-91A	546	GTACGCGGCATTAGCAGTAACAGTAGAG
	E6__-91B	547	CGAGTGCACCTCTTGTTATTGTTCAATTCGT
	E6__-91C	548	GCACCTCTTGTTATTGTTCAATTCGTC
HPV	E6__-94A	549	GTGCTGCGTGTCTGCACCAAACAGC
94	E6__-94B	550	CGTGTCTGCACCAAACAGCTGACCGTAGCC
	E6__-94C	551	CAGCTGACCGTAGCCGAATTGACTGC
	E6__-94D	552	CTGGAGAGGGTGTGTGCTTATTGCTGGACAC

ES 2 615 728 T3

Tabla 3: SONDAS DE INMOVILIZACIÓN/DETECCIÓN ESPECÍFICAS DE L1

TIPO DE HPV	ID DE LA SONDA	SEQ ID NO	SECUENCIA DE LA SONDA
HPV 2	L1__-2A	553	CGATGCTGATTTGTATGATCCAGATACCCA
	L1__-2B	554	TCAGTTCCAACCTCCAGGCAGTCATGTT
	L1__-2C	555	CAAGCGCGCCGCTGTTTCGGGGACCACGC
	L1__-2D	556	TCCCTGACCTTTTGGGATGTGGATCTCAGT
HPV 3	L1__-3A	557	CCCCAAATCTTCTAATTCCAAGATGGATATT
	L1__-3B	558	AGCAGAATGCGTCACCGGGTGATTGT
	L1__-3C	559	TCTAGAGCTTATTACTGCACCTATAACAAG
	L1__-3D	560	GTTGTACATTAAGGTGACAGTCAGAGCGGC
HPV 6	L1__-6A	561	AACAGTGTACTAATACACCTGTACAGGC
	L1__-6B	562	TCCTATTGACATATGTGGCACTACATGT
	L1__-6C	563	TATAATTAAGGGTAGTGAAATCGCACGT
	L1__-6D	564	GCTGCCCTAAACGTAAGCGCGCC
HPV 10	L1__-10A	565	GGAACCCACCTGCACAGGGCGATTGCC
	L1__-10B	566	CAACGGTGGGGGGCGAGACGTTGGTA
	L1__-10C	567	TACCAATATGTGCTTGTGTGTTCTTCT
	L1__-10D	568	GCCTCCCCTGCCACTACGTATGACGCC
HPV 11	L1__-11A	569	TTCATCCCTGTTTGACCCCACTACACAG
	L1__-11B	570	AGTGGTGGGTATGGTGGTAATCCTGGTCAG
	L1__-11C	571	GGGTACACAATGTTCAAATACCTCTGTACAAAA
	L1__-11D	572	TGTTCCCTTGATATTTGTGGAAGTGTCTGC
HPV 16	L1__-16A	573	AACATCCAGACTACTTGCAGTTGGA
	L1__-16B	574	ATTTTACAATCCAGATACACAGCGGCTG
	L1__-16C	575	AGCAAATGCAGGTGTGGATAAATAGA
	L1__-16D	576	TCCCCATGTAACAATGTTGCAGTAAATCCA
HPV 18	L1__-18A	577	GCAGGTGGTGGCAATAAGCAGGATA
	L1__-18B	578	GGCCTGTGCTGGAGTGAAATTGGC
	L1__-18C	579	CCATGCCGCCACGTCTAATGTTTCTG
	L1__-18D	580	GTCTCCTGTACCTGGGCAATATGATG
HPV 26	L1__-26A	581	CCTGCAATAGTTGTGCATGGGGATA
	L1__-26B	582	TGGCCAAAAGGCCGAAATTCCTAAG
	L1__-26C	583	GACTGACAACAGGGACAATGTTTCA
	L1__-26D	584	GGAGCCCCCTACATCTTCTATTTAT
	L1__-26E	585	AAACCTGCAATAGTTGTGCATGGGGATA
	L1__-26F	586	GGCGGGGGCTGTTGGGGATGCTATA
	L1__-26G	587	GGGGGCTGTTGGGGATGCTATA
	L1__-26H	588	ACTGGCCAAAAGGCCGAAATTCCTAAG
	L1__-26I	589	ATTAAAGGTGCTGAATCAGGCAGGGAGCCC
	L1__-26J	590	TAAGGCGGGGGCTGTTGGGGATGCTATACCCACCA C
L1__-26K	591	CACTAECTTACCTGCAATAGTTGTGCATGGGGATA	

ES 2 615 728 T3

TIPO DE HPV	ID DE LA SONDA	SEQ ID NO	SECUENCIA DE LA SONDA
HPV 27	L1__-27A	592	AAAACGCACCGCTGTTGCGGGGGCGGCGG
	L1__-27B	593	AGCTGAGGTGTCTGATAACTAATTATAAA
	L1__-27C	594	ACTATCTCGGACCCCGGCAGTCATGTG
	L1__-27D	595	GGTAGCAATAATAGGTTGGCAGTGCCTAAGGTG
HPV 28	L1__-28A	596	ATCATCCACTAACAAAGCAGATGTGCCAAA
	L1__-28B	597	GTCAAATACACAACAGGGAGATTGCCCTCCG
	L1__-28C	598	TATTACAGGCCAATAAATCGGACGTGCCCT
	L1__-28D	599	CAGGGCAACGGGAGGGATGTGATTGGT
HPV 29	L1__-29A	600	ACATTATTCAATCCCAAATCCTCTGGTA
	L1__-29B	601	GGAGGTAGGTCGAGGGCAACCTCTCGGTGTC
	L1__-29C	602	CACTGTGTGTGCACGCACTAGTTCGGCTGC
	L1__-29D	603	GTTGTGTGCTACCACAGAGTCTCAACCGTTG
HPV 30	L1__-30A	604	GCCCCTCAGGCCCATTTGACACTACA
	L1__-30B	605	GGCTGGTAATTCCAAAACAGATGTT
	L1__-30C	606	AAATAACAGGGATCCCCCGCCAAGCTCA
	L1__-30D	607	TTCCTTACTATTTATTGTGCATGAATGTATG
HPV 31	L1__-31A	608	CAGTGCTAGGCTGCTTACAGTAGGC
	L1__-31B	609	GACAATCCTAAAAAATAGTTGTACCAAAGGTG
	L1__-31C	610	CCGGTGGTCCTGGCACTGATAATAGG
	L1__-31D	611	TAGTCCTTGTAGTAACAATGCTATTACCCCT
HPV 32	L1__-32A	612	GCCATTAGATATTATGAACTCCATTAG
	L1__-32B	613	GGACATGTATATAAAAGCTTCTAATGG
	L1__-32C	614	TATCCAACCTCCAGTGGTTCTATGGTCA
	L1__-32D	615	CTGAAGACACATACAAGTCTACTAAC
HPV 33	L1__-33A	616	GCTAAAAAATTATTGGTACCCAAAGTATCA
	L1__-33B	617	AGTATCCTGGACAACCGGGTGTGATAAT
	L1__-33C	618	CTTGGATGTAAGCCTCCAACAGGGGAA
	L1__-33D	619	CACATCCACCCGCACATCGTCTGCA
HPV 34/ 64	L1__-34/64A	620	ACTAATGGGAAACGTAAGATTGCTGTA
	L1__-34/64B	621	GTGGAAACATAGCAGATAGTAGGGAG
	L1__-34/64C	622	AGGTAAGTGTAGGCGATGCTATTCCAGATGACT
	L1__-34/64D	623	GTCTGCACCTTCATCATCTAGTACAG
	L1__-34/64E	624	AAAGTGAAACATAGCAGATAGTAGGGAG
HPV 35	L1__-35A	625	CAGTTCTAGGCTATTAGCTGTGGGTCAC
	L1__-35B	626	GCAGTACCCAAGGTATCTGGTTTG
	L1__-35C	627	ATCATTTTATGATCCCTGCCTCCAGCGTT
	L1__-35D	628	AAATATGTTGGTAACTCTGGTAACTCTG
HPV 39	L1__-39A	629	ATATAGGGTATTTTCGCGTGACATTGCC
	L1__-39B	630	AAAGGCATGCAAGCCCAATAATGTATCTA
	L1__-39C	631	ACGTGCAAACCCCGGTAGTTCTGTATACTG

ES 2 615 728 T3

TIPO DE HPV	ID DE LA SONDA	SEQ ID NO	SECUENCIA DE LA SONDA
	L1__-39D	632	CAGTTTGGTAGACACTTACAGATACC
HPV 42	L1__-42A	633	CAAAAAGGCCAAATAAGACATCTATCCCCAAA
	L1__-42B	634	TAATTTATATAACCCAGATACGCAGCGCA
	L1__-42C	635	ACATATGGTGGAGGCCCTGGTACAGAC
	L1__-42D	636	ACTGTCTGTAGGTAAACGAAAGGCGTCTAC
HPV 45	L1__-45A	637	GTACCTAATGGTGCAGGTAATAAACAGGCTG
	L1__-45B	638	GTTTAGAGTAGCTTTACCCGATCCT
	L1__-45C	639	TTGGGCATGTGTAGGTATGGAAATTGGT
	L1__-45D	640	GCTCATGCAGCTACAGCTGTTATTACGC
HPV 51	L1__-51A	641	CCAAGCATTCTATTGTTATACTAGGTGGGG
	L1__-51B	642	CTCAACGCGTGCTGCTATTCTCTAAA
	L1__-51C	643	GTAATGGCCGTGACCCTATAGAAAAG
	L1__-51D	644	TATGTTAGTTTTTGTATGCTTGTGCACACT
	L1__-51E	645	TTAACTATTAGCACTGCCACTGCTGC
	L1__-51F	646	AACCTCAACGCGTGCTGCTATTCTCTAAA
	L1__-51G	647	AACCTCAACGCGTGCTGCTATTCTCTAAAAGTA
HPV 52	L1__-52A	648	TATTA AAAACACCAGTAGTGGTAATGGT
	L1__-52B	649	AATATGCTGGTAAACCTGGTATAGATAAT
	L1__-52C	650	AACCCCTTGAATAATAATTCAGGAA
	L1__-52D	651	CCTACAGCTCATTAAACAGTGAATAC
HPV 53	L1__-53A	652	ATAGCTATTCAGGATACTGCCCCGGAC
	L1__-53B	653	CCCATTGGA ACTTATCAATTCACCTATT
	L1__-53C	654	CGTTATTGGTGAGGAAATACCTAATGAC
	L1__-53D	655	CTTCCGCAACCACACAGTCTATGTC
HPV 54	L1__-54A	656	TTAAAGTACAAAAACCAATAATAAGCAAAG
	L1__-54B	657	CAACCTATGTACACCTAATACATTGGCT
	L1__-54C	658	AGTGAGGTACCCCTTGATGTAGCTACCTCA
	L1__-54D	659	TACAGCATCCACGCAGGATAGCTTTAATAA
HPV 56	L1__-56A	660	GACTAAGGACAATACCAAAACAA
	L1__-56B	661	GTA CTGCTACAGAACAGTTAAGTAA
	L1__-56C	662	GCCAGTGGCCACCAGCCTAGAA
	L1__-56D	663	ACTAGGTCAAAGCCTGCTGTAG
	L1__-56E	664	AAAATCTGCTCCTACCTCCACCTCTACAC
	L1__-56F	665	ATCTGCTCCTACCTCCACCTCTACAC
HPV 57	L1__-57A	666	GAGCTCTAGGCTCCTCACAGTAGGCCAT
	L1__-57B	667	GAAAAATAGCACTAATAAGGTGTCTGTA
	L1__-57C	668	CAACCTCTATGATCCCAGACCCAGCGTCTG
	L1__-57D	669	TGTCAAAAAGTTCTACCGTCCAGACCCCGGT
HPV 58	L1__-58A	670	CAGTTCAGACTTTTGGCTGTTGGCA
	L1__-58B	671	CAGATATCCCGCACAGCCAGGGTCT

ES 2 615 728 T3

TIPO DE HPV	ID DE LA SONDA	SEQ ID NO	SECUENCIA DE LA SONDA
	L1__-58C	672	CCCGGATGACCTTTATATTAAGGG
	L1__-58D	673	ATTACACTAACTGCAGAGATAATGAC
HPV 59	L1__-59A	674	AAAGGTGGTAATGGTAGACAGGATG
	L1__-59B	675	AGCATCTGCTGTTGATACCAAAGATACACGT
	L1__-59C	676	GACATACGTGCCAACCCAGGCAGTTATTTA
	L1__-59D	677	CCCATCACCAAACGTGTTAAGCGTCGCAAG
HPV 66	L1__-66A	678	CCGTGAAATCAATCAATACCTTCGC
	L1__-66B	679	CATTCCTACAGATTTGTATTGGAAGGGTG
	L1__-66C	680	TAGACCCCCTAGACCCAAGGCTAGT
	L1__-66D	681	AAAGCACATTAATAATATGATGCCCGTG
HPV 67	L1__-67A	682	TATTAGTGGACATCCATTACTTAATAAG
	L1__-67B	683	ATAATAAATACCCTAGCCAGCCTGGTA
	L1__-67C	684	ACCTACAGATTTGTATTTTAAGGGATCT
	L1__-67D	685	CACCTTCTTCTCCTCTTCCTCCTCTG
	L1__-67E	686	GGTAATTGTATGACTGTTGTGTGT
HPV 68	L1__-68A	687	AGTGTTCCTGAGTCTACATTATATAATCCA
	L1__-68B	688	ATAAAAATCCTAAAGACAGTAGGGAC
	L1__-68C	689	CTTGTAGATACATACCGCTACCTACAA
	L1__-68D	690	GGACCAATTCCCATTAGGACGCAAA
HPV 69	L1__-69A	691	TCTGGTTCAACAGCAGAAATTCCTAAAGTG
	L1__-69B	692	CTCTCGATTATTAACCTTTGGGTCATCCC
	L1__-69C	693	CTGCTAATGCAGACACTGATAATAGGGAC
	L1__-69D	694	TAAAAATGCACAGTCTCAGGTACAGCGTGCC
HPV 70	L1__-70A	695	GTTTGGCCTTCCGGATCCTTCCCTT
	L1__-70B	696	GGATATACGTGAGCGTCCTGGTACTC
	L1__-70C	697	TGCCTGCACCGAAACGGCCATACCTG
	L1__-70D	698	GTCAGCTAAATCGTCTTCTCAGCC
HPV 73	L1__-73A	699	CTGGACAAAATACAGATGGTAGAGAA
	L1__-73B	700	ACTTCACAAACTGTTAATACTGGTGAT
	L1__-73C	701	TGGTGATACCGGTGATAAAATCCCAGATGACC
	L1__-73D	702	GGCTAGTAGCTCTACTACAACGTATGCC
HPV 82	L1__-82A	703	ACCAGTACACGTGCTGAAATACCTAAG
	L1__-82B	704	CCCTTTAGATATAGCTCAGTCCGTGTGT
	L1__-82C	705	GCATTACTATAATAGGGCCGGTGTGGTT
	L1__-82D	706	TACTGGTACTGGCCGTGACCCTATTGG
HPV 84	L1__-84A	707	ACTAATGTGCAATATCGTGCGGGTGATTGC
	L1__-84B	708	TTTGGATCTCTGCACCACTACCTGT
	L1__-84C	709	TCAGTCTTTTTACCTTAAGGGG
	L1__-84D	710	GGGCCGCCGCCCAAGCCTAAGGAC
HPV 85	L1__-85A	711	TACTTCTGTAGTTACACACGACACTAGA

TIPO DE HPV	ID DE LA SONDA	SEQ ID NO	SECUENCIA DE LA SONDA
	L1__-85B	712	CTGTAAGCCCGGTGCTGTGCAAACAGGTGAC
	L1__-85C	713	TGATAGGGCAACACCTGGAAGCTGTATT
	L1__-85D	714	TGTGGTTGTTCCACAAAAAAGGATCCA
HPV 86	L1__-86A	715	CCTGTTACTGTTTCCTCCAGCCCTGGAC
	L1__-86B	716	AAACCAGGGGACTGCCCCCATTA
	L1__-86C	717	CTCCACAAGTTTGGAGGATACCTACCGT
	L1__-86D	718	GGTGTTTTGGGAGGTTGACCTT
HPV 87	L1__-87A	719	CAAGACAGGGGATTGTCCACCATTGCAA
	L1__-87B	720	CGAAAAGTTACAGGAAAAACAAGTCC
	L1__-87C	721	CTATTTTTTGAAGGGGGCGTCGTCT
	L1__-87D	722	TAACAAACCCTATTGGCTGCAGCGGG
HPV 94	L1__-94A	723	GGCCGGTGGTGACCAAAACGTTGGTAG
	L1__-94B	724	TGTGCGTCCCTTCTGATGCCTCCACCGCC
	L1__-94C	725	CCATCTCTGTCCGCAAACGCTCGGCGACCG
	L1__-94D	726	GGCCGGTGGTGACCAAAACGTTGGTA

C. Purificación de la muestra a través de la captura de híbridos.

5 Frotis cervicales clínicos, muestras de citología de base líquida y orina, todos ellos han sido sometidos a ensayo con los métodos descritos en el presente documento y se ha determinado que eran compatibles. En principio, se podría utilizar cualquier tipo de muestra.

Una parte alícuota de 50 µl de una muestra se coloca en un pocillo de una placa de hibridación de poliestireno y se mezcla con 25 µl de agente de desnaturalización alcalino (DNR) disponible en Qiagen Gaithersburg, Inc. (Gaithersburg, MD). La placa se sella y se agita para mezclar, a continuación, se incuba a 57,5°C durante 15 minutos con agitación a 900 rpm, para desnaturalizar los ácidos nucleicos en la muestra.

10 Después de la desnaturalización, una mezcla de sondas de purificación, en donde cada una comprende las sondas de purificación preparadas en el Ejemplo 1 en NextGen PD con baja viscosidad, se añade a cada reacción hasta una concentración final de 1 nM. La placa se agita para neutralizar. Se prepara 0,02% de reserva de perlas paramagnéticas sólidas en bloqueador YT, 25 µl de la misma se añade a cada reacción. La placa se cubre entonces con un sellador transparente y se incuba a 57,5°C durante 30 minutos con agitación a 900 rpm.

15 *D. Amplificación*

20 La placa resultante del Ejemplo 1(C) se coloca sobre una rejilla magnética durante 2 minutos. Se decanta el material sobrenadante y luego la placa se seca con papel absorbente limpio con poca pelusa, como Kimwipes® (Kimberly-Clark Worldwide, Inc.). Las perlas se lavan cuatro veces, mediante la adición de 120 µl del tampón de lavado de la amplificación del genoma completo (WGA) (disponible en Qiagen Gaithersburg, Inc. (Gaithersburg, MD)) en cada pocillo, se espera 1-2 minutos, se decanta y se realiza una transferencia. El tampón de lavado se extrae mediante un multicanal de pequeño volumen. A continuación, se añaden 20 µl de mezcla de reacción de WGA (indicada en la Tabla 3 siguiente) a cada pocillo.

Tabla 3

Mezcla de reacción de WGA con mezcla de RXN REPLI-g Midi de QIAGEN	
Reactivos	Rxn (1X)
Tris-HCl, pH 7,5	50 mM
MgCl ₂	15 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 mM
KCl	50 mM
dNTP	4 mM total

Mezcla de reacción de WGA con mezcla de RXN REPLI-g Midi de QIAGEN	
Reactivos	Rxn (1X)
Cebador	250 µM
REPLI-g	0,5 µl/20 µl
*0,5 µl de REPLI-g Midi por 20 µl de reacción *los dNTP y los cebadores se deben agitar bien en vórtex antes de la adición a la mezcla de reacción.	

La placa se agita para mezclar, a continuación, se incuba a 30°C durante 2 horas. El amplicón se puede almacenar a -20°C o la detección se puede llevar a cabo directamente.

E. Genotipificación

- 5 Una parte alícuota de 5 µl del amplicón generado en el Ejemplo 1D, se transfiere a una nueva placa de fondo redondo de 96 pocillos y se mezcla con 10 µl de 0,75 X DNR. La placa se incuba después a 70°C durante 30 minutos para desnaturalizar los ácidos nucleicos.

Después de la desnaturalización, 5 µl de un depósito 5 nM de cada sonda de detección, calentados a 70°C se añaden a cada pocillo y la placa se incuba durante 2 minutos a 70°C. Se añade una parte alícuota de 10 µl de 0,75X diluyente de sonda HC2 (disponible en Qiagen Gaithersburg, Inc. (Gaithersburg, MD)), luego se mezcla en un agitador de placas a 800 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente. Una parte alícuota de 5 µl de una solución de microesferas Luminex® a 1000 cuentas/µl (5000 perlas en total/ensayo) se añade a cada pocillo, a continuación, la placa se incuba a 50°C durante 30 minutos con agitación a 400-450 rpm. Una parte alícuota de 10 µl de una solución de estreptavidina-ficoeritrina (preparada en 10% de suero de cabra en 1X solución salina tamponada con fosfato que contiene 3% de Tween-20) se añade a cada pocillo hasta una concentración final de SA-PE de 400 ng/pocillo). La placa se incuba después a 50°C durante 10 minutos con agitación a 400-450 rpm. Finalmente, la mezcla de reacción se diluye mediante la adición de 150 µl de H₂O a cada pocillo.

Por lo tanto, cada microesfera de Luminex® se conjuga con dos sondas de oligonucleótidos (una en la región E6/E7 y otra en la región L1) que son específicas del tipo de HPV de esa perla. Cada perla específica de un tipo de HPV tiene un marcador fluorescente único. La detección de la diana se consigue mediante la unión de sondas biotiniladas específicas a cada diana capturada. El SA-PE unido a la sonda biotinilada y una señal fluorescente se observan después de la excitación de la ficoeritrina con un láser. El marcador ficoeritrina y el marcador fluorescente de cada perla se miden entonces de forma independiente en un luminómetro. La medición del marcador de la perla indica el genotipo del ácido nucleico diana unido a cada perla. La medición del marcador ficoeritrina se utiliza para determinar la cantidad relativa de diana unida a cada perla. Los datos de la fluorescencia se recompilan entonces para indicar las cantidades relativas de cada ácido nucleico diana presente en la muestra.

Ejemplo 2: Demostración del efecto de la preparación de muestras de captura de híbridos sobre la detección de ácidos nucleicos de HPV.

El siguiente ejemplo muestra el efecto inhibitorio del ADN genómico humano sobre la detección de ácidos nucleicos de HPV, utilizando el método descrito en el Ejemplo 1.

Se mezclaron 0, 10² o 10³ copias de un plásmido que comprendía el genoma de HPV 16 con 0, 50, 100, 200, 1000 o 5000 ng de ADN genómico humano. Un conjunto de muestras se sometió a purificación mediante captura de híbridos, mientras que el otro no. Después de la captura de híbridos, las muestras se amplificaron mediante amplificación del genoma completo y se determinó la presencia o ausencia de HPV 16. Los resultados sin preparación de la muestra de captura de híbridos se muestran en la Fig. 1A, mientras que los resultados con preparación de muestras de captura de híbridos se muestran en la Fig. 1B. Como se puede observar, la preparación de muestras de captura de híbridos elimina de manera eficaz la inhibición de ADN, lo que permite que la amplificación del genoma completo se realice de manera eficaz. Esto demuestra que con métodos convencionales, una amplificación convencional de la diana de HPV se reduce cuando está presente ADN genómico humano extraño, debido a una amplificación excesiva de una diana no deseada.

Ejemplo 3: Detección de infecciones cuádruples.

Las muestras que comprendían una infección cuádruple se sometieron a un ensayo múltiple de 20-plex como se establece en el Ejemplo 1, utilizando sondas de captura de híbridos, de inmovilización y de detección para los tipos de HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 34, 35, 52, 53, 58, 59, 66, 67, 68, 69, 70, 73 y 82. Las muestras sometidas a ensayo tenían una de las siguientes infecciones cuádruples: (1) HPV 6, 11, 16, 18; (2) HPV 31, 33, 45, 34; (3) HPV 35, 52, 53, 58; HPV 59, 66, 67, 68; y HPV 69, 70, 73 y 82. Los resultados se ilustran en la Figura 2. En los métodos descritos anteriormente, con la detección de infecciones cuádruples se pueden detectar simultáneamente de 10² a 10⁷ de cada tipo de HPV en una reacción de 20-plex con buena especificidad y sensibilidad.

Ejemplo 4: Detección con pequeños volúmenes de amplicón.

HPV 16 se sometió a ensayo de acuerdo con el Ejemplo 1, excepto que 1, 2, 5, 7 y 20 μ l de amplicón se utilizaron individualmente. Los resultados se ilustran en la Figura 3A. Los resultados muestran que se requería una pequeña cantidad de amplicón para una detección fuerte de un bajo número de copias. La amplificación es muy fuerte y solo se requiere una pequeña porción de amplicón para saturar el método de detección que se está utilizando. Pequeños volúmenes de amplicón proporcionan una señal fuerte con amplicones con bajo número de copias, así como con un amplicón con un número de copias elevado ($>10^7$).

El proceso se repitió con 0,5 y 5 μ l durante una noche. Los resultados se ilustran en la Figura 3B. Como es evidente, se pueden utilizar eficazmente incluso pequeñas cantidades de amplicón, si la amplificación se realiza durante una noche.

Ejemplo 5: Detección específica.

El procedimiento descrito en el Ejemplo 1 se repitió para una muestra que contenía los tipos de HPV 33 y 58. Se utilizó una sonda de detección idéntica (de consenso para HPV 33 y HPV 58) y una sonda de captura para HPV 33 o HPV 58 se utilizó en presencia de ambos amplicones. Cuando se utilizaba la sonda de captura de HPV 33, solo se detectaba HPV 33 (véase la Figura 4A). Cuando se utilizaba la sonda de detección de HPV 58, solo se detectaba HPV 58 (véase la Figura 4B). Los resultados para cada sonda de captura se ilustran en las Figuras 4A y 4B. Por lo tanto, la detección del amplicón específico solo se producía en la perla de captura correcta, independientemente del hecho de que la sonda de detección se uniera a los dos amplicones.

Ejemplo 6: Sensibilidad de los experimentos múltiples.

Experimentos múltiples para someter a ensayo la sensibilidad de 26 tipos de HPV mediante una repetición de los procesos descritos en el Ejemplo 1 para los tipos de HPV 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 67, 68, 69, 70, 73, 82 y 85. Los resultados se muestran en la Figura 5. Estos resultados muestran la sensibilidad del ensayo con 1000 copias para cada uno de los tipos sometidos a ensayo. Específicamente se logró una S/N superior a 2 para los 26 tipos de HPV.

Ejemplo 7: Especificidad de los experimentos múltiples.

Se realizaron experimentos múltiples para analizar la sensibilidad de los procedimientos descritos para 26 tipos de HPV, mediante una repetición de los procesos descritos en el Ejemplo 1, para muestras que comprendían los tipos de HPV 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 67, 68, 69, 70, 73, 82 o 85. Los resultados se muestran en la Figura 6. Estos resultados muestran que todos los tipos de HR-HPV eran específicos frente a otros tipos hasta 10^6 copias. Como se puede observar, la S/N de todos los tipos de HPV no específicos era menor de 2,0 para cada punto de datos analizado. Con una sola excepción, la S/N de todos los tipos específicos de HPV era aproximadamente 5 o mayor.

Ejemplo 8: Detección de una infección individual con HPV en una muestra clínica.

Los procedimientos descritos en el Ejemplo 1 se llevaron a cabo en una muestra clínica que, por una prueba de referencia, mostraba tener una infección con el HPV de tipo 16. Los resultados se representan en la Figura 7 y muestran una detección exitosa de HPV 16.

Ejemplo 9: Detección de una infección individual con HPV en una muestra clínica.

Los procedimientos descritos en el Ejemplo 1 se llevaron a cabo en una muestra clínica que, por una prueba de referencia, mostraba tener una infección con el HPV de tipo 18. Los resultados se representan en la Figura 8 y muestran una detección exitosa de HPV 18.

Ejemplo 10: Detección de una infección cuádruple con HPV en una muestra clínica.

Los procedimientos descritos en el Ejemplo 1 se llevaron a cabo en una muestra clínica que, por una prueba de referencia, mostraba tener infecciones con los tipos de HPV 16, 51, 59 y 82. Los resultados se representan en la Figura 9 y muestran una detección exitosa de HPV 16, 51, 59 y 82.

Ejemplo 11: Detección de una infección doble con HPV en una muestra clínica.

Los procedimientos descritos en el Ejemplo 1 se llevaron a cabo en una muestra clínica que, por una prueba de referencia, mostraba tener infecciones con los tipos de HPV 18 y 70. Los resultados se representan en la Figura 10 y muestran la detección exitosa de HPV 18 y 70.

Listado de secuencias

- <110> Qiagen Gaithersburg, Inc.
 O'Neill, Dominic
 5 Agarwal, Shuli
 Bashem, Holly
 Nazarenko, Irina
 Virmani, Arvind
- 10 <120> Métodos y composiciones para una purificación y un análisis múltiple específico de secuencia de ácidos nucleicos
 <130> 2912943-073000
- 15 <150> 61/326,067
 <151> 2010-04-20
- <150> 61/299,531
 <151> 2010-01-29
- 20 <160> 726
 <170> PatentIn version 3.5
- 25 <210> 1
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 1
- 35 aaccgaaacc gguaguaua aaagc 25
 <210> 2
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 2
- 45 uuagaaugug uguacugcaa gcaac 25
 <210> 3
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
- 50 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 3
- 55 gguauaugac uuugcuuuc gggau 25
 <210> 4
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
- 60 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
- 65

ES 2 615 728 T3

<400> 4
 5 aguauauaga gaugggauc cauau 25
 <210> 5
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 5
 15 acaacaaacc guugugugau uuguu 25
 <210> 6
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 6
 uuagguguau uaacugucuaa aagcc 25
 30 <210> 7
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 7
 40 gauuccauaa uauaaggggu cggug 25
 <210> 8
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 8
 auguugcacg cacaacaua uauua 25
 <210> 9
 55 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 9
 65 guuccuaaag uaucaggauu acaau 25
 <210> 10

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 10

10 ucccuuuuuu ccuauuaaaa aaccu 25

<210> 11
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 11

guuugggccu guguaggugu ugagg 25

<210> 12
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

30 <400> 12

gucagccauu aggugugggc auuag 25

<210> 13
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

45 <400> 13

uguguuuuau uggugcaaa ccacc 25

<210> 14
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 14

ggugauuguc caccuuaga guuaa 25

<210> 15
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

65

<400> 15
 5 caguuuuca ggauggugau auggu 25
 <210> 16
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 16
 15 gaaaucuuu uucucaagga cgugg 25
 <210> 17
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 17
 caauguguag acauuauaaa cgagc 25
 30 <210> 18
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 18
 40 uuagacauuu auuuauagg gcugg 25
 <210> 19
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 19
 cauaugauaa uccugcauau gaagg 25
 <210> 20
 55 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 20
 65 aauaugauuu acaguuuauu uuuca 25
 <210> 21

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 21

10 auccuuuauu aaauaaaug gauga 25

<210> 22
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 22

cuauuaguac acauaauuau gaaga 25

<210> 23
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

30 <400> 23

gguacaauagg gcuaugaca augau 25

35 <210> 24
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 24

45 gacaaacagu auuacagcau aguuu 25

<210> 25
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 25

gaugguauag auauagugug uaugg 25

60 <210> 26
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 26
 5 gauuaaaauu gcacgaggaa agagg 25
 <210> 27
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 27
 15 acgaugaacu aagauugaau ugugu 25
 <210> 28
 <211> 25
 20 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 28
 acagagguau uagauuuugc auuuu 25
 30 <210> 29
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 29
 40 uuaauuaggu guauaacgug ucaaa 25
 <210> 30
 <211> 25
 <212> RNA
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 30
 agaagaaaaa caaagacauu uggau 25
 <210> 31
 55 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 31
 65 aggaaggugg acaggacguu gcaua 25
 <210> 32

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 32

10 gaaccaacau auuuuauac gcagg 25

<210> 33
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 33

auccauuuu uuccauaccu aauc 25

<210> 34
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

30 <400> 34

ucaggauuac aaauagggg auuuu 25

35 <210> 35
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 35

45 gacacugaaa acucuaauag auaug 25

<210> 36
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 36

aauguauauc aauggauuuu aaaca 25

60 <210> 37
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 37

5 cuauuggaga gcauuggggu aaagg 25

<210> 38
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

15 <400> 38

ggugauuguc cuccauuaga auuaa 25

<210> 39
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

25 <400> 39

uaguauauag ggacgacaca ccaca 25

30 <210> 40
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 40

40 cugaaacca aguguaaaca ugcgu 25

<210> 41
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

50 <400> 41

gcuauuguuu guguauagua uauag 25

55 <210> 42
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 42

65 uccaguugaa aagcaaagac auuaa 25

<210> 43

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 43
 10 uuguaaaugu gaggcgacac uacgu 25
 <210> 44
 <211> 25
 <212> RNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 20 <400> 44
 aagauuuauu aaugggcaca uuugg 25
 <210> 45
 25 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 45
 gcacaaacau cuacuaucan gcagg 25
 35 <210> 46
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 46
 45 caauacagag uauuuagagu aaaau 25
 <210> 47
 <211> 25
 50 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 55 <400> 47
 cuaauaaguu uggauuucca gacac 25
 60 <210> 48
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 48

5 ugguuugggc cuguacagga guuga 25

<210> 49
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 49

15 guacagauaa cagggaaugc auuuc 25

<210> 50
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

25 <400> 50

uaaccgaaaa cgguuugacc gaaaa 25

30 <210> 51
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 51

40 cgaaaaacca cgcaaccugc acgaa 25

<210> 52
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

50 <400> 52

cuuuggaaac cacggugcau gaaau 25

<210> 53
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 53

60 cuuuggacag aaacgaggua uauga 25

65 <210> 54

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 54

10 ucugugagug cacuuugcgu uugug 25

<210> 55
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 55

aauccagcag augcuuauga acaca 25

<210> 56
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

30 <400> 56

uauugaaaaua gggcgaggac agccu 25

35 <210> 57
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

45 <400> 57

cugauaaauag ggaaugcuug ucuau 25

<210> 58
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 58

uuuggaacuu augaaucug uuauu 25

60 <210> 59
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 59

5 gagcagguaa auuaggggag gaugu 25

<210> 60
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 60

15 gcaaacacuu cugcacugca aaccu 25

<210> 61
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

25 <400> 61

gcuaaaccua aacuaaaacg uucuu 25

30 <210> 62
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 62

40 caaaacguaa aaagguuaaa aggua 25

<210> 63
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

50 <400> 63

guguagcuaa cgcacggcca uguuu 25

55 <210> 64
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 64

65 ugcacgaauu gugugaggug cugga 25

<210> 65

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 65

10 uacaacgaag agagguauac aaguu 25
 <210> 66
 <211> 25
 <212> RNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 66
 acgaauagua uauagagaca auaau 25
 <210> 67
 25 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 67

35 ggcauuauca auauucacug uaugg 25
 <210> 68
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 68

45 cuaugagcaa uuaggugaca gcuca 25
 <210> 69
 <211> 25
 50 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 69
 gccagaugga caagcagaac aagcc 25

60 <210> 70
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 70
 5 uaacaguagg acaucccuau uuuuc 25
 <210> 71
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 71
 15 aaaaaaguuu uaguucccaa ggugu 25
 <210> 72
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 72
 uuugaugaua cugaaaccag uaaca 25
 30 <210> 73
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 73
 40 agggauguu uaucuugga uuaua 25
 <210> 74
 <211> 25
 <212> RNA
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 74
 ugcaaaccuc cuauagguga acuu 25
 <210> 75
 55 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 75
 65 aggaugggga caugguagau acagg 25
 <210> 76

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 76

10 uagaagacag cggauauggc aauc 25

<210> 77
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 77

gcuguacaga uugguguaua acagg 25

<210> 78
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

30 <400> 78

auugguuuag aacagcaaug ucaaa 25

35 <210> 79
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 79

45 ucauuuuug gaugaguuu aauc 25

<210> 80
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 80

uuuugguugc agccauuauc agaug 25

60 <210> 81
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 81

5 aauagaggaa gaggacaagg aaaac 25

<210> 82
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 82

15 auggaggaaa uaucagcacg uuuaa 25

<210> 83
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

25 <400> 83

caucacaaaau ugaacauugg aaacu 25

30 <210> 84
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 84

40 ggacauugca acaaacaagc uuaga 25

<210> 85
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

50 <400> 85

auuuuaaaua uuuuaagag gaugc 25

55 <210> 86
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 86

65 aauauccacu acugaaacug cugac 25

<210> 87

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 87

10 caaauguuu aaaauguuu agaua 25

<210> 88
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 88

ugauguguau uaaaaucau gcaca 25

<210> 89
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

30 <400> 89

ucuacaaggc gcaagcgugc aucug 25

35 <210> 90
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 90

45 gaaaacauac caauggauac cuuug 25

<210> 91
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 91

gcccuguggc acgccuuggu uuaua 25

60 <210> 92
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 92
 5 cagauguccg uguggcggcc uagug 25
 <210> 93
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 93
 15 acauugcagg cuaauaaaag ugaug 25
 <210> 94
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 94
 caguacaugc aaauauccag auuau 25
 30 <210> 95
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 95
 40 gagaaauggu gcaaugggca uauga 25
 <210> 96
 <211> 25
 <212> RNA
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 96
 uuuuuaaaag guauaccuaa aaaaa 25
 <210> 97
 55 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 97
 65 uaacagugca auacgauaa uauaa 25
 <210> 98

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 98

10 cagauguccg uguggcggcc uagug 25

<210> 99
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 99

aggccacugu guaccugccu ccugu 25

<210> 100
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

30 <400> 100

uuagaggacu ggcaauuugg ccuua 25

35 <210> 101
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 101

45 cauguuuuaa acugcuuuua ggcac 25

<210> 102
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 102

augcugcaug ccauaaaugu auaga 25

60 <210> 103
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 103
 5 uaaaaacgaa aguuugcagg aggca 25
 <210> 104
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 104
 15 ucagauagug gcuauggcug uucug 25
 <210> 105
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 105
 uuagaaauuu uaaaagugau aaaac 25
 30 <210> 106
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 106
 40 uguaaauggg gaguauuau auuag 25
 <210> 107
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 107
 caccaaaaau gcgaaguagu guugc 25
 <210> 108
 55 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 108
 65 augcauuucc auuugauaaa aaugg 25
 <210> 109

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 109

10 gaaaggacau gguccagauu agauu 25
 <210> 110
 <211> 25
 <212> RNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 110
 uugauuguaa ugacucuaug ugcag 25
 <210> 111
 25 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 111

35 uaccagugac gacacggauu ccgcu 25
 <210> 112
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 112

45 gugguaacac uacgccuaua auaca 25
 <210> 113
 <211> 25
 50 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 113
 gaaauaaaac ugcuuuuagg cacau 25

60 <210> 114
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 114
 5 aggauccaac acggcgaccc uaca 25
 <210> 115
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 115
 15 cuucacugca agacauagaa auaac 25
 <210> 116
 <211> 25
 20 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 116
 agguauuuga auuugcauuu aaaga 25
 30 <210> 117
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 117
 40 gaggccagug ccuucgugc ugca 25
 <210> 118
 <211> 25
 <212> RNA
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 118
 ugguaaucca uauuuuaggg uuccu 25
 55 <210> 119
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 119
 65 uuccuaaggu uucugcauac caua 25
 <210> 120

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 120

10 auccugaaac acaacguuuu gugug 25
 <210> 121
 <211> 25
 <212> RNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 121
 aggacguuag ggacaugug ucugu 25
 <210> 122
 25 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 122

35 ugacgaucca aagcaacgac ccuac 25
 <210> 123
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 123

45 uagacaccuu aaggacaac gaaga 25
 <210> 124
 <211> 25
 50 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 124
 gugugacggc agaauugagc uuaca 25

60 <210> 125
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 125
 5 uacagcagcu guuuuugagc accuu 25
 <210> 126
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 126
 15 uguaggcaau ccuuuuuuu ggguu 25
 <210> 127
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 127
 uuccuaaggu auccgcauau cagua 25
 30 <210> 128
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 128
 40 auaauccuga aacacaacgu uuggu 25
 <210> 129
 <211> 25
 <212> RNA
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 129
 aggauguuag ggauaaugug ucagu 25
 <210> 130
 55 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 130
 65 ccuaacaaau ugccagaccu gugca 25
 <210> 131

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 131

10 ucgguguaug caacuacauu agaaa 25

<210> 132
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 132

uacaaugaaa uacagccggu ugacc 25

<210> 133
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

30 <400> 133

uuguauguca cgagcaauua ggaga 25

35 <210> 134
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 134

45 gaugaaauag augaaccgga ccaug 25

<210> 135
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 135

agcgugagac agcacaggua cuuuu 25

60 <210> 136
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 136

5 agugcuauag auagugaaaa ccagg 25

<210> 137
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 137

15 guaaaagauu gugcaacaau gugua 25

<210> 138
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

25 <400> 138

aaauuuccua augcauuucc auuug 25

30 <210> 139
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 139

40 gaaaagacuu ggugcagauu agacu 25

<210> 140
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

50 <400> 140

gacgaggaug aaggagacaa ugaug 25

55 <210> 141
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 141

65 aagcauauca agcuauugaa cugca 25

<210> 142

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 142
 10 cauguccug acucuaugug cagua 25
 <210> 143
 <211> 25
 <212> RNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 20 <400> 143
 acaccaguac caacauuuac aggca 25
 <210> 144
 25 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 144
 35 cagguucgug uuaguaauuu ugauu 25
 <210> 145
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 145
 45 cacccuucac cauuguaac auuug 25
 <210> 146
 <211> 25
 50 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 55 <400> 146
 auaauccugc uuuugagccu guuga 25
 60 <210> 147
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 147

5 gauccggauu uucuggacau uguuc 25

<210> 148
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

15 <400> 148

ugcaaauguc ugcagaugug uaugg 25

<210> 149
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

25 <400> 149

cuaaacacaa acguaaacgu guguc 25

30 <210> 150
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 150

40 gcaacagaua cagguucaga cuugg 25

<210> 151
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

50 <400> 151

auuuguguac aggagagcg cgaga 25

<210> 152
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

60 <400> 152

uuagucauca uccuguccag gugca 25

65 <210> 153

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 153

10 uauaaaacca ugcaaaaguu gcuug 25

<210> 154
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 154

ccugcagaac ggccauaca auugc 25

<210> 155
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

30 <400> 155

ugcaugccaa aaauguauua aauuu 25

35 <210> 156
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 156

45 gacguauacg aagagaaca caagu 25

<210> 157
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 157

acauugcaag agauuguuuu agauu 25

60 <210> 158
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 158
 5 cuacacugca cuuaguagua gaagc 25
 <210> 159
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 159
 15 gcagcuguuu auggagacac uguca 25
 <210> 160
 <211> 25
 20 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 160
 ggguaucccu accugauccu aauaa 25
 30 <210> 161
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 161
 40 uauaauccug acacacaacg ccugg 25
 <210> 162
 <211> 25
 <212> RNA
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 162
 cuucagaguu auauauuaaa ggcac 25
 <210> 163
 55 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 163
 65 auguauauuc cccuucccca agugg 25
 <210> 164

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 164

10 cacguaguac uaauuuuaca uuguc 25
 <210> 165
 <211> 25
 <212> RNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 165
 cuguauauag ccuacaaag uuuaa 25
 <210> 166
 25 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 166

35 ucuaaacaca aacggaaacg ugugu 25
 <210> 167
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 167

45 uuauagugua uagagacugu acacc 25
 <210> 168
 <211> 25
 50 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 168
 uuuuaugcaa gaguaagaga auuaa 25

60 <210> 169
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 169

5 uauuauagag auuccgugua uggag 25

<210> 170
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

15 <400> 170

ugccuaaaac cucuaugucc aacag 25

<210> 171
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

25 <400> 171

accacaaaau uaugaggaag uugac 25

30 <210> 172
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 172

40 cuccgagaau gaaaaaug aacca 25

<210> 173
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

50 <400> 173

uggacaucca uauuuuaaag uaccu 25

<210> 174
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

60 <400> 174

uuccuaaggu gucugcauau caaua 25

65 <210> 175

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 175

10 uggaugacac ugaaaacucu caugu 25
 <210> 176
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 176

20 gauaauguau cuguggauua uaaac 25
 <210> 177
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 177

30 ugaaucacua uauauaaag guacu 25
 <210> 178
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 178

40 uauucccuu cccaagugg gucug 25
 <210> 179
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 179

50 gugcagcgcc ugcccuacc ucuac 25
 <210> 180
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 179

60 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 180

5 ucuuccagaa aauaguguug uuugu 25

<210> 181
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

15 <400> 181

20 uguauuguuu gccuguuugu auguu 25

<210> 182
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 182

30 ccguuuuguu caaucugcug cugua 25

<210> 183
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 183

40 aagacagcaa cgacaagcgc guagu 25

<210> 184
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

50 <400> 184

aagcggaugu agaaaacagu uauuu 25

55 <210> 185
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 185

65 acggaccagc cgcguaucu agcug 25

<210> 186

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 186
 10 uaugcauagu uugcaacuuc cuugu 25
 <210> 187
 <211> 25
 <212> RNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 20 <400> 187
 gcagagauuu augcauuuca auaua 25
 <210> 188
 25 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 188
 35 guggagacac ggcuuuccac augcu 25
 <210> 189
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 189
 45 aaauaaauua uagaaggcau cgca 25
 <210> 190
 <211> 25
 50 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 55 <400> 190
 ugcauggaaa uguggcuaca auuga 25
 60 <210> 191
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 191
 5 guggaggugu guguuguaag acagu 25
 <210> 192
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 192
 15 cauaagggua cugcaggaac ugcuu 25
 <210> 193
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 193
 aaacgaaagu auauaggcag uccgu 25
 30 <210> 194
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 194
 40 gaguuuuag gaccuagcac ggucc 25
 <210> 195
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 195
 uuauuggcug uggacaucc auau 25
 <210> 196
 55 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 196
 65 uauuccuaaa guaucaggau aucaa 25
 <210> 197

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 197
 10 cuauagguga acacugggcu aaagg 25
 <210> 198
 <211> 25
 <212> RNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 20 <400> 198
 gcuggugacu guccuccuuu ggaau 25
 <210> 199
 25 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 199
 ggauuuuaaa acccuacaaa ccuca 25
 35 <210> 200
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 200
 45 auuuguaaa uaccugauua ccuaa 25
 <210> 201
 <211> 25
 50 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 55 <400> 201
 guaguacuaa ccuaacauug ugugc 25
 60 <210> 202
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

	<400> 202	
5	uucugacuuu agggaguaua uuaga	25
	<210> 203	
	<211> 25	
	<212> RNA	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de ácido nucleico	
	<400> 203	
15	uaugcugcaa cuccuagugg cucua	25
	<210> 204	
	<211> 25	
20	<212> RNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de ácido nucleico	
25	<400> 204	
	uagaugacag uguauuugac cuguc	25
30	<210> 205	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Sonda de ácido nucleico	
	<400> 205	
40	uauggggaca guauguuuuu uuguu	25
	<210> 206	
	<211> 25	
	<212> RNA	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de ácido nucleico	
50	<400> 206	
	gaggaauaug auuuacaauu uauau	25
	<210> 207	
55	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Sonda de ácido nucleico	
	<400> 207	
	cuacccgacc cuacaaacua ccaga	25
65	<210> 208	

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 208

10 aagauauaga aauaagcugu guaua 25

<210> 209
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 209

auagcgacuc uguguauggg gaaac 25

<210> 210
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

30 <400> 210

augauauauu aauaaggugu uuacg 25

35 <210> 211
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 211

45 auauaaugaa gugcaagagg uugac 25

<210> 212
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 212

aggaagaaau agaugaacca gauaa 25

60 <210> 213
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 213
 5 augacacaga aaauucccau guugc 25
 <210> 214
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 214
 15 gauaaugugu caguggauua uaaac 25
 <210> 215
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25
 <400> 215
 gggaacauug ggcuaaggu acugc 25
 30 <210> 216
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 216
 40 uguccuccau uagaacuagu aaaua 25
 <210> 217
 <211> 25
 <212> RNA
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 217
 50 gaaacuuaua uauaaaaggu acuaa 25
 <210> 218
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 218
 uauucccau caccuagugg gucua 25
 65 <210> 219

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 219

10 caucugccau uacaugucag aagga 25

<210> 220
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 220

uaugaaaau uaaaguuug gaaug 25

<210> 221
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

30 <400> 221

guuuuuacuu gcuuuaaua cacua 25

<210> 222
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 222

45 acaagaaaau ucguuaaaau gcuau 25

<210> 223
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 223

caagggagca uggucuuaaa acaau 25

<210> 224
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

65

<400> 224
 5 gcagguacag uguguauauu gcaag 25
 <210> 225
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 225
 15 gugccgcaac ccgaaauuga ccuac 25
 <210> 226
 <211> 25
 20 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 226
 ggacuaugaa caauugaca gcuca 25
 30 <210> 227
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 227
 40 guaauguau agugcagcua gcugu 25
 <210> 228
 <211> 25
 <212> RNA
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 228
 guacagggug guuuucagua gaagc 25
 <210> 229
 55 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 229
 65 agaacagccc guugcaagac auaac 25
 <210> 230

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 230

10 auacugaagu ggaacucuu acgcc 25

<210> 231
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 231

agugugugua gucagggggg gucaa 25

<210> 232
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

30 <400> 232

uguggcaggc ucuguagcag aaagu 25

35 <210> 233
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 233

45 auuuaucaaa aauggugcaa ugggc 25

<210> 234
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 234

ggcaaaauau guaaaagacu gugca 25

60 <210> 235
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 235

5 gacagcaaug ggaauccugu auaug 25

<210> 236
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

15 <400> 236

ugguccagau uagauuugga ggagg 25

<210> 237
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

25 <400> 237

aucuaccugg cauuggacca gaaau 25

30 <210> 238
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 238

40 guuugugcuu ugcgugugug ugugu 25

<210> 239
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

50 <400> 239

ccuuugauaa uccugcauau gaacc 25

55 <210> 240
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 240

65 guacuaguga cagcaaggua uaucu 25

<210> 241

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 241
 10 gaaacagcau guuuuuuuuu cuucg 25
 <210> 242
 <211> 25
 <212> RNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 20 <400> 242
 acaacacauc cugccuccua cgcuu 25
 <210> 243
 25 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 243
 aauaaaacug cuguuaggca cauau 25
 35 <210> 244
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 244
 45 cacuugggcc ugaagaaaag caaaa 25
 <210> 245
 <211> 25
 50 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 55 <400> 245
 guguaauaaa gccaugcgug guaau 25
 60 <210> 246
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

	<400> 246	
5	aaauugacuu gcaaugcuac gagca	25
	<210> 247	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Sonda de ácido nucleico	
	<400> 247	
15	uggacaggcu acguguuaca gaauu	25
	<210> 248	
	<211> 25	
20	<212> RNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de ácido nucleico	
25	<400> 248	
	agcagcccau uaggagacau uacaa	25
30	<210> 249	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Sonda de ácido nucleico	
	<400> 249	
40	gauuacugga caguuaucgg gacag	25
	<210> 250	
	<211> 25	
	<212> RNA	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de ácido nucleico	
50	<400> 250	
	uguggaagca acguugcagg uagau	25
	<210> 251	
55	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Sonda de ácido nucleico	
	<400> 251	
	acagccacua gaggauvcua aaaua	25
65	<210> 252	

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 252
 10 guccagauua gauuuggagg aggaa 25
 <210> 253
 <211> 25
 <212> RNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 20 <400> 253
 ugccaggaga aaauacuaga cuguu 25
 <210> 254
 25 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 254
 ucaaccuggc auuggaccag uaaua 25
 35 <210> 255
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 255
 45 acaagccaau augugcugcu aaug 25
 <210> 256
 <211> 25
 50 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 55 <400> 256
 ugugugugug ucuuguguug uguug 25
 60 <210> 257
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 257

5 acaugcaaag cugcugguac auguc 25

<210> 258
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

15 <400> 258

uggagugggu ugguauauu uuugg 25

<210> 259
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

25 <400> 259

gaacuugaaa ugcagccuuu acuuu 25

30 <210> 260
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 260

40 ugucuucauc uuaugcaau guuac 25

<210> 261
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

50 <400> 261

uggggauuac uauuuguggc ccuau 25

<210> 262
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

60 <400> 262

aaacgccgua aacguauacc cuauu 25

65 <210> 263

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 263

10 ucuuccucuu ccucuucagc caaac 25
 <210> 264
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 264

20 ccgaaaacgg uacauauaaa agcac 25
 <210> 265
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 265

30 gacaccagag gaaaaacagu uacac 25
 <210> 266
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 266

40 augagcaauu gaacagcuca gagga 25
 <210> 267
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 267

50 caauggcguc accugaaggu acaga 25
 <210> 268
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

60 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 268
 5 uaaaacgaaa guauuuaggc agucc 25
 <210> 269
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 269
 15 cagcggguau ggcaauacuu uggaa 25
 <210> 270
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 270
 acacagucac uuuugguuac aaccg 25
 30 <210> 271
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 271
 40 gaaaggacau gguccagauu agauu 25
 <210> 272
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 272
 cgugccagga gaaaauucua gacug 25
 55 <210> 273
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 273
 65 uacaagugug uaaagcaaag gcaug 25
 <210> 274

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 274

10 uaaaggcaca uggaagugc auaug 25
 <210> 275
 <211> 25
 <212> RNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 275
 guauuuauug ucccgcacucu guguc 25
 <210> 276
 25 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 276

35 gaaauaccua ugcaaacauu ugcug 25
 <210> 277
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 277

45 cacagaccug ccuuuacaac acgua 25
 <210> 278
 <211> 25
 50 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 278
 gguggugugc guuuuaguag gcuug 25

60 <210> 279
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 279

5 agaaguggca aacaaauagg ugcuc 25

<210> 280
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 280

15 gauggccuau augauuuua ugcaa 25

<210> 281
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

25 <400> 281

uucccuauuu ucuugcagau ggcgg 25

30 <210> 282
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 282

40 gcuuagagga caaauacaga uaugu 25

<210> 283
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

50 <400> 283

uguaugacug uauguugug uaug 25

<210> 284
<211> 25
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 284

60 ccgaaaacgg uacauauaaa aggca 25

65 <210> 285

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 285

10 cucagaggau gaggaugagg augaa 25

<210> 286
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 286

gcgccacag caagcuagac aagcu 25

<210> 287
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

30 <400> 287

gcguaaacag uaacgugccc acucu 25

35 <210> 288
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 288

45 gcaaguacaa acagcacaug cagau 25

<210> 289
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 289

acagacguug caaaaacuaa aacga 25

60 <210> 290
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 290
 5 augaauaugu gccaguggau aaagc 25
 <210> 291
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 291
 15 ugaagggggu gauuggaaac ccauu 25
 <210> 292
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 292
 ggauaacgac gaggacaaag aaaac 25
 30 <210> 293
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 293
 40 uguaagcaa aagcauguag ugcaa 25
 <210> 294
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 294
 guccugacuc ugugucuagu accug 25
 <210> 295
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 295
 60 guauccaca gaccaggaaa acgac 25
 <210> 296

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 296

10 guuugcgcuu ugcuuuugug uuugu 25
 <210> 297
 <211> 25
 <212> RNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 297
 auaggccugc auuuacuaca cguag 25
 <210> 298
 25 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 298

35 gauauaaguc cuauugcaca ggcug 25
 <210> 299
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 299

45 aggcgccgua aacguauucc cuauu 25
 <210> 300
 <211> 25
 50 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 300
 cuaccuccaa caccuguuuc aaagg 25

60 <210> 301
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 301
 5 uucuaugugg uuuuacuuac gcagg 25
 <210> 302
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 302
 15 auaaaccuua uugguugcaa cgugc 25
 <210> 303
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 303
 acgcgugguu gcauaaacua aggug 25
 30 <210> 304
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 304
 40 uaauaaggug cggaaaugc caaaa 25
 <210> 305
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 305
 gacaacucag aggaugagga ugaaa 25
 <210> 306
 55 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 306
 65 agaagauggc ugauucaggu aaug 25
 <210> 307

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 307

10 cgggaugguu uaauguagaa gccau 25

<210> 308
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 308

ugggggauuu uauugauaa gcaca 25

<210> 309
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

30 <400> 309

aaugcagaca augaggcuau acgug 25

35 <210> 310
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 310

45 gauauggcaa uacugaagug gaaac 25

<210> 311
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 311

uagugggucc aguagcauuu caaau 25

60 <210> 312
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 312
 5 uuaacagag gacgacgaca agгаа 25
 <210> 313
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 313
 15 aagccuugca guaucacgau ccaaa 25
 <210> 314
 <211> 25
 20 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 314
 uguugcaacc uccuccaccc uuaga 25
 30 <210> 315
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 315
 40 gccucuggca gacuuuuauu uucaa 25
 <210> 316
 <211> 25
 <212> RNA
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 316
 aacagguuaa gguuguagac ccugc 25
 <210> 317
 55 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 317
 65 cagcacagug acuugcauaa ugcuc 25
 <210> 318

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 318

10 uacuagaagu ggcaaacgua uaggu 25

<210> 319
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 319

aaagguauac cugccccug ugucu 25

<210> 320
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

30 <400> 320

aaaguuucag guuugcaua caggg 25

35 <210> 321
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 321

45 cuguuguaga uacuacuaga agcac 25

<210> 322
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 322

uuuuggcuuc cugcaggcaa cuugg 25

60 <210> 323
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 323
 5 ugcacacaca uuuuuuaccc acccu 25
 <210> 324
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 324
 15 gaaaacgguu caaccgaaaa cgguu 25
 <210> 325
 <211> 25
 20 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 325
 gaccaguugu gcaagacguu uauc 25
 30 <210> 326
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 326
 40 acugcuggac acaugcaug gaaga 25
 <210> 327
 <211> 25
 <212> RNA
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 327
 gaccuguag gguuacauug cuaug 25
 <210> 328
 55 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 328
 65 agacagcuca gaaugagg uggac 25
 <210> 329

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 329
 10 guugcugugg augugacagc aacgu 25
 <210> 330
 <211> 25
 <212> RNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 20 <400> 330
 cggacgauuc agguacagaa aauga 25
 <210> 331
 25 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 331
 cauuaugcga cugugcagga ccuaa 25
 35 <210> 332
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 332
 45 acagc caaaa aagguaaagc gacgg 25
 <210> 333
 <211> 25
 50 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 55 <400> 333
 gaaaaugggg gagaugguca ggaaa 25
 60 <210> 334
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 334
 5 gaggacgagg aagauggaag caaua 25
 <210> 335
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 335
 15 ggacgacag uuauauguuc uccug 25
 <210> 336
 <211> 25
 20 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 336
 cuacuacaua caccgccgca cagac 25
 30 <210> 337
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 337
 40 cuauggaac acccuuagu ccugu 25
 <210> 338
 <211> 25
 <212> RNA
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 338
 acgccguaaa cguauuccu uauuu 25
 <210> 339
 55 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 339
 65 uagcgacagc acaguauaug ugccu 25
 <210> 340

<211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 340
 10 caggcuuugg ugcuaugaau uuugc 25
 <210> 341
 <211> 25
 <212> RNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 20 <400> 341
 cugugguaga uaccacacgc aguac 25
 <210> 342
 25 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 342
 35 gaguaaccua agguacacaca ccugc 25
 <210> 343
 <211> 25
 <212> RNA
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 343
 45 ccacaccua cauauuuccu ucuua 25
 <210> 344
 <211> 28
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 55 <400> 344
 tgtatggtgc aaacggccgt tatcagag 28
 60 <210> 345
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 345
5 acattgcatg aactgcggt catc 24
<210> 346
<211> 28
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
10 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico
<400> 346
15 tctactgtgc agaaacaccg gaatagga 28
<210> 347
<211> 31
20 <212> DNA
<213> Secuencia artificial
<220>
25 <223> Sonda de ácido nucleico
<400> 347
tacgaaacag ctgactacaa ctgaactaca a 31
30 <210> 348
<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
35 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico
<400> 348
40 tctggcatt ggagggggag ctgtcagtac 30
<210> 349
<211> 26
<212> DNA
45 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Sonda de ácido nucleico
50 <400> 349
cagctgacta caactgaact acaagc 26
55 <210> 350
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
60 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico
<400> 350
65 ggctatccat atgcagcctg cgcgtgc 27
<210> 351

<211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 351

10 caagacatct tagacgtgct aattcgg 27

<210> 352
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 352

caagacattt tagacgtgct aattcgg 27

<210> 353
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

30 <400> 353

ggtaaaacat atactaacca aggcgcgg 28

35 <210> 354
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 354

45 ggtaaaacat atactaacca aggcacgg 28

<210> 355
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 355

acagctagaa ctttattga attatgtg 28

60 <210> 356
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 356

5 taacagcatt ttacaacag ctgaggtgct g 31

<210> 357
<211> 28
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

15 <400> 357

agcgtgtgta aagtgttag aatttat 28

<210> 358
<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

25 <400> 358

tgcagaagct atgtccatgg gtgcacagga 30

30 <210> 359
<211> 31
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 359

40 gctttgtgt agaaattgtg gaatacctt g 31

<210> 360
<211> 26
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

50 <400> 360

ggcagcattt gcacttagag aattat 26

55 <210> 361
<211> 28
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 361

65 gtgtgcctgt tgcttagaac tgcaaggg 28

<210> 362

<211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 362

10 actaaagcac atattgggaa aggcacgc 28
 <210> 363
 <211> 31
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 363
 ggtgacacag acggagacat cagacaacta c 31
 <210> 364
 25 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 364

35 cagacatttt atgcacaaa aaagaact 28
 <210> 365
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 365

45 agttgtatg gaacaacatt agaacagcaa t 31
 <210> 366
 <211> 29
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 366
 cataaagtta ccagatttat gcacagagc 29
 <210> 367
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 367

5 cgatgatgt ctgttgacg atcatca 27

<210> 368
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

15 <400> 368

gctacctgat ctgtgcacgg aactgaaca 29

<210> 369
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

25 <400> 369

gcaagacagt attggaactt acag 24

30 <210> 370
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 370

40 ccgagcacga caggaacgac tocaacgacg c 31

<210> 371
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

50 <400> 371

agagaacgac ccagaacgct acatgagc 28

<210> 372
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

60 <400> 372

tgcaattgt gacctaagag tagtatatag ag 32

65 <210> 373

<211> 32
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 373

10 acgttcgagt gctggagcag atgtaatgg aa 32
 <210> 374
 <211> 31
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 20 <400> 374
 tccttggtgt gccatcagtg tgctgcacag t 31
 <210> 375
 25 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 375
 35 aactgcatg cagtgccgggt caac 24
 <210> 376
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 376
 45 gcgtgtattg cagacgagcg cttcagac 29
 <210> 377
 <211> 29
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 55 <400> 377
 gcgtgtattg cagacgagcg cttcagac 29
 60 <210> 378
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 378

5 agcgctttca gacgctgatg tatt 24

<210> 379
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

15 <400> 379

agcgctttca gacgctgatg tatt 24

<210> 380
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

25 <400> 380

gactgcata ttctgcgcca aagtgc 26

30 <210> 381
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 381

40 gccaaagtgc tgaccacagc ggagctat 28

<210> 382
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

50 <400> 382

actgcagggc attgtgcgac gctgaagca c 31

55 <210> 383
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 383

65 tgcatagctg gctactggag agggagctgt c 31

<210> 384

<211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 384

10 cagcccagaa ctggcagcat ttg c 25
 <210> 385
 <211> 28
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 20 <400> 385
 cgctgcttat tgttgaagg cataaagc 28
 <210> 386
 25 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 386
 35 gtgccacaag ccactgtca gagagg 26
 <210> 387
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 387
 45 caaaatttct ggatactgga gagggagttg c 31
 <210> 388
 <211> 31
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 55 <400> 388
 gcaccatctt tgtgaggtac aagaacatc g 31
 60 <210> 389
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 389

5 caagaaggaa ttatccagct cagagg 26

<210> 390
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

15 <400> 390

gactggtata tagggaggac agccca 26

<210> 391
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

25 <400> 391

cacaacgtcc actgagacag cagtataat 29

30 <210> 392
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 392

40 ctgctgccc tacaacagat gcttatggc 30

<210> 393
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

50 <400> 393

ctactgcaaa ggtcagttaa cagaaa 26

55 <210> 394
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 394

65 ctactgcaaa ggtcagttaa cagaaaca 28

<210> 395

<211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 395

10 ttgacaaaca aaggtatatg tgattg 27
 <210> 396
 <211> 26
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 20 <400> 396
 aaaaagaaac gattccacaa catagg 26
 <210> 397
 25 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 397
 35 accacttaac cagtgctgaa gcgatgca 29
 <210> 398
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 398
 45 gcatacagta gaacaagaaa caggactact g 31
 <210> 399
 <211> 28
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 55 <400> 399
 cctgccaacg tggaccga caacgtgc 28
 60 <210> 400
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 400

5 gccagtgtag taaccgggga aacacc 26

<210> 401
<211> 31
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

15 <400> 401

ctgtgtttgc ggttctatc taaaattagt g 31

<210> 402
<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

25 <400> 402

cacaacattg aactacagtg cgtggaatgc 30

30 <210> 403
<211> 31
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 403

40 attattctgt atatggacat acattagaac a 31

<210> 404
<211> 31
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

50 <400> 404

attattctgt atatggaaat acattagaac a 31

55 <210> 405
<211> 29
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 405

65 tgtaaaaacg ccatgagagg acacaagcc 29

<210> 406

<211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 406

10 acacaacatt gaactacagt gcgtgga 27
 <210> 407
 <211> 27
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 407
 acaccacatt gaactacagt gcgtgga 27
 <210> 408
 25 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 408

35 attattcgct atatggagaa acattagaac a 31
 <210> 409
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 409

45 caggatataa atctaaaaca tattc 25
 <210> 410
 <211> 25
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 410
 caggatgtaa atctaaaata tattc 25

60 <210> 411
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 411
 5 atctgcaaat gcaaatcat atacctcag 29
 <210> 412
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 412
 15 atctgcaaat acaaagtcac atacctcag 29
 <210> 413
 <211> 29
 20 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 413
 cagccttatg tgaagaggtc aacatttca 29
 30 <210> 414
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 414
 40 gcaggacatt gtgtagatc tgaaccaac g 31
 <210> 415
 <211> 30
 <212> DNA
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 415
 cacacgctga cctattagtg ttagaagacc 30
 <210> 416
 55 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 416
 65 agaaggccag ccatatggag tatgcatg 28
 <210> 417

<211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 417

10 gaagaaaaaa aacgattcca taacatcgg 29
 <210> 418
 <211> 32
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 418
 acagagcaca cacattgaca tacgtaaatt gg 32
 <210> 419
 25 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 419

35 tgcagacgac cactacagca aaccgagg 28
 <210> 420
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 420

45 gcagacgacc actacagcaa accgagg 27
 <210> 421
 <211> 30
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 421
 ccagagaaa aattaagaca cctaaatagc 30

60 <210> 422
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 422
 5 aagagaaacc caagtataac atcagatatg cg 32
 <210> 423
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 423
 15 ctaacacgaa gagaaaccca agtataacat c 31
 <210> 424
 <211> 28
 20 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 424
 caggccagga ccctgtatga actgtgtg 28
 30 <210> 425
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 425
 40 aagacgtcc taaaaacagc tgaggactg 30
 <210> 426
 <211> 28
 <212> DNA
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 426
 cgcatgtcca cggtgcctgg acctgcac 28
 55 <210> 427
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 427
 65 gcacttaaca ggcgagagg tgctcgcg 28
 <210> 428

<211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 428

10 gtatacagtg gagaaagaaa ctggactact t 31
 <210> 429
 <211> 28
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 429
 gtacagcaga cacaggtaga acacggac 28
 <210> 430
 25 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 430

35 ctttgactac gcagcatatg cagatactgt 30
 <210> 431
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 431

45 cagtgttga tttgtgcatt agatgc 26
 <210> 432
 <211> 26
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 432
 atcaccagtg gaaaaagtac agcata 26
 <210> 433
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 433
 5 gcacatcctg tctgtgtgta attcgac 27
 <210> 434
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 434
 15 gaaaaacggt aagtactgca gaggttt 27
 <210> 435
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 435
 taagtcaatt ctggacgtgc tgatacg 27
 30 <210> 436
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 436
 40 ccacctgtgg tacatgtagt cggaagg 27
 <210> 437
 <211> 21
 <212> DNA
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 437
 gcattacagg atggcgcgct t 21
 <210> 438
 55 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 438
 65 ccattgaacc cagcagaaaa acg 23
 <210> 439

<211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 439

10 gtagagagct cggcagagga ccttagaaca c 31
 <210> 440
 <211> 30
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 440
 gaagcttga acgttctat gcacaatata 30
 <210> 441
 25 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 441

35 caaaaattag agagtataga cgttatagca gg 32
 <210> 442
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 442

45 atgcgcta at tgctggcaac gtacacgac 29
 <210> 443
 <211> 28
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 443
 gaggatccag caacacgacc cggaccc 28

60 <210> 444
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 444
 5 ggctgcagtg tgtgcagtgc aaaaaagagc 30
 <210> 445
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 445
 15 ccatatggcg tgtgtattat gtcctacgc 30
 <210> 446
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 446
 gatgaggagg atacagatgg tgtggaccg 29
 30 <210> 447
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 447
 40 gaggatccag cgacacgacc ccgg 24
 <210> 448
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 448
 aggctgcagt gtgtgcagtg caaaaaagag c 31
 55 <210> 449
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 449
 65 aggctgcagt gtgtgcagtg taaaaagag c 31
 <210> 450

<211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 450

10 tgtgcagtgc aaaaaagagc tacaacgaag a 31
 <210> 451
 <211> 32
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 451
 ggaaaacatt agaagagagg gtaaaaaaac ca 32
 <210> 452
 25 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 452

35 ggaaaacatt agaagagagg gtaagaaaac ca 32
 <210> 453
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 453

45 ggaaaacatt agaagagagg gtaaaaagac ca 32
 <210> 454
 <211> 32
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 454
 ggaaaacatt agaagagagg ttaaaaaaac ca 32
 60 <210> 455
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 455
 5 gaaaacatt agaagagagg gtcgaaaaac ca 32
 <210> 456
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 456
 15 tatataattt tgcataata gatctaagag 30
 <210> 457
 <211> 27
 20 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 457
 gcaagaaggc attgacagcg tcagagg 27
 30 <210> 458
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 458
 40 gtatagagac gggatccgt atgg 24
 <210> 459
 <211> 27
 <212> DNA
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 459
 atggataga gacgggtatc cgtatgg 27
 55 <210> 460
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 460
 65 gggggcaatg tctgctactg aacccac 28
 <210> 461

<211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 461

10 gcctttgca agaagacggt gtgtaca 27
 <210> 462
 <211> 31
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 462
 gcttgtgcac tgtgctaga actgcacggg c 31
 <210> 463
 25 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 463

35 acggctatgt gtgtatagca cgcacacagg 30
 <210> 464
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 464

45 gggggcaatg tctgctactg aac 23
 <210> 465
 <211> 28
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 465
 gacggtgtgt acagcagata tttatgca 28
 60 <210> 466
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 466

5 taaattacag aatacctgga agggctg 27

<210> 467
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

15 <400> 467

ccacctgtgg tacatgtaac cggaacg 27

<210> 468
<211> 29
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

25 <400> 468

ttgcaaaaaa gaactaacac gtgctgagg 29

30 <210> 469
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 469

40 agtgtatagg gatgatttc cttatgc 27

<210> 470
<211> 26
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

50 <400> 470

aacatctaga gaacctagag aatcta 26

55 <210> 471
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 471

65 gaactaacac gtgctgaggt atataat 27

<210> 472

<211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 472

10 gcaataaaca ccatctgcaa tggatgacc 29
 <210> 473
 <211> 36
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 473
 cctgtaaca cgccatgaga ggaacaacc caacgc 36
 <210> 474
 25 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 474

35 gtatgcagcg tgtctgaaat gcattca 28
 <210> 475
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 475

45 gaacattaga ggctgaaacc aagacacc 28
 <210> 476
 <211> 27
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 476
 catgagctgc tgatagctg ttataga 27

60 <210> 477
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 477

5 cttgtgtgct acgagcaatt acctgactcc ga 32

<210> 478
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

15 <400> 478

aacattagag gctgaaacca agacacc 27

<210> 479
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

25 <400> 479

ccgtagggtc agcaaagcac actcatctat 30

30 <210> 480
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 480

40 gcagcaaacc gttaagtata cagg 24

<210> 481
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

50 <400> 481

agcaaaccgt taagtataca ggaaaaggag c 31

<210> 482
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

60 <400> 482

gctacatgaa ctactgctgg gcgactgtc c 31

65 <210> 483

<211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 483

10 tgtggacctg gacgacctgc accta 25

<210> 484
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 484

acggcggtag cagcactcat gcttt 25

<210> 485
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

30 <400> 485

ggaaaaggag tatcaggtag agagggg 27

35 <210> 486
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 486

45 gattccatat tcagcaatac acaggaa 27

<210> 487
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 487

gatcccatat tcagcaatac acaggaa 27

60 <210> 488
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 488

5 caaaaaggaa cttacaagtt tagagc 26

<210> 489
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

15 <400> 489

agtatataga aacaattggc catatgc 27

<210> 490
<211> 28
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

25 <400> 490

ccggagtatg gggcaacatt agaaagta 28

30 <210> 491
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 491

40 gtatggggca acattagaaa gta 23

<210> 492
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

50 <400> 492

tatatagaaa caattggcca tatgc 25

<210> 493
<211> 32
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

60 <400> 493

attagtatat agaacaatt ggccatagc ag 32

65 <210> 494

<211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 494

10 cggtaaatat ataaagcaca ccagtgcca 30

<210> 495
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 495

cagtgcaaga aatatgttc aggacacaga 30

<210> 496
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

30 <400> 496

aagtttgccc tgcgtgcagt gcaaaaaaa 29

35 <210> 497
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 497

45 cattcacagt acagcagcag acgtccgaac 30

<210> 498
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 498

gcagaaggca actacaacgg acagagg 27

60 <210> 499
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 499
 5 tcaagaaaca caagtttaag taactatgca 30
 <210> 500
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 500
 15 cgtccgagcg gtggagcagc tgctgatggg c 31
 <210> 501
 <211> 31
 20 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 501
 gagtttggtg tgccaccagt gtgctacata c 31
 30 <210> 502
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 502
 40 gagtttggtg tgccaccagt gtg 23
 <210> 503
 <211> 26
 <212> DNA
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 503
 acgtccgagc ggtggagcag ctgctg 26
 <210> 504
 55 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 504
 65 cccatagga atggcgcgat ttccaat 28
 <210> 505

<211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 505

10 atagtatata gaaacgggga gccatagc 29

<210> 506
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 506

ataaatataa atatgcatgg accacggccg 30

<210> 507
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

30 <400> 507

ctcacaagag aacctgcat ctctact 27

35 <210> 508
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 508

45 acaagtataa atataaat gcatggacca cg 32

<210> 509
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 509

gtttgctgca tgtgcctgct gtttgaaat 30

60 <210> 510
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 510

5 tagacaccgg aacgccagtt acagagcaac 30

<210> 511
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

15 <400> 511

agaagaata attacagaag gcaggcg 27

<210> 512
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

25 <400> 512

acgatactgg acgtattcgg gctacgg 27

30 <210> 513
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 513

40 gtcaggaaaa ggaatatcag gtgcagacag g 31

<210> 514
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

50 <400> 514

atgagagggga cgggtttggt gtgcag 26

<210> 515
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

60 <400> 515

aacctggact gtgtgttttg ccaacgtgg 29

65 <210> 516

<211> 32
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 516

10 gtataggcga tatagacaat cagtatatgg ca 32
 <210> 517
 <211> 29
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 517
 actttagacc tgaaccaac aaccgaaat 29
 <210> 518
 25 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 518

35 acaaagctga ttaagagtg atagaagagt 30
 <210> 519
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 519

45 ccattgcag cgtgcgcat ttgctta 27
 <210> 520
 <211> 30
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 520
 aaactaggcg acacctggaa agggcgctgc 30
 <210> 521
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 521
 5 gtcagtgta caggaccaga catcaacaat 30
 <210> 522
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 522
 15 gctggggcca gcaaatccta ccaattgtt t 31
 <210> 523
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 523
 cgcagcgtgc ttgtcagag aagctaaagt ac 32
 30 <210> 524
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 524
 40 gcggcgtgg caatattgt gcttcgacc a 31
 <210> 525
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 525
 ccacaagtaa aggacatagt gttggag 27
 <210> 526
 55 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 526
 65 ggtggtggac gacaaaaaa ggttcat 28
 <210> 527

<211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 527

10 gcctggtggg cccgtgttc gcaacaact 30

<210> 528
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 528

ccactggcac agctgtatat acgatgcat 30

<210> 529
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

30 <400> 529

tggtgctgtgc caggaatacg aggtggagtt cgacg 35

<210> 530
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 530

45 aggaagaatt aacggaagc gaagtgc 27

<210> 531
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 531

gtaaaggaat tactaattgt ttggagg 27

<210> 532
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

65 <400> 531

<400> 532
 5 cctatgcaac acactggaca catcactgc 29
 <210> 533
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 533
 15 gttagaaaa ctaacaaata gcaatatat 29
 <210> 534
 <211> 31
 20 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 534
 ctgtattgct atgaggaatt aaacaactca g 31
 30 <210> 535
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 535
 40 gacctatgca acacctgga cacatcactg c 31
 <210> 536
 <211> 27
 <212> DNA
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 536
 ctaaaggat tattactggt ctggaaa 27
 <210> 537
 55 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 537
 65 caagacacag gcgtatcatt ggcacactt 29
 <210> 538

<211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 538

10 ctgcatatgg tggattaaa tctgcat 27
 <210> 539
 <211> 27
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 539
 ttaaggaat tattgctggt gtggaga 27
 <210> 540
 25 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 540

35 gggaattatt gctggtgtgg agatttgg 28
 <210> 541
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 541

45 gagcatatga tacacgcaa tctgcac 27
 <210> 542
 <211> 24
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 542
 atattgcacc aaggagctta caac 24
 60 <210> 543
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 543
 5 ggcagctgcc ccatggtgta tgtgcaccg 29
 <210> 544
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 544
 15 cggccgcacg cggacatcc aggat 25
 <210> 545
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 545
 cgtgtggtgt gtgctatcgt gcagttagg 29
 30 <210> 546
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 546
 40 gtacgcggca ttagcagtaa cagtagag 28
 <210> 547
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 547
 cgagtgacc tctgttatt gttcaattcg t 31
 <210> 548
 55 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 548
 65 gcacctctg ttattgttca attcgtc 27
 <210> 549

<211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 549

10 gtgctgctgt ttctgcacca aacagc 26
 <210> 550
 <211> 31
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 550
 cgtgttctgc accaaacagc tgaccgtagc c 31
 <210> 551
 25 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 551

35 cagctgaccg tagccgaatt gactgc 26
 <210> 552
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 552

45 ctggagaggg tgtgtgctt attgctggac ac 32
 <210> 553
 <211> 30
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 553
 cgatgctgat ttgatgatc cagataccca 30
 60 <210> 554
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 554
 5 tcagttccaa ctccaggcag tcatgtt 27
 <210> 555
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 555
 15 caagcgcgcc gctgttcgg ggaccacgc 29
 <210> 556
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 556
 tcctgacct ttgggatgt ggatctcagt 30
 <210> 557
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 557
 40 ccccaaactt tctaattcca agatggatat t 31
 <210> 558
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 558
 agcagaatgc gtcaccgggt gattgt 26
 <210> 559
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 60 <400> 559
 tctagagctt attactgcac ctatacaag 29
 65 <210> 560

<211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 560

10 gttgtacatt aaagtgaca gtcagagcgg c 31
 <210> 561
 <211> 28
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 20 <400> 561
 aacagtgtac taatacacct gtacaggc 28
 <210> 562
 25 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 562
 35 tcctattgac atatgtggca ctacatgt 28
 <210> 563
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 563
 45 tataattaag ggtagtggaa atcgcacgt 29
 <210> 564
 <211> 24
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 55 <400> 564
 gctgccccta aacgtaagcg cgcc 24
 60 <210> 565
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 565
 5 ggaacccacc tgacagggc gattgcc 28
 <210> 566
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 566
 15 caacggtggg gggcgagacg ttgta 26
 <210> 567
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 567
 taccaatatg tgctgtgtg ttcctct 28
 30 <210> 568
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 568
 40 gctcccctg ccactacgta tgacgcc 27
 <210> 569
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 569
 ttcacccctg ttgacccca ctacacag 28
 <210> 570
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 570
 60 agtgggggt atgggtgtaa tctggtcag 30
 65 <210> 571

<211> 33
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 571

10 gggtacacaa tgttcaaata cctctgtaca aaa 33
 <210> 572
 <211> 31
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 20 <400> 572
 tgttcccctt gatattgtg gaactgtctg c 31
 <210> 573
 25 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 573
 35 aacatccaga ctactgcag ttgga 25
 <210> 574
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 574
 45 atttacaat ccagatacac agcggctg 28
 <210> 575
 <211> 25
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 55 <400> 575
 agcaaatgca ggtgtggata ataga 25
 60 <210> 576
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 576

5 tcccatgta acaatgtgc agtaaatcca 30

<210> 577
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

15 <400> 577

gcaggtggtg gcaataagca ggata 25

<210> 578
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

25 <400> 578

ggcctgtgct ggagtggaaa ttggc 25

30 <210> 579
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 579

40 ccatgccgcc acgtctaag ttctg 26

<210> 580
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

50 <400> 580

gtctcctgta cctgggcaat atgatg 26

<210> 581
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

60 <400> 581

cctgcaatag ttgtgcatgg ggata 25

65 <210> 582

<211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 582

10 tggccaaaag gccgaaattc ctaag 25

<210> 583
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 583

gacactgaca acagggacaa tgtttca 27

<210> 584
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

30 <400> 584

ggagccccct acatcttcta ttat 25

35 <210> 585
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 585

45 aaactgcaa tagttgtgca tggggata 28

<210> 586
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 586

ggcgggggct gttgggatg ctata 25

60 <210> 587
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 587

5 gggggctgtt ggggatgcta ta 22

<210> 588
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

15 <400> 588

actggcctaaa aggccgaaat tcctaag 27

<210> 589
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

25 <400> 589

attaaaggtg ctgaatcagg caggagccc 30

30 <210> 590
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 590

40 taaggcgggg gctgttgggg atgctatacc caccac 36

<210> 591
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

50 <400> 591

cactaactta cctgcaatag ttgtgcatgg ggata 35

55 <210> 592
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 592

65 aaaacgcacc gctgttgcgg gggcggcgg 29

<210> 593

<211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 593

10 agctgaggtg tctgataata ctaattataa a 31
 <210> 594
 <211> 27
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 594
 actatctcgg accccggcag tcatgtg 27
 <210> 595
 25 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 595

35 ggtagcaata ataggtggc agtgccaa gtg 33
 <210> 596
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 596

45 atcatccact acaaagcag atgtgccaa a 31
 <210> 597
 <211> 32
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 597
 gtcaaaatac acaacaggga gattgccctc cg 32
 60 <210> 598
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 598
 5 tattacaggc caataaatcg gacgtgcct 30
 <210> 599
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 599
 15 cagggcaacg ggagggatgt gattggt 27
 <210> 600
 <211> 29
 20 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 600
 acattattca attcccaaat cctctggt 29
 30 <210> 601
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 601
 40 ggaggtaggt cgagggaac ctctcgggtg c 31
 <210> 602
 <211> 30
 <212> DNA
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 602
 cactgtgtgt gcacgcacta gttccgctgc 30
 <210> 603
 55 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 603
 65 gttgtgtgct accacagagt ctcaaccgtt g 31
 <210> 604

<211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 604

10 gcccctcagg cccatttga cactaca 27
 <210> 605
 <211> 25
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 605
 ggctggaat tcaaaacag atgtt 25
 <210> 606
 25 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 606

35 aaataacagg gatccccgc caagctca 28
 <210> 607
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 607

45 ttcctacta ttattgtgc atgaatgat g 31
 <210> 608
 <211> 25
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 608
 cagtgctagg ctgcttacag taggc 25

60 <210> 609
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 609
 5 gacaatccta aaaaaatagt tgtaccaaag gtg 33
 <210> 610
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 610
 15 ccggtggtcc tggcactgat aatagg 26
 <210> 611
 <211> 31
 20 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 611
 tagtccttgt agtaacaatg ctattacccc t 31
 30 <210> 612
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 612
 40 gccattagat attatgaact ccattag 27
 <210> 613
 <211> 27
 <212> DNA
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 613
 ggacatgtat ataaaagctt ctaatgg 27
 <210> 614
 55 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 614
 65 tatccaactc ccagtgggtc tatggcca 28
 <210> 615

<211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 615

10 ctgaagacac atacaagtct actaac 26
 <210> 616
 <211> 30
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 616
 gctaaaaaat tattgtacc caaagtatca 30
 <210> 617
 25 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 617

35 agtatcctgg acaaccgggt gctgataat 29
 <210> 618
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 618

45 cttggatgta agcctccaac aggggaa 27
 <210> 619
 <211> 25
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 619
 cacatccacc cgcacatcgt ctgca 25
 60 <210> 620
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 620
 5 actaatggga aacgtaagat tgctgta 27
 <210> 621
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 621
 15 gtggaaacat agcagatagt agggag 26
 <210> 622
 <211> 32
 20 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 622
 aggtactgta ggcgatgcta ttccagatga ct 32
 30 <210> 623
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 623
 40 gctgcacct tcatcatcta gtacag 26
 <210> 624
 <211> 29
 <212> DNA
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 624
 aaagtggaaa catagcagat agtagggag 29
 <210> 625
 55 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 625
 65 cagttctagg ctattagctg tgggtcac 28
 <210> 626

<211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 626
 10 gcagtaccca aggtatctgg ttg 24
 <210> 627
 <211> 29
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 20 <400> 627
 atcatttat gatccctgcc tccagcgtt 29
 <210> 628
 25 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 628
 aaatatgttg gtaactctgg taactctg 28
 35 <210> 629
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 629
 45 atataggga ttfcgctga cattgccc 28
 <210> 630
 <211> 29
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 55 <400> 630
 aaaggcatgc aagccaata atgtatcta 29
 60 <210> 631
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 631
5 acgtgcaaac cccgtagtt ctgtatactg 30
<210> 632
<211> 26
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
10 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico
<400> 632
15 cagtttgta gacactaca gatacc 26
<210> 633
<211> 32
20 <212> DNA
<213> Secuencia artificial
<220>
25 <223> Sonda de ácido nucleico
<400> 633
caaaaaggcc aaataagaca tctatcccca aa 32
30 <210> 634
<211> 29
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
35 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico
<400> 634
40 taatttat aaccagata cgcagcgca 29
<210> 635
<211> 27
<212> DNA
45 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Sonda de ácido nucleico
50 <400> 635
acatatggtg gaggccctgg tacagac 27
<210> 636
55 <211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia artificial
<220>
60 <223> Sonda de ácido nucleico
<400> 636
actgtctgta ggtaaacgaa aggcgtctac 30
65 <210> 637

<211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 637

10 gtacctaag gtcaggtaa taaacaggct g 31
 <210> 638
 <211> 25
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 638
 gtttagagta gctttaccg atcct 25
 <210> 639
 25 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 639

35 ttggcatgt gtaggtatgg aaattgt 28
 <210> 640
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 640

45 gctcatgcag ctacagctgt tattacgc 28
 <210> 641
 <211> 30
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 641
 ccaagcattc tattgtata ctagggtggg 30

60 <210> 642
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 642
 5 ctcaacgcgt gctgctattc ctaa 25
 <210> 643
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 643
 15 gtaatggccg tgaccctata gaaag 25
 <210> 644
 <211> 30
 20 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 644
 tatgttagtt tttgatgct tggcacact 30
 30 <210> 645
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 645
 40 ttaactatta gcactgccac tgctgc 26
 <210> 646
 <211> 28
 <212> DNA
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 646
 aacctcaacg cgtgctgcta ttctaaa 28
 <210> 647
 55 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 647
 65 aacctcaacg cgtgctgcta ttctaaagt a 31
 <210> 648

<211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 648

10 tattaaaaac accagtagtg gtaatggt 28
 <210> 649
 <211> 29
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 649
 aatagctgg taaacctggt atagataat 29
 <210> 650
 25 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 650

35 aaccctgtg aataataatt caggaa 26
 <210> 651
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 651

45 cctacagctc attaacagtg taatac 26
 <210> 652
 <211> 27
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 652
 atagctattc aggatactgc cccggac 27
 <210> 653
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 653
 5 cccattggaa cttatcaatt cacctatt 28
 <210> 654
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 654
 15 cgttattggt gaggaaatac ctaatgac 28
 <210> 655
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 655
 ctttccgcaa ccacacagtc tatgtc 26
 30 <210> 656
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 656
 40 ttaaagtaca aaaaaccaat aataagcaaa g 31
 <210> 657
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 657
 caacctatgt acacctaata cattggct 28
 <210> 658
 55 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 658
 65 agtgaggtag cccttgatgt agctacctca 30
 <210> 659

<211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 659

10 tacagcatcc acgcaggata gcttaataa 30
 <210> 660
 <211> 23
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 660
 gactaaggac aatacaaaa caa 23
 <210> 661
 25 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 661

35 gtactgctac agaacagtta agtaa 25
 <210> 662
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 662

45 gccagtggcc accagcctag aa 22
 <210> 663
 <211> 22
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 663
 actaggtcaa agcctgctgt ag 22

60 <210> 664
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 664
 5 aaaatctgct cctacctcca cctctacac 29
 <210> 665
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 665
 15 atctgctcct acctccacct ctacac 26
 <210> 666
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25
 <400> 666
 gagctctagg ctctcacag taggcat 28
 30 <210> 667
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 667
 40 gaaaaatagc actaataagg tgtctgta 28
 <210> 668
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 668
 caacctctat gatcccgaca cccagcgtct g 31
 <210> 669
 55 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 669
 tgtcaaaagt tctaccgtcc agacccccgg t 31
 65 <210> 670

<211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 670

10 cagttccaga ctttggctg ttggca 26
 <210> 671
 <211> 25
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 671
 cagatatccc gcacagccag ggtct 25
 <210> 672
 25 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 672

35 cccggatgac ctttatatta aaggg 25
 <210> 673
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 673

45 attacactaa ctgcagagat aatgac 26
 <210> 674
 <211> 25
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 674
 aaaggtggta atggtagaca ggatg 25
 60 <210> 675
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 675
 5 agcatctgct gttgatacca aagatacag t 31
 <210> 676
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 676
 15 gacatacgtg ccaaccagg cagttatta 30
 <210> 677
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 677
 cccatcacca aaacgtgta agcgtcgcaa g 31
 30 <210> 678
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 678
 40 ccgtgaaatc aatcaatacc ttcgc 25
 <210> 679
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 679
 cattctaca gatttgatt ggaagggtg 29
 <210> 680
 55 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 680
 65 tagaccct agaccaagg ctagt 25
 <210> 681

<211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 681

10 aaagcacatt aactaatat gatgccctg 30
 <210> 682
 <211> 28
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 20 <400> 682
 tattagtga catccattac ttaataag 28
 <210> 683
 25 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 683
 35 ataataaata ccctagccag cctggta 27
 <210> 684
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 684
 45 acctacagat ttgtatttta agggatct 28
 <210> 685
 <211> 27
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 55 <400> 685
 cacctcttc ttctcttcc tctctg 27
 60 <210> 686
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 686

5 ggtaattgta tgactgtgt gtgt 24

<210> 687
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

15 <400> 687

agtttctctg agtctacatt atataatcca 30

<210> 688
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

25 <400> 688

ataaaaatcc taaagacagt agggac 26

30 <210> 689
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 689

40 ctgtagata cataaccgcta cctacaa 27

<210> 690
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

50 <400> 690

ggaccaatc ccattaggac gcaaa 25

55 <210> 691
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 691

65 tctggtcaa cagcagaaat tcttaaagtg 30

<210> 692

<211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 692

10 ctctcgatta ttaactttgg gtcacccc 28
 <210> 693
 <211> 29
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 20 <400> 693
 ctgctaagtc agacactgat aataggac 29
 <210> 694
 25 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 694
 taaaaatgca cagtctcagg tacagcgtgg c 31
 35 <210> 695
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 695
 45 gtttggcctt ccggatcctt ccctt 25
 <210> 696
 <211> 26
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 55 <400> 696
 ggatatacgt gagcgtcctg gtactc 26
 60 <210> 697
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 697
 5 tgctgcacc gaaacggcca tacctg 26
 <210> 698
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 698
 15 gtcagctaaa tcgtcttct cagcc 25
 <210> 699
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 25 <400> 699
 ctggacaaaa tacagatggt agagaa 26
 30 <210> 700
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 700
 40 actcacaaa ctgtaatac tggatg 27
 <210> 701
 <211> 32
 <212> DNA
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 50 <400> 701
 tggatgatacc ggtgataaaa tccagatga cc 32
 <210> 702
 55 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 702
 ggctagtagc tctactacaa cgatgcc 28
 65 <210> 703

<211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 703
 10 accagtacac gtgctgaaat acctaag 27
 <210> 704
 <211> 28
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 20 <400> 704
 cccttagat atagctcagt ccgtgtgt 28
 <210> 705
 25 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 705
 gcattactat aatagggccg gtgtggtt 28
 35 <210> 706
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 706
 45 tactgttact ggccgtgacc ctattgg 27
 <210> 707
 <211> 30
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 55 <400> 707
 actaatgtgc aatatcgtgc gggtgattgc 30
 60 <210> 708
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 708

5 tttggatctc tgcaccacta cctgt 25

<210> 709
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

15 <400> 709

tcagctcttt taccttaagg gg 22

<210> 710
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

25 <400> 710

gggccgccgc cgccaagcct aaggac 26

30 <210> 711
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 711

40 tacttctgta gttacacacg aactaga 28

<210> 712
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

50 <400> 712

ctgtaagccc ggtgctgtgc aaacaggtga c 31

55 <210> 713
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 713

65 tgatagggca acacctggaa gctgtatt 28

<210> 714

<211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 714

10 tgtggtgtt ccacaaaaa aggatcca 28
 <210> 715
 <211> 28
 <212> DNA
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 715
 cctgttactg ttcctccag ccctggac 28
 <210> 716
 25 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 716

35 aaaccagggg actgcccccc atta 24
 <210> 717
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico
 <400> 717

45 ctccacaagt ttggaggata cctaccgt 28
 <210> 718
 <211> 22
 50 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

55 <400> 718
 ggtgttttg gaggttgacc tt 22

60 <210> 719
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de ácido nucleico

<400> 719

5 caagacaggg gattgtccac cattgcaa 28

<210> 720
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

15 <400> 720

cgaaaagtta caggaaaaca agtcc 25

<210> 721
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

25 <400> 721

ctatTTTTg aagggggcgt cgct 25

30 <210> 722
<211> 26
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 722

40 taacaaacc tattggctgc agcggg 26

<210> 723
<211> 27
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

50 <400> 723

ggccggtggt gaccaaacg ttggtag 27

55 <210> 724
<211> 29
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 724

65 tgtgctccc ttctgatgcc tccaccgcc 29

<210> 725

ES 2 615 728 T3

<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Sonda de ácido nucleico

<400> 725

10 ccatctctgt ccgcaaacgc tcggcgaccg 30

<210> 726
<211> 26
<212> DNA

15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda de ácido nucleico

20 <400> 726

ggccggtggt gaccaaacg ttgta 26

25

REIVINDICACIONES

1. Un conjunto de sondas de ácido nucleico que comprende

a) una primera sonda de ácido nucleico que comprende

5 i) un ácido nucleico aislado que tiene una longitud total no superior a 40 nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 344 o un complemento de la misma, en donde dicho ácido nucleico es capaz de hibridarse bajo condiciones rigurosas selectivas con un gen E6 del virus de papiloma humano (HPV) y opcionalmente

ii) un marcador y/o un ligando detectable o en donde el ácido nucleico está unido a un soporte sólido, y

b) una segunda sonda de ácido nucleico que comprende

10 i) un ácido nucleico aislado que tiene una longitud total no superior a 40 nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 553 hasta SEQ ID NO: 556 y sus complementos, en donde dicho ácido nucleico es capaz de hibridarse bajo condiciones rigurosas selectivas con un gen L1 de HPV, y opcionalmente

ii) un marcador y/o un ligando detectable o en donde el ácido nucleico está unido a un soporte sólido,

15 en donde la primera sonda de ácido nucleico y la segunda sonda de ácido nucleico son capaces de hibridarse bajo condiciones rigurosas con al menos una porción del mismo genoma de HPV, en donde el genoma es un genoma de HPV2, y en donde la primera sonda de ácido nucleico y la segunda sonda de ácido nucleico no son capaces de hibridarse bajo condiciones rigurosas con los genomas de HPV de HPV3, HPV6, HPV10, HPV11, HPV16, HPV18, HPV26, HPV27, HPV28, HPV29, HPV30, HPV31, HPV32, HPV33, HPV34, HPV35, HPV39, HPV42, HPV45, HPV51, HPV52, HPV53, HPV54, HPV56, HPV57, HPV58, HPV59, HPV64, HPV66, HPV67, HPV68, HPV69, HPV70, HPV73, HPV82, HPV84, HPV85, HPV86, HPV87 y HPV94.

25 2. El conjunto de sondas de ácido nucleico según la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico aislado de la primera sonda de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 344, equivalentes de ARN o ADN de la misma o complementos de la misma, y/o en donde el ácido nucleico aislado de la segunda sonda de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 553 hasta SEQ ID NO: 556, equivalentes de ARN o ADN de las mismas y complementos de las mismas.

3. Un método para genotipificar al menos un ácido nucleico diana del virus del papiloma humano (HPV), comprendiendo dicho método:

30 a. una etapa de purificación que comprende:

- generar un híbrido de ácido nucleico bicatenario del al menos un ácido nucleico diana de HPV mediante hibridación del al menos un ácido nucleico diana de HPV con un conjunto de sondas híbridas que comprenden al menos una primera sonda de ácido nucleico específica del al menos un ácido nucleico diana de HPV;

35 - inmovilizar el híbrido de ácido nucleico bicatenario sobre un primer soporte sólido poniendo en contacto el híbrido de ácido nucleico bicatenario con al menos un primer anticuerpo capaz de unirse al híbrido de ácido nucleico bicatenario y unir el al menos un primer anticuerpo con el primer soporte sólido; y

- separar el híbrido de ácido nucleico bicatenario de la muestra para generar al menos un ácido nucleico purificado;

40 b. una etapa de amplificación, en donde al menos una porción del al menos un ácido nucleico purificado se amplifica para generar ácidos nucleicos amplificados; y

c. una etapa de genotipificación que comprende:

- inmovilizar los ácidos nucleicos amplificados con al menos un segundo soporte sólido hibridando los ácidos nucleicos amplificados con un conjunto de sondas de inmovilización que comprende al menos una sonda de polinucleótido específica del al menos un ácido nucleico diana de HPV; y

45 - detectar la presencia del al menos un ácido nucleico diana de HPV con un conjunto de sondas de detección que comprende al menos una sonda de polinucleótido específica del al menos un ácido nucleico diana;

y en donde el conjunto de sondas de inmovilización y/o el conjunto de sondas de detección es un conjunto de sondas según la reivindicación 1 o 2.

50 4. El método según la reivindicación 3, en donde el conjunto de sondas de inmovilización está unido a una pluralidad de soportes sólidos colocados en suspensión.

5. El método según la reivindicación 4, en donde la pluralidad de soportes sólidos está marcada de forma detectable.

6. El método según la reivindicación 4 o 5, en donde el método está adaptado para detectar la presencia de una pluralidad de ácidos nucleicos diana.

5 7. El método según la reivindicación 6, en donde cada soporte sólido de la pluralidad de soportes sólidos contiene solo sondas específicas de un ácido nucleico de la pluralidad de ácidos nucleicos diana, de modo que solo el ácido nucleico de la pluralidad de ácidos nucleicos diana se unirá a cada uno de la pluralidad de soportes sólidos.

10 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, en donde cada uno de la pluralidad de soportes sólidos está marcado de forma detectable de modo que un soporte sólido específico de un primer ácido nucleico de la pluralidad de ácidos nucleicos diana es portador de un marcador distinto de un soporte sólido específico de un segundo ácido nucleico de la pluralidad de ácidos nucleicos diana.

9. El método según la reivindicación 3, para detectar al menos un ácido nucleico diana de una pluralidad de ácidos nucleicos diana en una muestra que comprende ácidos nucleicos no diana, en donde la pluralidad de ácidos nucleicos diana son ácidos nucleicos de HPV, comprendiendo dicho método:

a. purificar el ácido nucleico diana a partir de la muestra mediante un método que comprende:

15 (i) poner en contacto la muestra con una pluralidad de sondas de purificación, en donde al menos una porción de cada sonda de purificación se hibrida con un ácido nucleico diana de la pluralidad de ácidos nucleicos diana para formar un híbrido de ADN:ARN;

20 (ii) inmovilizar el híbrido de ADN:ARN sobre un primer soporte sólido mediante un método que comprende poner en contacto el híbrido de ADN:ARN con al menos un primer anticuerpo capaz de unirse al híbrido de ADN:ARN, en donde el anticuerpo está unido o está adaptado para estar unido al primer soporte sólido; y

(iii) separar el primer soporte sólido de la muestra para generar al menos un ácido nucleico diana purificado;

b. genotipificar el ácido nucleico diana purificado mediante un método que comprende:

(i) amplificar al menos una porción del ácido nucleico diana purificado para generar un amplicón,

25 (ii) inmovilizar el amplicón sobre uno de una pluralidad de segundos soportes sólidos mediante un método que comprende poner en contacto el amplicón con una pluralidad de sondas de inmovilización comprendidas en un conjunto de sondas de inmovilización, en donde:

(α) cada sonda de inmovilización está unida o está adaptada para estar unida a uno de la pluralidad de segundos soportes sólidos; y

30 (β) al menos una porción de las sondas de inmovilización se hibrida con al menos un ácido nucleico diana;

(iii) poner en contacto el amplicón inmovilizado con al menos un conjunto de sondas de detección, en donde al menos una porción de las sondas de detección se hibrida con el al menos un ácido nucleico diana para generar un complejo de detección; y

35 (iv) detectar al menos una primera señal detectable generada por el complejo de detección, en donde la señal detectable indica el genotipo del ácido nucleico diana;

en donde el conjunto de sondas de inmovilización y/o el conjunto de sondas de detección es un conjunto de sondas según se ha definido en la reivindicación 1 o 2.

10. El método según la reivindicación 9, en donde el ácido nucleico purificado está

(i) fragmentado antes de la amplificación;

40 (ii) amplificado por un método que comprende una amplificación isotérmica; y/o

(iii) amplificado por un método que comprende una amplificación del genoma completo.

11. El método según la reivindicación 9 o 10, en donde el segundo soporte sólido genera la primera señal detectable.

45 12. El método según la reivindicación 11, en donde se genera una pluralidad de distintos ácidos nucleicos diana purificados.

13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, que comprende una pluralidad de distintos segundos soportes sólidos, en donde:

(α) cada segundo soporte sólido comprende al menos dos sondas de inmovilización específicas de un solo ácido nucleico diana y no comprende ninguna sonda de inmovilización específica de ningún otro de la pluralidad de ácidos nucleicos diana; y

5 (β) cada segundo soporte sólido genera una primera señal detectable única que indica el genotipo del ácido nucleico diana.

14. El método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en donde se genera una segunda señal detectable que indica la inmovilización del amplicón sobre el segundo soporte sólido.

10 15. El método según la reivindicación 14, en donde la sonda de detección comprende un marcador detectable que genera la segunda señal detectable; y/o en donde la segunda señal detectable indica además el genotipo del ácido nucleico diana y/o la cantidad de amplicón inmovilizado sobre cada soporte sólido.

15 16. El método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, en donde la primera señal detectable indica un genotipo de un virus del papiloma humano (HPV) seleccionado a partir del grupo que consiste en: los tipos de HPV de alto riesgo (HR-HPV) 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82; y los tipos de HPV de bajo riesgo (LR-HPV) 2, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 27, 28, 30, 32, 40, 42, 43, 53, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 74, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90 y 91.

17. El método según la reivindicación 16, en donde las sondas de inmovilización son específicas frente a otros tipos de HPV distintos de dicho HPV de alto riesgo hasta 10^6 copias.

20 18. El método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en donde una relación señal - ruido de todos los tipos de HPV no específicos es inferior a 2,0; y/o en donde una relación señal - ruido de todos los tipos de HPV específicos es al menos 5.

25 19. El método según la reivindicación 9, en donde la pluralidad de sondas de purificación comprende al menos una sonda de purificación capaz de unirse a más de un ácido nucleico de HPV y en donde cada segundo soporte sólido comprende una pluralidad de sondas de inmovilización específicas de un solo tipo de HPV, comprendiendo la pluralidad de sondas de inmovilización al menos una sonda de inmovilización específica de la región E6/E7 del tipo de HPV y al menos una sonda de inmovilización específica de la región L1 del tipo de HPV.

FIGURA 1A

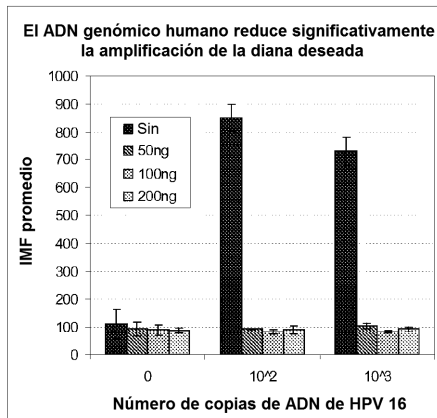


FIGURA 1B

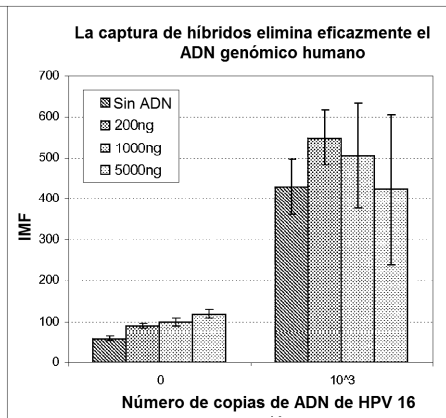


FIG. 2

Detección de infecciones cuádruples en 20-Plex

		Tipos	Aporte	6	11	16	18	31	33	45	34	35	52	53	58	59	66	67	68	69	70	73	77	82	
6, 11, 16, 18	10*7	483	1292	608	1306	65	37	44	58	60	46	97	57	37	101	69	53	66	73	69	46				
	10*6	452	1428	787	1990	71	56	31	75	63	66	147	76	96	107	67	61	72	69	75	69				
	10*5	526	1226	780	1720	84	48	54	86	44	65	117	56	61	113	64	83	93	39	58	39				
	10*4	342	1718	1131	2087	67	81	83	88	81	71	166	94	96	120	83	85	95	47	62	82				
10*3	1377	576	772	1516	71	81	74	86	54	54	109	76	73	102	64	100	74	37	51	70					
	10*2	388	711	1189	95	59	85	84	41	103	138	56	74	80	44	96	56	64	56	69					
10*7	52	47	38	66	404	345	1343	43	52	94	47	50	49	50	35	57	45	44	57						
	10*6	55	39	44	75	462	777	315	1361	48	59	87	44	38	70	62	50	51	42	45	44				
31, 33, 34, 45	10*5	34	41	51	57	493	885	228	2049	51	32	95	22	43	56	48	53	70	44	41	36				
	10*4	39	36	53	76	355	350	351	212	43	40	79	44	63	87	50	36	38	52	46	49				
10*3	45	32	37	49	588	862	317	1705	42	54	91	44	47	106	54	50	51	51	53	57					
	10*2	39	51	58	54	373	1423	422	1370	46	60	112	51	50	79	61	76	64	36	54	56				
10*7	72	67	49	59	51	40	68	58	1454	1082	586	236	42	87	60	44	70	48	53	63					
	10*6	39	44	56	47	39	51	43	33	349	680	456	216	57	51	54	30	46	48	36	50				
35, 52, 53, 58	10*5	62	49	58	50	47	32	42	47	574	454	198	70	56	51	60	54	26	48	54	50				
	10*4	46	36	76	62	60	30	35	68	1210	1238	886	372	56	87	55	64	67	43	50	65				
10*3	68	38	47	49	48	37	27	34	84	1373	585	411	44	81	52	53	60	43	48	57					
	10*2	50	62	61	50	43	34	28	52	508	818	584	56	63	48	35	62	36	27	49					
10*7	46	27	53	52	37	46	45	29	24	40	72	59	508	174	316	259	42	56	54	31					
	10*6	34	38	54	58	44	34	44	22	33	29	57	41	452	164	241	194	54	58	46	47				
59, 66, 67, 68	10*5	34	57	58	75	45	32	34	42	51	48	83	48	1120	288	393	318	43	36	40	58				
	10*4	40	34	67	40	63	45	63	52	31	38	92	40	1698	489	438	419	60	37	58	54				
10*3	53	49	51	77	37	49	55	47	61	49	99	59	1243	283	245	353	65	37	32	34					
	10*2	42	45	60	74	52	51	34	37	38	46	86	46	1842	407	469	238	74	47	60	53				
10*7	47	39	35	44	48	21	38	58	53	57	34	41	48	57	35	49	42	56	54	31					
	10*6	57	37	64	63	44	36	52	47	64	43	50	50	70	61	41	46	229	163	531	175				
69, 70, 73, 82	10*5	36	33	52	49	39	36	40	34	34	36	68	49	44	72	54	37	255	285	749	403				
	10*4	49	73	51	70	55	59	54	40	65	44	83	63	43	74	75	51	281	186	669	273				
10*3	55	47	70	48	68	34	26	48	34	59	101	51	46	65	55	48	378	282	1424	638					
	10*2	35	58	27	63	83	41	53	68	41	72	56	46	59	46	58	386	235	228	230					

FIGURA 3A

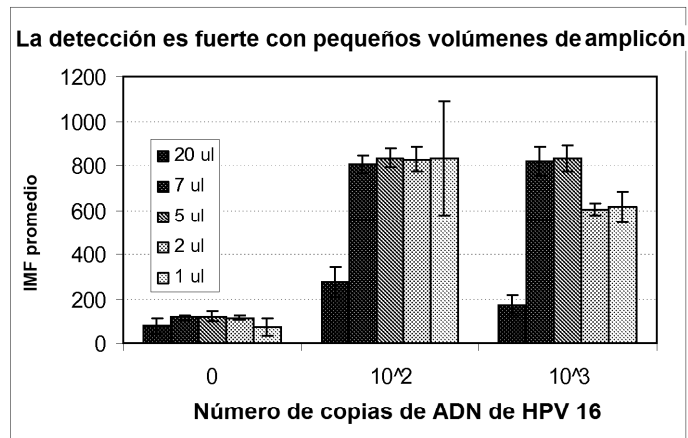


FIGURA 3B

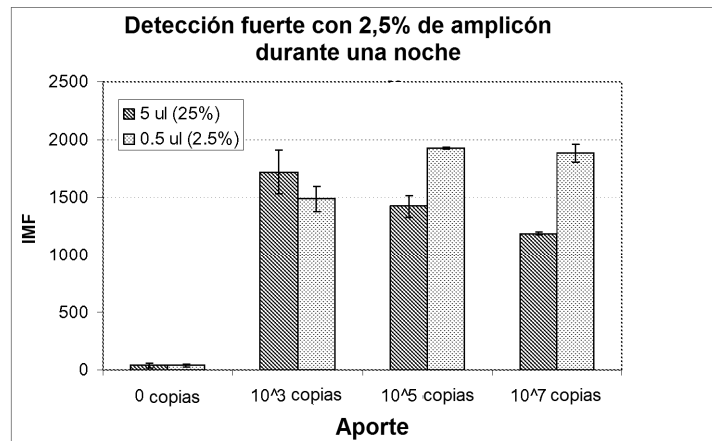


FIGURA 4A

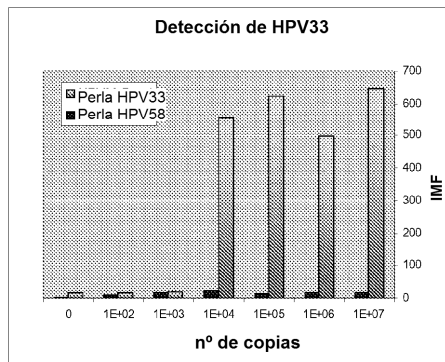


FIGURA 4B

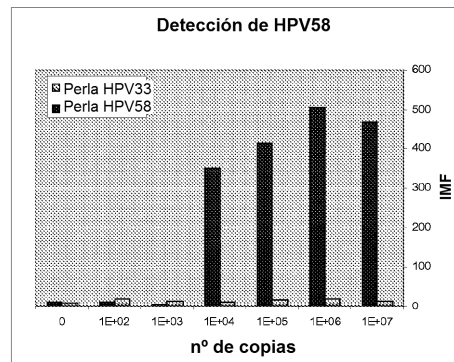


FIGURA 6

	6	11	16	18	26	31	33	34	35	39	45	51	52	53	54	58	56	59	66	67	68	69	70	73	82	85	
HPV6	15.2	1.4	1.2	1.2	1.0	1.2	1.1	1.1	1.1	1.2	1.0	1.2	1.1	1.2	1.3	1.1	1.0	1.3	1.0	1.2	1.1	1.1	1.2	1.1	1.2	1.2	
HPV11	1.1	1.28	1.2	0.9	0.8	1.8	0.6	0.6	1.0	0.8	0.7	0.7	0.8	1.1	1.2	0.7	0.6	0.6	1.0	0.5	0.6	0.7	0.6	0.7	0.5	1.1	
HPV16	1.1	1.3	1.94	1.2	1.4	1.2	1.2	1.2	1.1	1.3	1.1	1.2	1.2	1.3	1.1	1.2	1.1	1.3	1.1	1.2	1.1	1.1	1.2	1.2	1.1	0.9	
HPV18	1.3	1.2	1.3	1.5	0.0	1.2	1.2	1.3	1.4	1.3	1.3	1.2	1.3	1.6	1.5	1.2	1.2	1.4	1.2	2.4	1.3	1.2	1.3	1.3	1.3	1.7	
HPV26	0.9	0.8	1.3	0.9	1.52	0.8	0.7	0.5	0.9	0.8	0.9	0.9	0.3	1.1	1.0	0.7	0.6	0.9	0.9	0.5	0.6	0.8	0.8	0.8	0.6	0.9	
HPV31	0.8	0.9	1.1	0.8	0.6	2.6	0.8	0.6	0.9	0.8	0.6	0.9	0.7	1.4	1.2	0.9	0.6	0.6	1.3	0.6	0.8	0.7	0.8	0.8	0.6	0.9	
HPV33	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.3	1.9	1.3	1.7	1.2	1.2	1.2	1.3	1.5	1.4	1.2	1.3	1.4	1.2	1.4	1.3	1.2	1.3	1.3	1.0	1.0	
HPV34	1.2	1.5	1.3	1.3	1.2	1.3	1.2	1.4	1.8	1.2	1.2	1.3	1.2	1.3	1.3	1.2	1.2	1.4	1.1	1.2	1.2	1.2	1.4	1.3	1.3	1.3	
HPV35	1.3	1.7	1.3	1.4	1.2	1.4	1.3	2.3	1.8	1.2	1.3	1.5	1.3	1.4	1.4	1.3	1.2	1.5	1.2	1.3	1.3	1.2	1.3	1.3	1.4	1.1	
HPV39	1.2	2.2	1.3	1.4	1.2	1.3	1.3	1.4	1.3	2.1	1.2	1.3	1.4	1.6	1.4	1.8	1.2	1.3	1.2	1.3	1.3	1.2	1.4	1.4	1.4	1.2	
HPV45	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.4	1.3	1.3	3.7	1.4	1.3	1.3	1.5	1.4	1.2	1.2	1.4	1.2	1.3	1.2	1.3	1.6	1.3	1.4	1.1	
HPV51	1.1	1.1	0.7	1.2	1.0	1.6	0.9	0.7	0.9	1.2	1.0	1.2	1.0	1.2	1.1	1.0	0.7	0.9	1.1	0.9	1.0	0.7	0.7	0.7	1.3	1.1	
HPV52	1.2	1.6	1.4	1.6	1.2	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.2	1.5	2.0	2.1	1.3	1.3	1.3	1.4	1.2	1.2	1.3	1.3	1.4	1.4	1.1	1.1	
HPV63	1.3	1.3	2.0	1.4	1.1	1.3	1.4	1.3	1.3	1.4	1.2	1.4	1.3	2.1	1.4	1.3	1.2	1.5	1.2	1.3	1.3	1.3	1.4	1.4	1.4	0.9	
HPV64	1.4	1.3	1.4	1.4	1.3	1.4	1.3	1.4	1.2	1.3	1.3	1.3	1.4	1.5	2.1	1.8	1.3	1.2	1.4	1.2	1.3	1.3	1.3	1.5	1.4	1.2	1.0
HPV66	1.2	0.9	1.0	1.0	0.7	1.1	0.6	0.8	0.9	0.7	1.1	1.1	0.8	1.0	1.3	2.2	1.0	0.9	0.6	0.7	0.6	0.8	0.7	0.7	0.8	0.7	
HPV68	1.4	1.5	1.4	1.6	1.3	1.4	1.4	1.4	1.3	1.3	1.3	1.4	1.4	1.4	1.4	2.0	1.5	1.3	1.6	1.3	1.3	1.3	1.5	1.4	1.4	0.9	
HPV69	1.0	1.0	1.1	1.1	0.9	1.0	1.0	1.2	1.0	1.0	0.9	1.0	1.0	1.3	1.1	1.0	1.2	2.3	1.0	2.1	1.1	1.0	1.3	1.1	1.1	1.1	
HPV66	1.6	1.9	1.8	1.7	1.6	1.7	1.8	1.7	1.6	1.5	1.5	1.7	1.7	1.7	1.6	2.1	1.6	1.7	1.0	1.6	1.7	1.6	1.8	1.6	2.0	1.0	
HPV67	0.8	1.2	0.7	0.7	0.9	0.6	0.8	0.8	0.8	0.8	0.9	0.6	0.9	1.1	1.2	0.8	0.6	0.5	0.8	0.7	0.8	0.7	0.8	0.8	0.6	0.9	
HPV68	1.3	1.3	1.4	1.6	1.4	1.5	1.4	1.5	1.4	1.4	1.4	1.5	1.5	1.6	1.5	1.3	1.3	1.7	1.4	1.8	2.4	1.3	1.5	1.5	1.1	1.2	
HPV69	1.0	1.3	1.7	1.2	1.2	1.1	1.2	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.2	1.4	1.3	1.5	1.9	1.2	1.0	1.9	1.3	1.2	1.2	1.5	1.1	
HPV70	1.2	1.1	0.8	0.9	0.9	1.0	1.1	0.7	0.6	0.9	1.0	0.8	0.9	1.1	1.3	1.0	0.9	1.0	0.6	0.7	1.0	0.7	2.2	0.8	0.8	0.9	
HPV73	1.2	0.8	1.1	0.7	0.9	0.9	0.5	0.9	0.9	1.1	0.9	0.8	1.4	1.0	1.2	1.1	0.8	1.0	1.2	0.6	0.7	0.9	0.7	0.8	0.8	1.0	
HPV82	0.9	1.1	1.1	1.1	1.0	1.0	1.0	1.1	1.0	0.9	1.0	1.1	1.1	1.3	1.2	1.0	0.8	1.1	0.9	1.6	0.9	1.0	1.0	1.8	1.4	1.4	
HPV85	0.9	0.9	0.9	1.0	0.8	0.9	1.1	1.0	1.0	0.9	0.8	1.0	1.0	1.3	1.2	0.8	0.8	1.1	0.9	1.2	1.0	0.9	1.0	1.0	1.5	1.5	

FIGURA 7

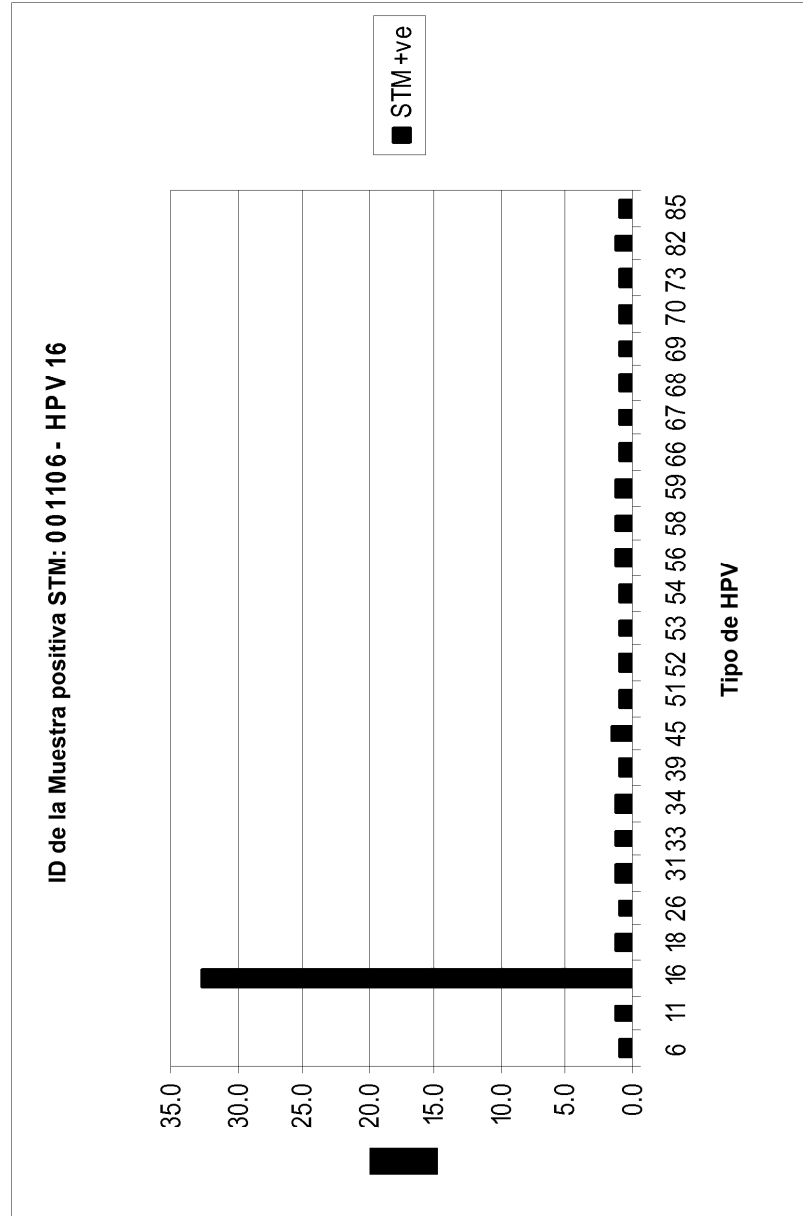


FIGURA 8

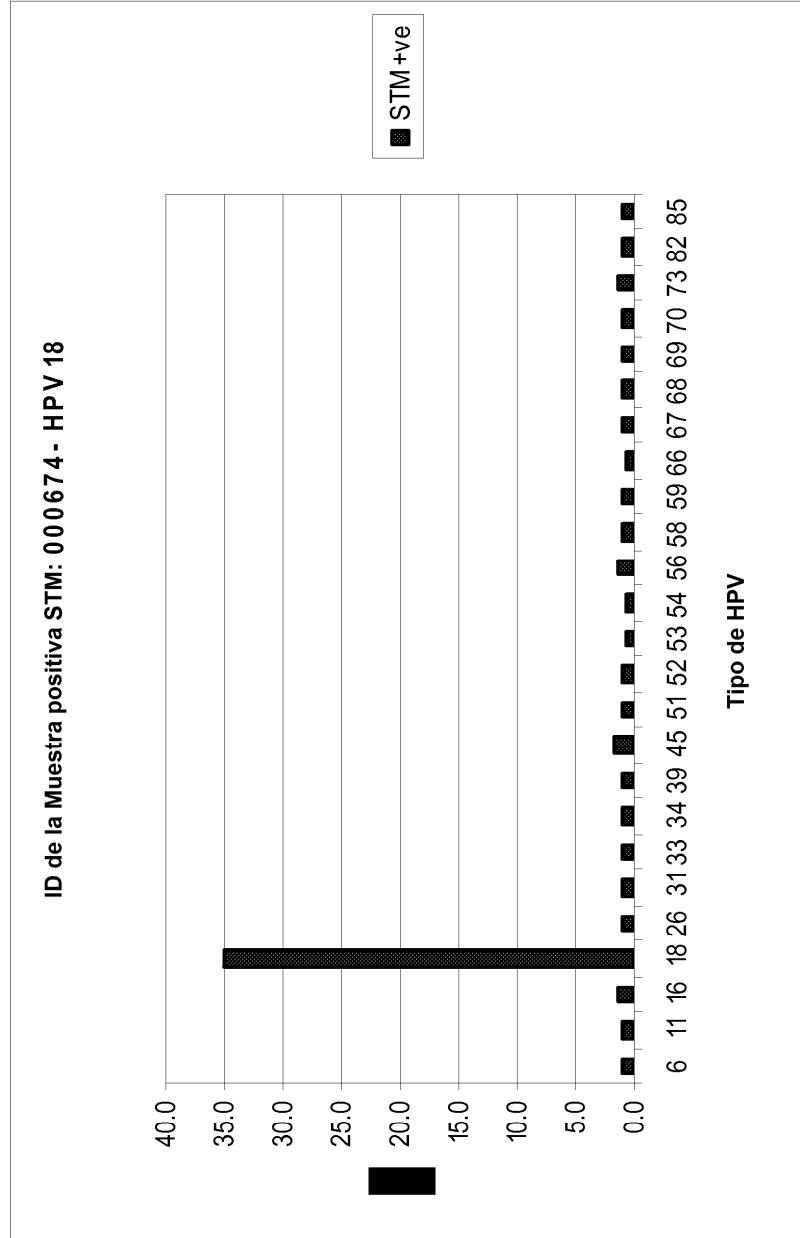


FIGURA 9

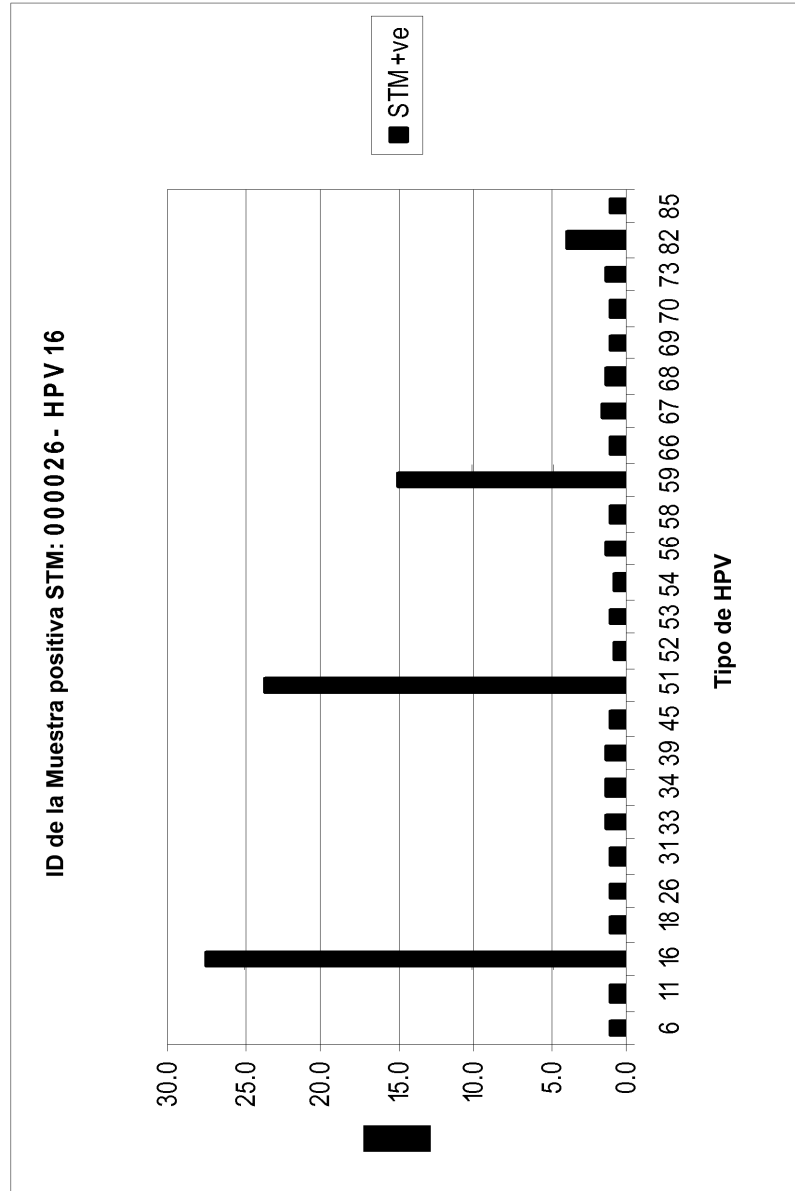


FIGURA 10

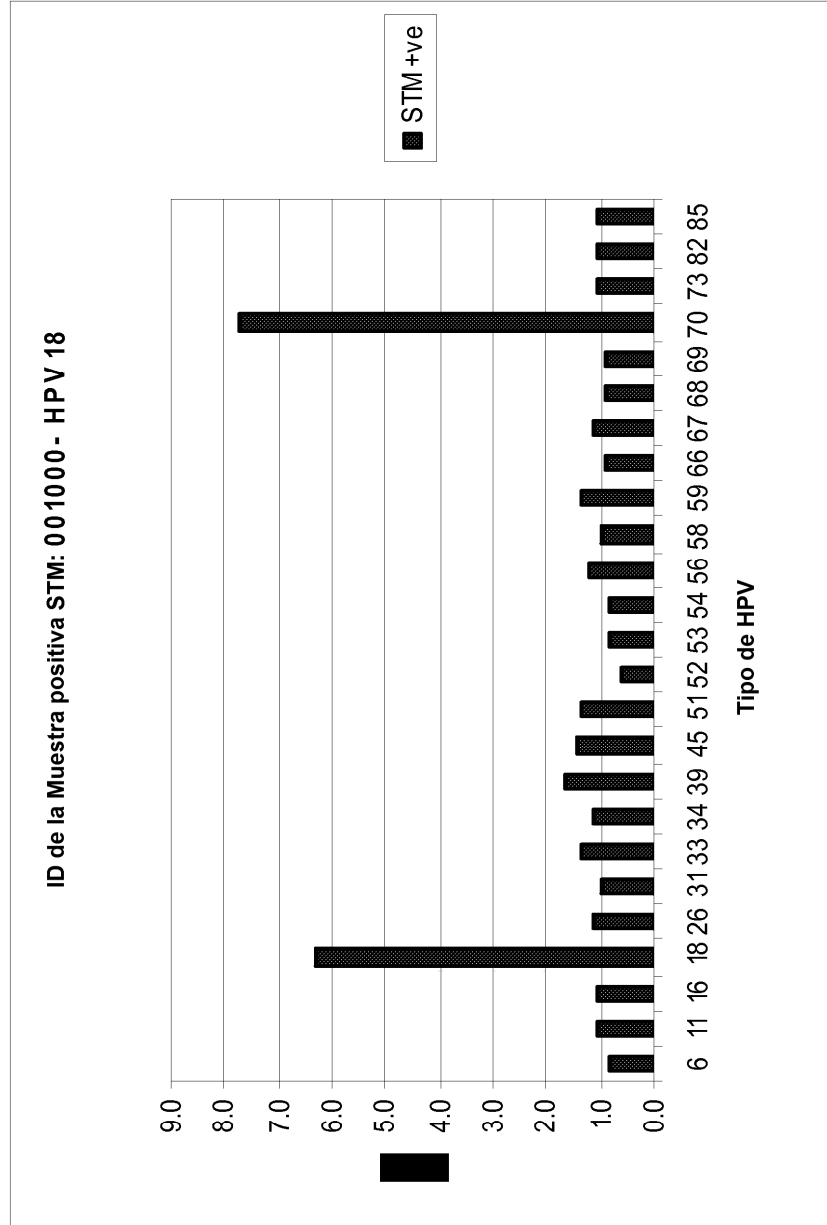


FIGURA 11

