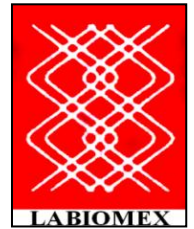




UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA Y MEDICINA EXPERIMENTAL



Diseño y Estandarización de un Sistema PCR-SSCP del Gen E6 para Detección y Tipificación del Virus del Papiloma Humano (VPH).

Trabajo Especial de Grado presentado ante la ilustre Universidad de Los Andes por la Br. **Danmarys Lucía Hernández González** como requisito para optar al título de

Licenciada en Biología

Tutor: MSc. Jhon Cruz

Mérida, Abril 2010

INFORME DEL JURADO NOMBRADO POR EL CONSEJO DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
PARA CONSIDERAR EL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO DE LA
BACHILLER
DANMARYS LUCÍA HERNÁNDEZ GONZÁLEZ

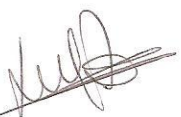
En Mérida a los 20 días del mes de abril del año 2010, a las 9:30 a.m. se reunieron los Profesores: Jhon Cruz (tutor), Militza Quintero y Néstor González, de la Facultad de Ciencias, miembros del jurado nombrado por el Consejo de la Facultad de Ciencias, para revisar el Trabajo Especial de Grado que sobre el tema: “**Diseño y Estandarización de un Sistema PCR-SSCP del Gen E6 para Detección y Tipificación del Virus del Papiloma Humano (VPH)**”, presentó la Bachiller: **Danmarys Lucía Hernández González**, titular de la Cédula de Identidad N° V016442428 para optar al título de:

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

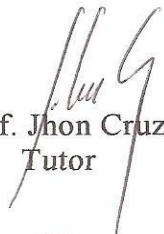
en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes. Acto seguido se procedió a oír la exposición que sobre el tema arriba mencionado realizó la Bachiller: **Danmarys Lucía Hernández González**.

Después del correspondiente interrogatorio, el Jurado procedió a deliberar sobre la calificación del trabajo sometido a su consideración.

Finalmente el Jurado lo declaró APROBADO con la Calificación de VEINTE (20) PUNTOS. Recomendado para su publicación.



Profra. Militza Quintero
Jurado



Prof. Jhon Cruz
Tutor



Prof. Néstor González
Jurado

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

A mí mamá

Por tí y para tí mita, te amo...

A la memoria de Ismael Hernández y Jesús M. González

AGRADECIMIENTOS

Al haber cumplido esta meta, lograda con paciencia y perseverancia, quiero agradecer y dedicar a todos aquellos que estuvieron conmigo durante el transcurso de esta etapa.

A Dios por permitirme cumplir esta meta; una etapa que nunca olvidaré.

A mi mami Lucía, gracias por tu amor, apoyo, comprensión y por estar siempre a mi lado Mita.

A mi mamá adoptiva Carmen por recibirme en su hogar y dejarme formar parte de la familia; los quiero muchísimo.

A mis tíos Juan y Dulce y mi madrina Gladys por su cariño y atenciones. Tío ojalá estuvieras entre nosotros.

A mi tío Jesús por su amor y confianza, a pesar de tu ausencia sigues siendo un padre para mí.

A mis primos hermanos, Yurimar, Alexander, Mairovis y Mariangel por su cariño, apoyo y por todo lo que hemos vivido juntos, los quiero.

A mi prima Aida por apoyarme y aconsejarme siempre.

A Jannellis por animarme siempre y no dejarme caer, gracias por todos los momentos que hemos compartido.

A Carlilla, mi amiga y compañera incondicional que siempre tiene la respuesta, gracias por tus consejos.

A las hermanas Contreras; Francis, Ma Alejandra y Liliana por estar conmigo en las buenas y malas, las quiero mucho brujitas.

A Duchicela y Amarí mis grandes amigas, gracias por estar allí todo este tiempo.

A Migue por acompañarme y regañarme, te quiero mucho.

A mis amigas y compañeras Judith, Erika, Gleyni, Yohana, Sandra y Mayra por compartir bellos momentos durante la carrera.

A Rafael que siempre tiene la mejor palabra de aliento “relájate”.

A la ilustre Universidad de Los Andes y la Facultad de Ciencias.

Al Laboratorio de Biología y Medicina Experimental LABIOMEX y todo el personal que allí labora.

Al Dr. Juan Puig y los profesores Jhon Cruz, Militza Quintero y Marco Bastidas, por su apoyo, consejos y principalmente por los conocimientos brindados durante la realización de este trabajo.

A mis profesores que jamás olvidaré; Gustavo Fermín, Néstor González, Antonio D ascencao y Elis Aldana.

A Gabriela, Marisé “chiquita”, Nol, Reinaldo, Maricef, Lusmary, Lilibeth, Nakari, Arévalo, Nereida y a todos mis amigos del laboratorio por brindarme su apoyo.

A la Sra. Dorita, gracias por todo, te quiero mucho.

A mis amigos incondicionales de Carora; Waleska, Rosvic, Karina, Carlos Manuel, Eulier y José Daniel, los quiero muchísimo.

A la Sra. Alba Albarrán.

A la Sra. Sioly Márquez.

A mis amigos Karen, Nader y Ariana por ser mi nueva familia adoptiva.

A Juan Carlos, gracias por estar a mi lado, te adoro...

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
cm	Centímetros
c.s.p	Cantidad suficiente para
Da	Daltons
dNTP	desoxinucleótido trifosfato
D.O.	Densidad Óptica
g	Gramos
h	Hora (s)
IUB	Unión Internacional de Bioquímica
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
LCR	Región Larga de Control
LIE AG	Lesión Intraepitelial de Alto Grado
LIE BG	Lesión Intraepitelial de Bajo Grado
mA	Miliamperes
min	Minuto (s)
ml	Mililitro (s)
mm	Milímetros
mM	Milimolar
m.p	Mega pura
m.p.e.	Mega pura estéril
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
ng	Nanogramo (s)
nm	Nanómetros

ORF	Marco abierto de lectura
pb	Pares de bases
pmol	Picomoles
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RFLP	Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción
seg	Segundos
SSCP	Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla
U	Unidades de enzima
V	Voltios
vs.	Versus
VPH	Virus del Papiloma Humano
W	Watts
°C	Grados Centígrados
μl	Microlitros

ÍNDICE GENERAL

	Página
Resumen.....	XIII
Introducción.....	1
Virus del papiloma humano (VPH).....	2
Clasificación.....	2
Estructura del virión y organización genética.....	4
Proteínas virales.....	6
Propiedades transformantes de los oncogenes virales.....	9
Virus del papiloma humano y cáncer cervical.....	12
Diagnóstico convencional del virus del papiloma humano.....	15
Diagnóstico de VPH por métodos moleculares.....	16
Polimorfismo de conformación de cadena sencilla.....	19
Planteamiento del problema.....	21
Hipótesis.....	22
Objetivos.....	23
Objetivo general.....	23
Objetivos específicos.....	23
Materiales y métodos.....	24
Diseño de oligonucleótidos.....	24
Muestras biológicas.....	25
Cuantificación del ADN por espectrofotometría.....	26
Sistema de PCR general del gen E6 de VPH.....	29
Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	30
Sistema SSCP del gen E6.....	31
Tinción con nitrato de plata.....	32

Resultados.....	33
Diseño de oligonucleótidos consenso degenerados.....	33
Muestras biológicas.....	37
Cuantificación del ADN por espectrofotometría.....	37
Sistema PCR general del gen E6 de VPH.....	37
Oligonucleótidos DAM_E6F/R1 vs. DAM_E6F/R2.....	37
Amplificados del fragmento del gen E6 por el sistema PCR general DAM_E6F/R1.....	38
Prueba de sensibilidad comparada.....	41
Sistema SSCP del gen E6.....	42
SSCP para VPH 6.....	42
SSCP para VPH 11.....	43
SSCP para VPH 16.....	43
SSCP para VPH 18.....	44
Discusión.....	45
Conclusiones.....	50
Recomendaciones.....	51
Referencias bibliográficas.....	52
Apéndice.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Árbol filogenético de 118 tipos de VPH; clasificados en géneros, especies, tipos subtipos y variantes.....	3
Figura 2. Estructura del virión de papilomavirus.....	5
Figura 3. Organización genómica del VPH 16.....	5
Figura 4. Representación esquemática las oncoproteínas E6 y E7.....	8
Figura 5. Interacciones celulares de las oncoproteínas E6 y E7 e inducción de a la inmortalización de las células.....	9
Figura 6. Proteína E6 une p53 en conjunción con E6-AP.....	10
Figura 7. Expresión de los genes de VPH durante la progresión a cáncer cervical.....	13
Figura 8. Zona de transformación cervical.....	14
Figura 9. Cambios en la maduración y la diferenciación celular del epitelio escamoso.....	15
Figura 10. Regiones para la detección de VPH mediante PCR tipo específica y PCR general o de amplio espectro.....	18
Figura 11a. Alineamiento múltiple de las secuencias del gen E6 para 25 tipos de VPH de la región comprendida entre el nucleótido 1 al 260.....	17
Figura 11b. Alineamiento múltiple de las secuencias del gen E6 para 25 tipos de VPH de la región comprendida entre el nucleótido 261 al 501.....	34
Figura 12. Amplificados del fragmento del gen E6 para los tipos de VPH 70, 33, 18, 35, 16, 58, 31, 67, 6, 53 con los oligonucleótidos DAM_E6F/R1 y DAM_E6F/R2.....	38
Figura 13. Amplificados del fragmento del gen E6 para los 25 tipos de VPH con los oligonucleótidos DAM_E6F/R1.....	38

Figura 14. Amplificados de 214 pb del fragmento del gen E6 para las 4 muestras de VPH 6.....	39
Figura 15. Amplificados de 214 pb del fragmento del gen E6 para las 4 muestras de VPH 11.....	39
Figura 16. Amplificados de 214 pb del fragmento del gen E6 para las 4 muestras de VPH 16.....	40
Figura 17. Amplificados de 214 pb del fragmento del gen E6 para las 4 muestras de VPH 18.....	40
Figura 18. Prueba de sensibilidad comparada de los sistemas de PCR DAM_E6F/R1 y PCR MY09_MY11.....	41
Figura 19. Amplificados por el sistema PCR general del gen E6 utilizando los oligonucleótidos DAM_E6F/R1 de 15 muestras negativas para VPH por el sistema PCR MY09/11...	42
Figura 20. Patrón de movilidad electroforética del fragmento del gen E6 para las 4 muestras de VPH 6.....	42
Figura 21. Patrón de movilidad electroforética del fragmento del gen E6 para las 4 muestras de VPH 11.....	43
Figura 22. Patrón de movilidad electroforética del fragmento del gen E6 para las 4 muestras de VPH 16.....	43
Figura 23. Patrón de movilidad electroforética del fragmento del gen E6 para las 4 muestras de VPH 18.....	44

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación de los papilomavirus de acuerdo a su tropismo y lesiones asociadas al subtipo viral.....	4
Tabla 2. Propiedades de los productos génicos del VPH.....	6
Tabla 3. Función celular de los blancos de E6 según tipo de riesgo asociado a VPH.....	11
Tabla 4. Números de acceso en el Gen Bank de las secuencias codificantes del gen E6 por tipo de VPH.....	24
Tabla 5. Número de muestra seleccionada por tipo de VPH para la estandarización.....	25
Tabla 6. Oligonucleótidos empleados para amplificar mediante PCR un fragmento del gen humano β -globina.....	26
Tabla 7. Componentes de la mezcla de reacción del sistema de PCR β -globina.....	27
Tabla 8. Programa de amplificación del sistema PCR β -globina.....	27
Tabla 9. Oligonucleótidos empleados para amplificar mediante PCR un fragmento del gen L1 de VPH.....	27
Tabla 10. Componentes de la mezcla de reacción del sistema de PCR MY09/11.....	28
Tabla 11. Programa de amplificación del sistema de PCR MY09/11.....	28
Tabla 12. Oligonucleótidos iniciadores consenso-degenerados DAM_E6F y DAM_E6R1/R2 diseñados para amplificar mediante PCR un fragmento del gen E6 de 25 tipos de VPH.....	29
Tabla 13. Componentes de la mezcla de reacción del sistema PCR general del gen E6.....	29
Tabla 14. Programa de amplificación del sistema PCR general del gen E6.....	30
Tabla 15. Tamaño de los fragmentos amplificados por juego de oligonucleótidos y tipo de VPH.....	36

RESUMEN

El VPH es considerado uno de los patógenos más comunes transmitidos sexualmente y el principal agente causal de neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) y cáncer cervical. Aproximadamente 40 de los genotipos conocidos han sido detectados en la mucosa anogenital y clasificados como VPH de alto y bajo riesgo. La mayoría de las pruebas para detección por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) del ADN viral utiliza como blanco el gen L1. Sin embargo el efecto oncogénico depende de la expresión continua de los genes E6 y E7 para la persistencia y transformación de fenotipos malignos de las células. El objetivo de esta investigación consistió en diseñar un sistema de PCR-SSCP del gen E6 para detectar y tipificar la presencia del virus en muestras del área genital. Se diseñaron los oligonucleótidos degenerados DAM_E6F/R1 que permitieron la amplificación mediante PCR de un fragmento de 214 pb del gen E6 de 25 tipos de VPH. Amplificados de los tipos virales 6, 11, 16 y 18 se sometieron a SSCP (Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla) con la finalidad de determinar un patrón de movilidad electroforética por tipo de VPH obteniéndose patrones distintos para un mismo tipo de VPH. La SSCP resulta tan sensible para detectar diferencias de tan sólo un nucleótido que revela patrones de movilidad electroforética que nos permiten sugerir la existencia de variación nucleotídica intratipo en la región amplificada del ORF del gen E6.

Palabras Clave: Virus del papiloma humano (VPH), oligonucleótidos, oncogén, intratipo.

INTRODUCCIÓN

Los virus que inducen cáncer en animales han desempeñado una función importante en la búsqueda del conocimiento sobre la genética del cáncer en humanos (Klug *et al.*, 2006). La actividad transformadora de estos virus reside en algunos de sus genes, por lo que estos virus oncogénicos se han convertido en potentes herramientas moleculares para el estudio del cáncer y otras enfermedades, así como en la investigación y aplicación de terapias génicas (Sánchez, 2004). El virus del papiloma humano (VPH) es un virus cuyo ADN es circular de cadena doble perteneciente a la familia *papilomaviridae*; ésta originalmente considerada como el género papilomavirus junto con el polyomavirus dentro de la familia *papovaviridae*; fueron separados en dos familias por el comité internacional de taxonomía de virus ICTV (del inglés *International Committee on the Taxonomy of Viruses*) (de Villiers *et al.*, 2004).

Los papilomavirus son capaces de infectar y ocasionar lesiones epiteliales mejor conocidas como verrugas en más de 20 especies de mamíferos, aves y reptiles; en humanos se han encontrado cientos de papilomavirus relacionados con neoplasias malignas y benignas en piel y las membranas mucosas; aproximadamente 40 de los genotipos conocidos han sido detectados en la mucosa anogenital siendo clasificados como VPH de alto y bajo riesgo, asociados a la progresión de lesiones cervicales y verrugas genitales respectivamente (Doorbar, 2005).

Actualmente, el cáncer cervical es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial (Mark *et al.* 2009). Cada año se diagnostican más de 500.000 nuevos casos en el mundo con una mortalidad superior a 275.000 individuos (Schiffman *et al.* 2007). Según el Anuario de Mortalidad del Ministerio del Poder Popular para la Salud del año 2006, en nuestro país el cáncer de cuello uterino se ubica como la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer venezolana.

El método convencional para el diagnóstico del cáncer cervical continúa siendo la citología cérvico-vaginal, su sensibilidad se encuentra entre el 40-80% (Reid *et al.*, 1991; Cox *et al.*, 1995; Cruzick *et al.*, 1995 citado por Cruzick *et al.*, 2000). Este método tiene limitaciones entre las que se encuentra el impedimento de una automatización completa de la técnica, variaciones constantes para mejorar su sensibilidad, además de que únicamente permite sugerir la presencia de una infección por VPH, debido a esto, técnicas para la detección del ADN de VPH como el PCR resulta una herramienta sensible para el diagnóstico (Cruzick *et al.*, 2000).

Virus del papiloma humano (VPH).

En el siglo pasado, gran parte de los papilomavirus identificados y secuenciados completamente se asociaron a una de las principales causas del cáncer de cuello uterino debido a la presencia de ADN del virus en biopsias de tumores cervicales, la expresión de oncogenes virales E6 y E7 en el material tumoral, la identificación de las propiedades transformantes de los oncogenes virales, la expresión continua de los genes E6 y E7 responsables de mantener del fenotipo maligno en células de carcinoma cervical, la interacción de oncoproteínas virales con proteínas reguladoras del crecimiento celular, así como por todos los estudios epidemiológicos que apuntan a la infección por VPH como el principal factor de riesgo de desarrollar cáncer cervical (zur Hausen, 2000).

Clasificación.

En la actualidad se encuentran descritos 118 tipos de papilomavirus cuyos genomas han sido secuenciados completamente. Las propiedades genómicas de estos virus son el punto de partida para su clasificación, siendo los genes L1, E6 y E7 los más estudiados. El ORF (del inglés *Open Reading Frame*) L1 es la región más conservada dentro del genoma del virus por lo cual ha sido utilizada para la identificación y clasificación de estos virus: si al comparar la secuencia del gen L1 esta difiere en más de un 10% se podría considerar un nuevo tipo viral, si la secuencia difiere entre un 2 y 10% se define un subtipo y si la diferencia es menor al 2% entonces se considera como una variante (de Villiers *et al.*, 2004).

de Villiers *et al.*, (2004) realizaron un análisis del gen L1 de 118 tipos de VPH estableciendo los siguientes criterios de clasificación:

1. Los géneros denominados anteriormente supergrupos deben compartir menos del 60% de identidad del gen L1, mientras que deben tener más del 23% pero menos del 43% de identidad en la secuencia nucleotídica del genoma.
2. Los grupos ahora llamados especies deben compartir entre el 60% - 70% de identidad nucleotídica.
3. Dentro de las especies los distintos tipos de papilomavirus deben compartir entre el 71% - 89% de la identidad nucleotídica del gen L1.

Estos criterios permitieron la construcción del árbol filogenético que se muestra a continuación en la Figura 1.

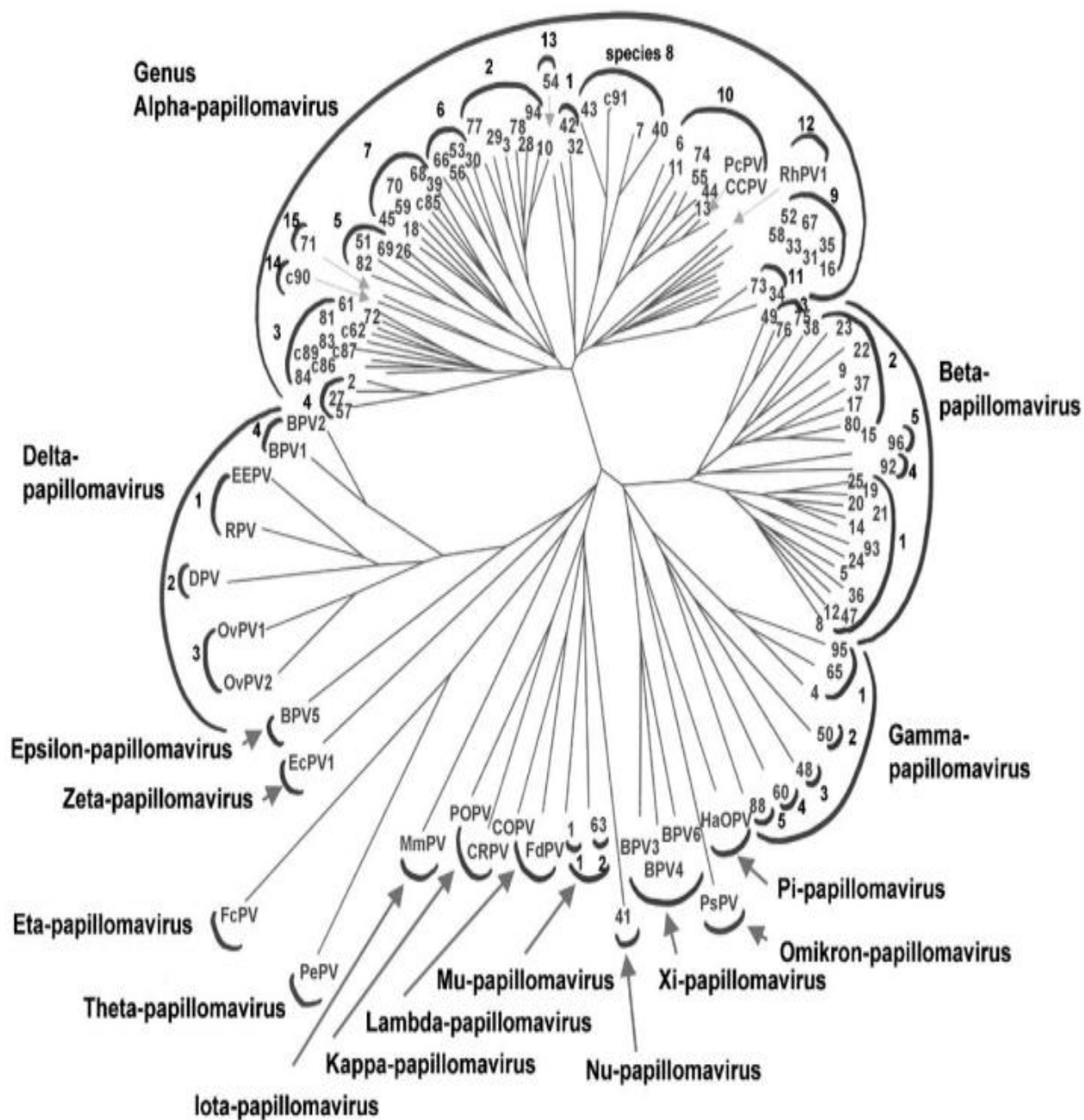


Figura 1. Árbol filogenético de 118 tipos de VPH; clasificados en géneros, especies, tipos, subtipos y variantes. Los números al final de cada rama definen un tipo de VPH, la letra c seguida de un número hace referencia a un candidato para tipo de papilomavirus, las otras abreviaturas hacen referencia a tipos de papilomavirus animales. (de Villiers *et al*, 2004).

De acuerdo a su tropismo los papilomavirus se han clasificado en cutáneos y mucosos (Morales *et al.*, 1997 citado por Guerrero *et al.*, 1999). Los VPH mucosos que infectan el tracto anogenital a su vez se agrupan en virus de alto, intermedio y bajo riesgo (Ver Tabla 1). Según esta clasificación se consideran virus de alto riesgo aquellos que están relacionados con lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (LIE AG) y con ciertos carcinomas anogenitales. Los virus de riesgo intermedio o riesgo desconocido aún no se han asociado con el desarrollo de de lesiones malignas. Mientras que los virus de bajo riesgo se encuentran asociados a lesiones proliferativas benignas y/o lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LIE BG) (Muñoz *et al.*, 2003 citado por Fernández, 2009).

Tabla 1. Clasificación de los papilomavirus de acuerdo a su tropismo y lesiones asociadas al subtipo viral (Márquez, 2005 modificado por Cáceres, 2009).

Clasificación	Sub-tipo Viral	Lesión Asociada
Cutáneos	1, 4	<i>Verruca plantaris</i>
	2, 4	<i>Verruca vulgaris</i>
	3, 10	<i>Verruga plana</i>
	5, 8, 9, 12,14, 15,17, 19, 20, 21	<i>Epidermodisplasia verruciformis</i>
	7 41	Verrugas del carnicero Carcinoma de células escamosas cutáneas
Mucosos	13, 32	Hiperplasia epitelial focal
	55	Papulosis Bowenoide
Bajo Riesgo	6, 11, 32, 34, 40, 42, 43, 44, 53, 57, 81	Condiloma acuminado
Riesgo Intermedio	30, 35, 39, 45, 50, 51, 52, 58, 60, 83	
Alto Riesgo	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 54, 56, 59, 68	Carcinoma de cérvix

Estructura del virión y organización genética.

El virión de los papilomavirus es de aproximadamente 55 nm de diámetro, no encapsulado y con cápside icosaédrica (Figura. 2); se replica en el núcleo de la célula hospedera infectada y posee un tamaño de 8Kb. Su ADN se encuentra asociado a histonas celulares formando complejos parecidos a la cromatina (Howley, 1996 citado por Longworth & Laimins, 2004). Su genoma viral está

dividido en tres regiones principales: temprana, tardía y región larga de control LCR (del inglés *Long Control Region*) o región no codificante NCR (del inglés *Region No Coding*) organizadas en 8 ORF que se transcriben en ARN mensajeros policistrónicos desde una de las cadenas de ADN (Longworth & Laimins, 2004). La región temprana E (del inglés *Early*) ocupa más del 50% del genoma viral y posee 6 ORF. La región tardía L (del inglés *Late*) abarca casi un 40% del genoma, se localiza aguas abajo de la región temprana y alberga 2 ORF, mientras que la región reguladora LCR se ubica entre el ORF L1 y el ORF E6 con una extensión de 850 pb, lo cual constituye un 10% del genoma del virus (Bernard, 2002 citado por Zheng & Baker, 2006). En esta región se encuentra el origen de replicación y múltiples sitios de enlace para los factores de transcripción importantes en la regulación de los promotores virales tempranos (Figura. 3) (Meyers *et al.*, 1995 citado por Dell & Gaston, 2001).

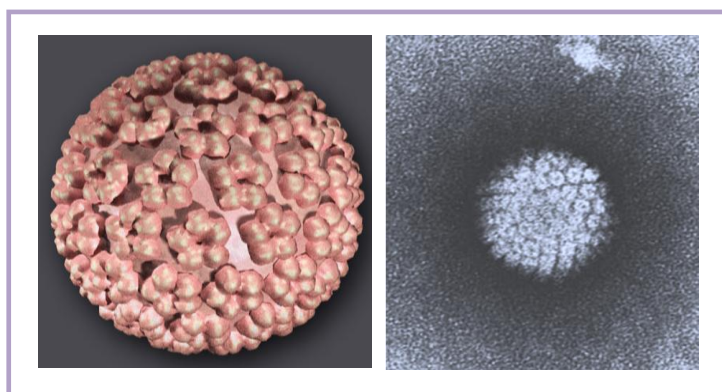


Figura 2. Estructura del virión de papilomavirus. A la izquierda recreación artística del VPH no encapsulado y con cápside icosaédrica. A la derecha microscopía electrónica de transmisión de partículas virales de VPH (Modificado de Spinoso & Muniesca, 2008).

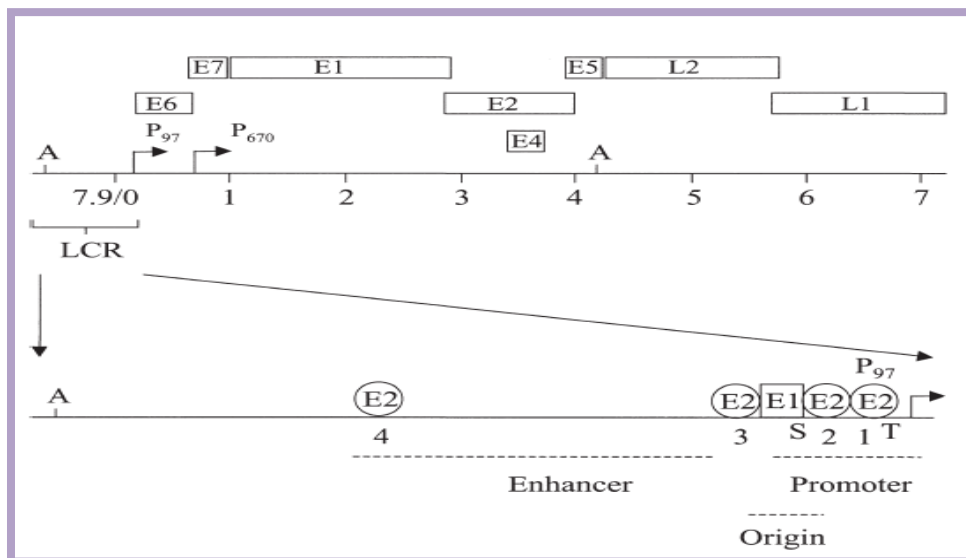


Figura 3. Organización genómica del VPH 16. Los ORF E6, E7, E1, E2, E4, E5 L1 y L2 se muestran ocupando 7.9 Kb. A: señal de poliadenilación. P97: promotor temprano. P670: promotor tardío. La expansión de la región LCR muestra la caja TATA, los sitios 1, 2, 3 y 4 para el enlazamiento de E2 y sitios de unión Sp-1 indicados con S y T (Dell & Gaston, 2001).

Proteínas virales.

El producto de los genes del virus del papiloma humano da origen a la estructura de proteínas tempranas y tardías respectivamente con las propiedades resumidas en la tabla 2:

Tabla 2. Propiedades de los productos génicos del VPH (Modificada de Boulet *et al.*, 2007).

Producto génico	Propiedades
E1	Función helicasa; esencial para la replicación viral y control de la transcripción.
E2	Factor de transcripción viral; esencial para la replicación viral y control de la transcripción.
E4	Interacción con proteínas del citoesqueleto, ensamblamiento viral.
E5	Estimulación del crecimiento por interacción con receptores de factores de crecimiento celular.
E6	Inmortalización celular, degradación de p53; efecto antiapoptótico, inducción de inestabilidad genómica.
E7	Inmortalización celular, interacción con pRB, transactivación del factor de transcripción E2F, inestabilidad genómica.
L1	Proteína mayor de la cápside.
L2	Proteína menor de la cápside, recluta genoma viral por encapsidación y está involucrada en el transporte de ADN viral al núcleo.

Las proteínas tardías L1 y L2 constituyen la cápside icosaédrica; organizada en 72 capsómeros conformados por 360 copias de la proteína L1 y 12 copias de la proteína L2 (Trus *et al.*, 1997 citado por Doorbar, 2006). L2 se expresa primero y es específica de cada tipo viral mientras que L1 es un gen bien conservado dentro del genoma (de Villiers *et al.*, 2004). Debido a señales localizadas en los extremos N-terminal y C-terminal, L2 se une al núcleo asociándose con cuerpos PML (del inglés *Promyelocytic leukaemia*) (Doorbar, 2006), aunque algunos papilomavirus asocian L2 directamente al ADN (Fay *et al.*, 2004 citado por Doorbar, 2006). L1 ensambla en capsómeros en el citoplasma y se ubica en el núcleo asociado a los cuerpos PML solo después que L2 une y desplaza el cuerpo PML (Florin *et al.*, 2002 citado por Doorbar, 2006), no obstante, algunos viriones se ensamblan sin proteína L2, pero la eficiencia en el ensamblaje disminuye (Doorbar, 2006).

E1 es una proteína de 68 KDa con actividad helicasa dependiente de ATP (Hughes & Romanos, 1993) que reconoce secuencias ricas en Adenina y Timina en el origen de replicación, sin embargo, en ausencia de la proteína E2 el reconocimiento no se lleva a cabo o es defectuoso, E2 se une a sitios cercanos de la secuencia de reconocimiento de E1 y por interacciones proteína-proteína E1 aumenta su afinidad por el ADN, formando complejos de hexámeros que desenrollan el ADN con ayuda de proteínas chaperonas (Frattini & Laimins, 1994). E2 es esencial tanto para la replicación viral como para el control de la transcripción (Laimins, 1998 citado por Longworth & Laimins, 2004); posee un peso de 50 KDa, forma dímeros y presenta dos dominios; el dominio C terminal promueve la unión a secuencias específicas de ADN y el dominio N terminal interviene en la activación de la transcripción y replicación viral (Hegde *et al.*, 1992). En general la región larga de control (LCR) de los VPH de alto riesgo posee una zona conservada con 4 sitios de enlazamiento para la proteína E2 (Figura 3), así como numerosos sitios de unión para una variedad de factores de transcripción celular (Dell & Gaston, 2001). Tres de estos sitios flanquean la secuencia de reconocimiento de E1 en el origen de replicación, por consiguiente, la cantidad de proteína E2 dentro de la célula así como su afinidad por estos sitios influye en la activación o represión del promotor viral (Longworth & Laimins, 2004).

El producto del ORF E4 se expresa en estado tardío de la infección cuando los viriones son ensamblados, desempeña un papel importante en la maduración y replicación del virus (Brown *et al.*, 1994 citado por Motoyama *et al.*, 2004) induciendo colapso en el citoesqueleto; situación que explicaría la liberación de los viriones desde la células infectadas (Doorbar *et al.*, 1991). El ORF E4 carece del codón de iniciación AUG por lo que utiliza una parte de la secuencia de E1; el transcripto de los primeros 5 aminoácidos que genera una proteína de fusión E1-E4 para el inicio de la traducción (Howley, 1996 citado por Longworth & Laimins, 2004).

E5 es una proteína dimérica de aproximadamente 80 aminoácidos (Halbert & Galloway, 1988) con naturaleza hidrofóbica que se localiza en la membrana endosomal, en el aparato de Golgi y en ocasiones en membranas celulares (Burkhardt *et al.*, 1989 citado por zur Hausen, 2000). Esta proteína se expresa durante la fase tardía del ciclo de vida en las células diferenciadas del epitelio (Fehrmann *et al.*, 2003 citado por Longworth & Laimins, 2004), la pérdida de la expresión de E5 producto de la integración viral sugiere que no está involucrada en la tumorigénesis, no obstante, se expresa en algunos cánceres que poseen ADN de VPH episomal (Chang *et al.*, 2001 citado por Dell & Gaston, 2001).

El ORF E6 codifica para una proteína pequeña de aproximadamente 150 aminoácidos con un peso molecular de 18 kDa (Androphy *et al.*, 1987). E6 contiene motivos Cys-X-X-Cys (Cole & Danos, 1987; Barbosa *et al.*, 1989) (Figura 4) con función importante en la activación transcripcional, transformación, immortalización y asociación con proteínas celulares entre las que se encuentra p53 (Boulet *et al.*, 2007). En los VPH de alto riesgo la región C-terminal posee un dominio de reconocimiento PDZ involucrado en la interacción con varias proteínas responsables de la regulación de la proliferación celular, las cuales presentan dominios PDZ (Doyle *et al.*, 1996; Songyang *et al.*, 1997 citado por Mantovani & Banks, 2001).

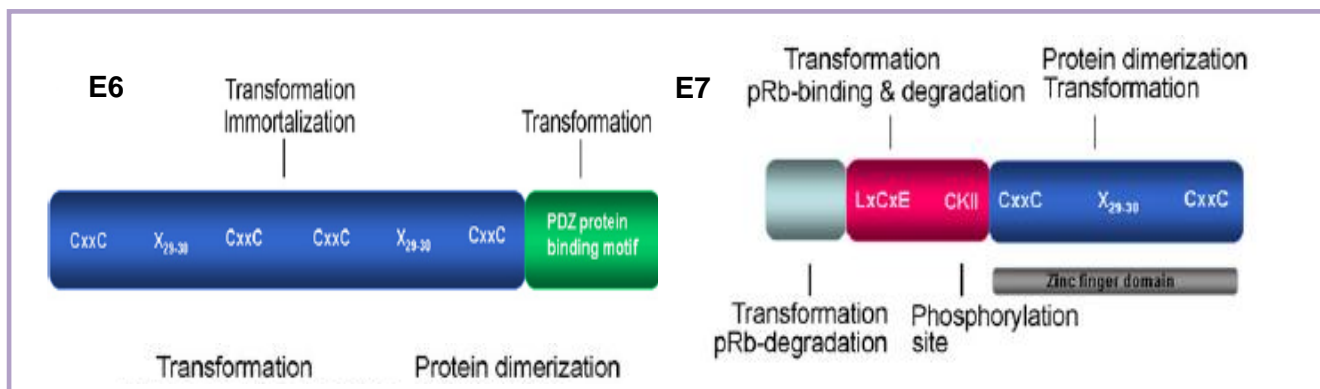


Figura 4. Representación esquemática las oncoproteínas E6 y E7. La proteína E6 representada en azul es de aproximadamente 150 aminoácidos posee 4 motivos CxxC importantes para activación transcripcional, transformación, immortalización y asociación con proteínas celulares, en su extremo C-terminal (en verde) posee un dominio de enlazamiento PDZ involucrado en la en la interacción con proteínas celulares que poseen motivo PDZ. E7, un polipéptido predominantemente nuclear de 100 aminoácidos aproximadamente muestra tres regiones conservadas; la primera, el dominio N-terminal (en gris) necesario para la transformación celular y degradación de pRb. La segunda región conservada (en fucsia) posee el dominio de enlazamiento y degradación de pRb (LxCxE y sitio de fosforilación para la Kinasa II). En azul se muestra el dominio C-terminal (que posee 2 copias CxxC) involucrado en la asociación con pRb y otras proteínas, dimerización y unión a zinc (Boulet *et al.*, 2007).

El gen E7 codifica para una proteína predominantemente nuclear de aproximadamente 100 aminoácidos (Smotkin & Wettstein, 1986), presenta 3 regiones conservadas (Figura 4); el dominio N-terminal necesario para la transformación y degradación de la proteína retinoblastoma (pRb), la región conservada que contiene el sitio de unión de pRb de secuencia LxCxE junto con el sitio de fosforilación para CKII, y finalmente, el dominio C-terminal que posee 2 copias del motivo C-x-x-C relacionado con E6, que en unión con metales se encuentra implicado en la dimerización (Phelps *et al.*, 1992; Boulet *et al.*, 2007). La unión de E7 a pRb (Banks *et al.*, 1990) causa la liberación, por fosforilación, del factor de transcripción E2F que promueve el ciclo celular, a su vez E7 unida a pRb media la degradación por proteólisis de retinoblastoma (Dell & Gaston, 2001).

Propiedades transformantes de los oncogenes virales.

Las proteínas E6 y E7 de los VPH de alto riesgo son las principales mediadoras de la carcinogénesis debido a su interacción con varios blancos celulares (zur Hausen, 2000). E6 activa telomerasas y kinasas SRC e inhibe p53 y BAK; actuando como represor de la apoptosis y mediador de la supervivencia de las células que poseen daños significativos, mientras que E7, inhibe pRb y estimula ciclinas promoviendo la replicación y el crecimiento celular (Figura 5) (Boulet *et al.*, 2007). Independientemente ambas proteínas inmortalizan células humanas, pero su función conjunta genera un interesante sinergismo que incrementa la actividad transformante (zur Hausen, 2000).

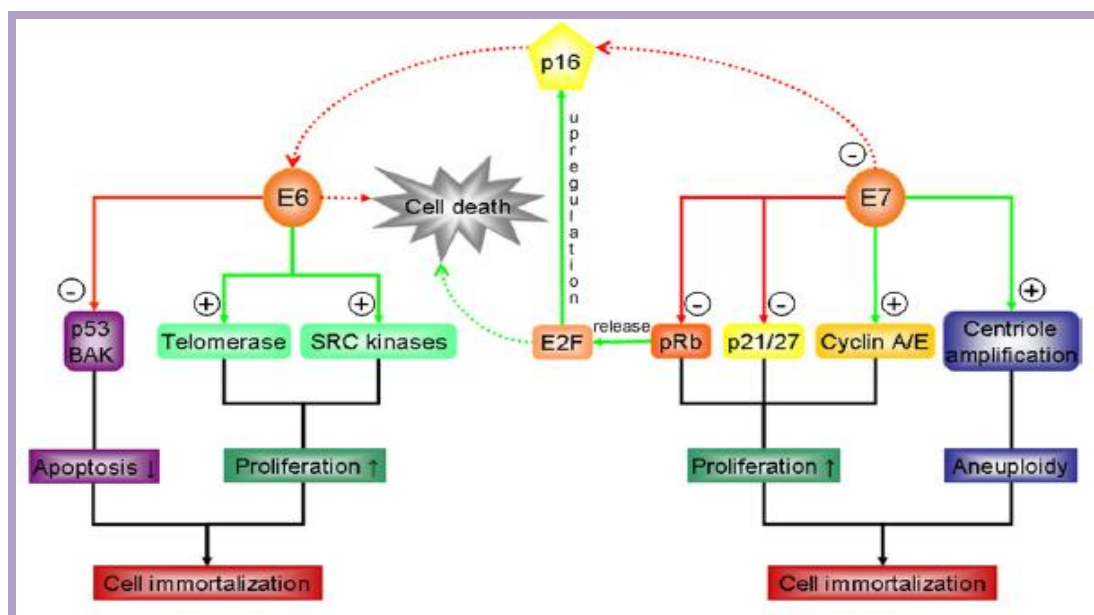


Figura 5. Interacciones celulares de las oncoproteínas E6 y E7 e inducción de a la inmortalización de las células. La proteína E6 incrementa la vida celular por sobreactivación de telomerasas y kinasas SRC al mismo tiempo que inhibe la función de p53 y la proteína proapoptótica Bak. E7 inhibe la proteína pRb y los inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas p21 y p27 al mismo tiempo que estimula la actividad kinasa de las ciclinas A y E así como la amplificación del centriolo. La unión de E7 a pRb promueve la liberación del factor de la transcripción E2F y la sobreexpresión de p16, el cual es inactivado por E7 mientras que E6 impide la apoptosis inducida por los altos niveles de E2F. Juntas E6 y E7 incrementan la actividad transformante (Boulet *et al.*, 2007).

La primera evidencia de que E6 es una oncoproteína viral viene de los estudios en tumores cervicales y líneas celulares derivadas donde se encontró que lograba ser retenida y expresada años después del evento inicial de transformación (Schwarz *et al.*, 1985; Androphy *et al.*, 1987; Banks *et al.*, 1987 citado por Mantovani & Banks, 2001), éstos, junto con el análisis de los blancos celulares de E6 demostró su contribución en la transformación; teniendo como primer blanco identificado y probablemente todavía el más importante la proteína p53 (Mantovani & Banks, 2001).

p53 es una proteína supresora de tumores que protege al ADN de mutaciones (Klug *et al.*, 2006) Desde su descubrimiento en 1979 por los estudios de Lane & Crawford (1979) esta proteína se convirtió en el centro de atención de muchos estudios dado que su función principal es controlar la progresión del ciclo celular. Cuando el ADN celular sufre algún daño p53 activa la transcripción de los genes que codifican p21 ó GADD45, retardando la entrada en fase S del ciclo celular hasta que se produzca la reparación del ADN, alternativamente, p53 puede inducir la apoptosis mediante la activación de los genes Bax y represión del gen Bcl2 (Spitkovsky *et al.*, 1996 citado por Motoyama *et al.*, 2004). Cuando los genes supresores de tumores están mutados o inactivos, las células no pueden responder normalmente a los puntos de control del ciclo celular y son incapaces de realizar muerte celular programada si el daño en el ADN es significativo, esto, conduce a un incremento en las mutaciones y a la incapacidad de la célula de dejar el ciclo celular (Klug *et al.*, 2006). La apoptosis y la mitosis están estrechamente interrelacionadas, existe evidencia de mecanismos multifactoriales complejos de control, tales como la expresión de los genes que codifican para p53, c-myc, c-fos, bax y bcl2 que determinan si las células progresan hacia mitosis o apoptosis tanto en tejidos normales como neoplásicos (Tjalma *et al.*, 2005).

La proteína E6 de los VPH de alto riesgo une p53 en conjunción con ubiquitin-ligasa E6-AP (Huibnegtse *et al.*, 1991), la ubiquitinación de p53 resultado de la formación del complejo E6-AP-p53 reduce significativamente la vida media de p53 (Scheffner *et al.*, 1990) y gracias a la degradación mediada por proteosoma, disminuyen los niveles de p53 permitiendo la replicación viral (Lepik *et al.*, 1998; Lepik & Ustav, 2000 citado por Dell & Gaston, 2001) (Figura 6). Se ha demostrado que una vez que E6 une el complejo E6-AP puede unir proteínas celulares y mediar su degradación (Tungteakkhun & Duerksen-Hughes, 2008).

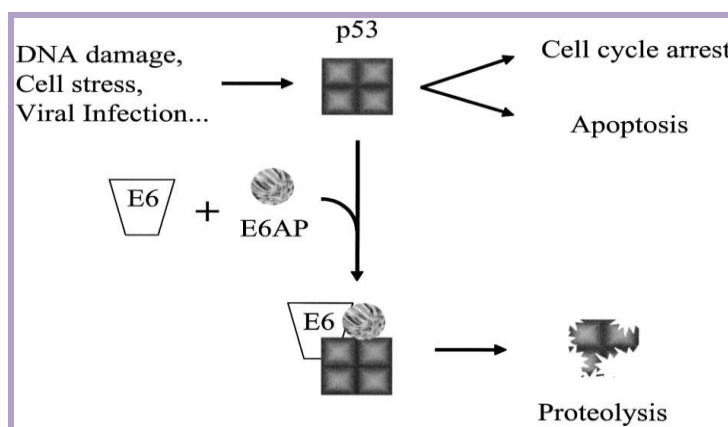


Figura 6. Proteína E6 une p53 en conjunción con E6-AP. Cuando las células están sometidas a cualquier tipo de estrés; bien sea producto de daños en el ADN y/o de la infección por VPH si p53 se encuentra activa induce la apoptosis o detiene el ciclo celular, la proteína E6 junto con la ubiquitin ligasa E6-AP une p53 y promueve su degradación (Dell & Gaston, 2001).

Los patrones de unión en las interacciones de la oncoproteína E6 con proteínas celulares han sido identificados por sobreexpresión *in vivo* de estas proteínas. Las proteínas que son blanco de E6 intervienen en la apoptosis, regulación de la transcripción, estabilidad cromosómica, diferenciación y organización epitelial, adherencia célula-célula, polaridad y en el control de la proliferación de células infectadas (Tabla 3) (Mantovani & Banks, 2001). E6 afecta a dichas proteínas a nivel de la transcripción así como por formación de complejos (Tungteakkhun & Duerksen-Hughes, 2008).

Tabla 3. Función celular de los blancos de E6 según tipo de riesgo asociado a VPH (Modificada de Mantovani & Banks, 2001).

Proteína blanco	E6-AR	E6-BR	Degradación	Función celular
p53	Si	Si	Si	Supresor de tumores, Factor de transcripción, induce la apoptosis.
E6AP	Si	No	Si	Ubiquitin-ligasa.
hMcm7	Si	Si	Si	Inicia la replicación de ADN.
E6TP1	Si	Si	Si	Proteína GAP putativa.
Bak	Si	Si	Si	Induce apoptosis.
c-Myc	Si	No	Si	Factor de transcripción.
P300/CBP	Si	Si	No	Coactivador transcripcional.
AMF-1/Gps2	Si	Si	Si	Coactivador transcripcional.
IRF-3	Si (VPH16)	No	No	Factor de transcripción.
E6BP/ERC-55	Si	No	No	Proteína de unión Ca ²⁺
Paxilina	Si	No	No	Transducción de señales.
hDlg	Si	No	Si	Transducción.
MAGI-1	Si	No	Si	Control de polaridad y crecimiento celular.
MUPP-1	Si	No	Si	Señal de transducción putativa.
hScrib	Si	No	Si	Control de polaridad y crecimiento celular.

AR: alto riesgo; BR: bajo riesgo

Virus del papiloma humano y cáncer cervical.

Durante la progresión a cáncer, se generan cambios importantes en la expresión de los genes virales; estos cambios en el patrón de expresión son diferentes dependiendo del tipo viral (alto o bajo riesgo). Los VPH que infectan el epitelio cervical atacan la capa basal y junto con el proceso de diferenciación de las células pueden migrar hacia las diferentes capas del epitelio para sufrir replicación viral (Dell & Gaston, 2001). Normalmente, durante la infección con VPH el genoma viral se mantiene en bajo número de copias como episoma y durante la diferenciación del epitelio se incrementa la expresión de las proteínas E1, E2, E4 y E5 así como L1 y L2 produciendo el ensamblamiento y la liberación de los viriones. En la progresión a cáncer cervical, la producción de viriones se restringe a pequeñas áreas en la superficie del epitelio y la integración del genoma del virus en el genoma de la células va acompañado de la pérdida de la regulación de la expresión de E6 y E7, así como la pérdida de los genes E2, E1 y L1 (Figura 7) (Doorbar, 2005; Doorbar, 2006). Debido a la interrupción del ORF de E1 y E2 se genera sobreexpresión de los oncogenes E6 y E7 que favorece la transformación maligna (Yu *et al.*, 2005; Cricca *et al.*, 2007). La integración viral genera la reorganización no sólo del genoma del VPH sino también de la región que rodea el sitio de integración dentro del genoma humano, el VPH se integra en varios lugares del genoma humano por lo que muchos investigadores concluyen que la integración es un evento aleatorio, no obstante, sólo algunas integraciones sitio específicas contribuyen a la transformación maligna (Yu *et al.*, 2005).

La zona de transformación cervical (Figura 8) punto donde cambia la naturaleza del epitelio del cérvix y de la pared uterina, es una zona de transformación dinámica gradual donde el epitelio glandular es reemplazado por epitelio escamoso estratificado, es en este lugar donde con mayor frecuencia se originan los carcinomas; desarrollo que suele ir precedido por alteraciones histológicas de las células epiteliales escamosas; generando células anormales que presentan un patrón estratificado irregular, un índice núcleo-citoplasma elevado, variaciones de tamaño y forma junto con un aumento de la actividad mitótica (Schiffman *et al.* 2007; Stevens & Lowe, 2006).

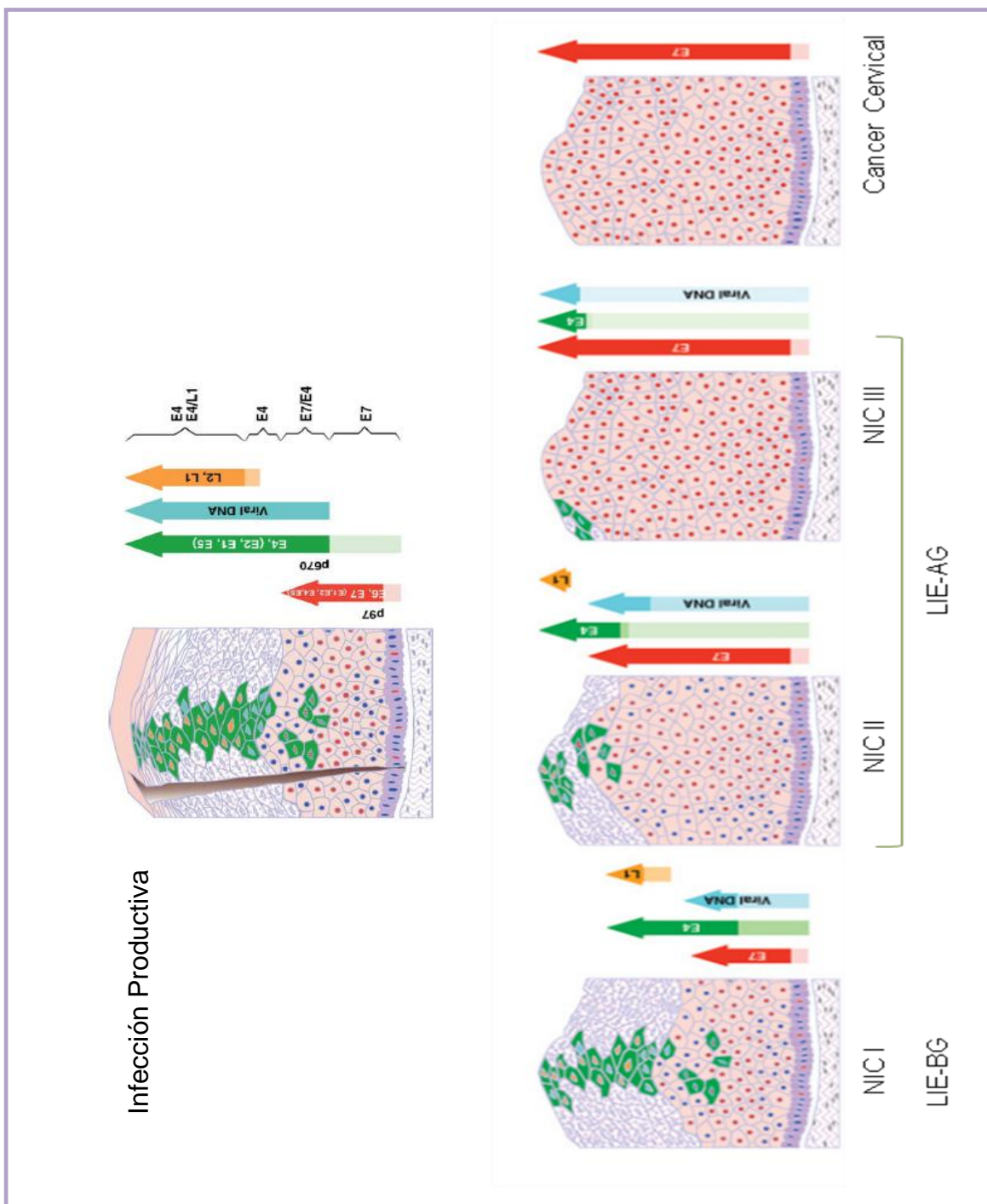


Figura 7. Expresión de los genes de VPH durante la progresión a cáncer cervical. Durante la infección productiva el genoma viral se mantiene en bajo número de copias como episoma y durante la diferenciación del epitelio se incrementa la expresión de las proteínas E1, E2, E4 y E5 así como L1 y L2 produciendo el ensamblamiento y la liberación de los viriones. En la progresión a cáncer, un NIC I generalmente presenta los mismos eventos de una infección productiva. En los NIC II y NIC III la producción de viriones se restringe a pequeñas áreas en la superficie del epitelio, la integración del genoma del virus en el genoma de las células va acompañada de la pérdida de la regulación de la expresión de E6 y E7, así como la pérdida de los genes E2, E1 y L1. En un cáncer cervical no se mantienen los estados productivos del ciclo de vida y la infección la forma episomal se pierde (Modificada de Doorbar, 2005; Doorbar, 2006).

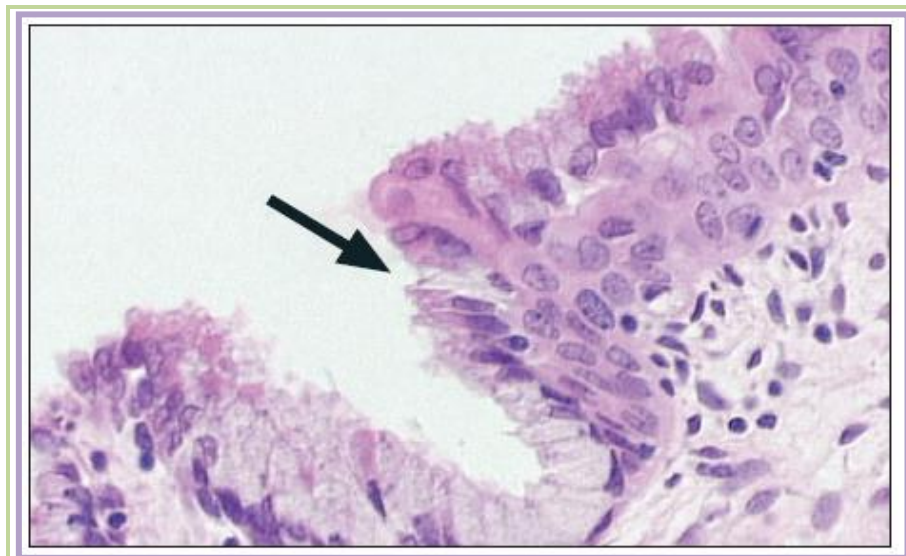


Figura 8. Zona de transformación cervical. La flecha indica la zona de unión del epitelio columnar de la endocervix con el epitelio escamoso estratificado de la exocervix. Esta zona es especialmente susceptible a la carcinogénesis causada por la infección persistente con VPH (Schiffman *et al.* 2007).

Las infecciones por papilomavirus suelen presentarse en forma clínica, subclínica y latente. La fase clínica se presenta con diferentes formaciones condilomatosas; las cuales comúnmente se observan en la vulva o en el epitelio escamoso, las lesiones de la fase subclínica con frecuencia se localizan en el cérvix y únicamente se detectan por colposcopia, en la fase latente; en la que no existen lesiones, la prioridad es determinar la presencia del ADN de VPH utilizando técnicas moleculares. La infección clínica como la subclínica se asocian a cambios morfológicos que conducen a neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (Trejo-Solórzano *et al.*, 2007). La neoplasia intraepitelial cervical es el conjunto de alteraciones progresivas de la maduración y la diferenciación celular del epitelio escamoso que van desde la mínima alteración estructural (displasia leve) al carcinoma *in situ* (Richart, 1967). En términos histopatológicos, un NCI I afecta la maduración de 2/3 de la superficie del epitelio, presentando atipias nucleares en 1/3 basal con mitosis anormales escasas. Un NCI II, presenta maduración de las capas superficiales con atipias nucleares próximas a la superficie y mitosis anormales más frecuentes, mientras que en un NCI III existe escasa maduración, las atipias nucleares se evidencian en todas las capas celulares (en el caso de displasias severas hay mayor variación en la forma y tamaño de los núcleos que en un carcinoma *in situ*, donde tienden a ser ovoides e hiper cromáticos) y la mitosis se encuentra en todos los niveles variando en cantidad y en su mayoría son atípicas (Figura 9) (Grases *et al.* 2006).

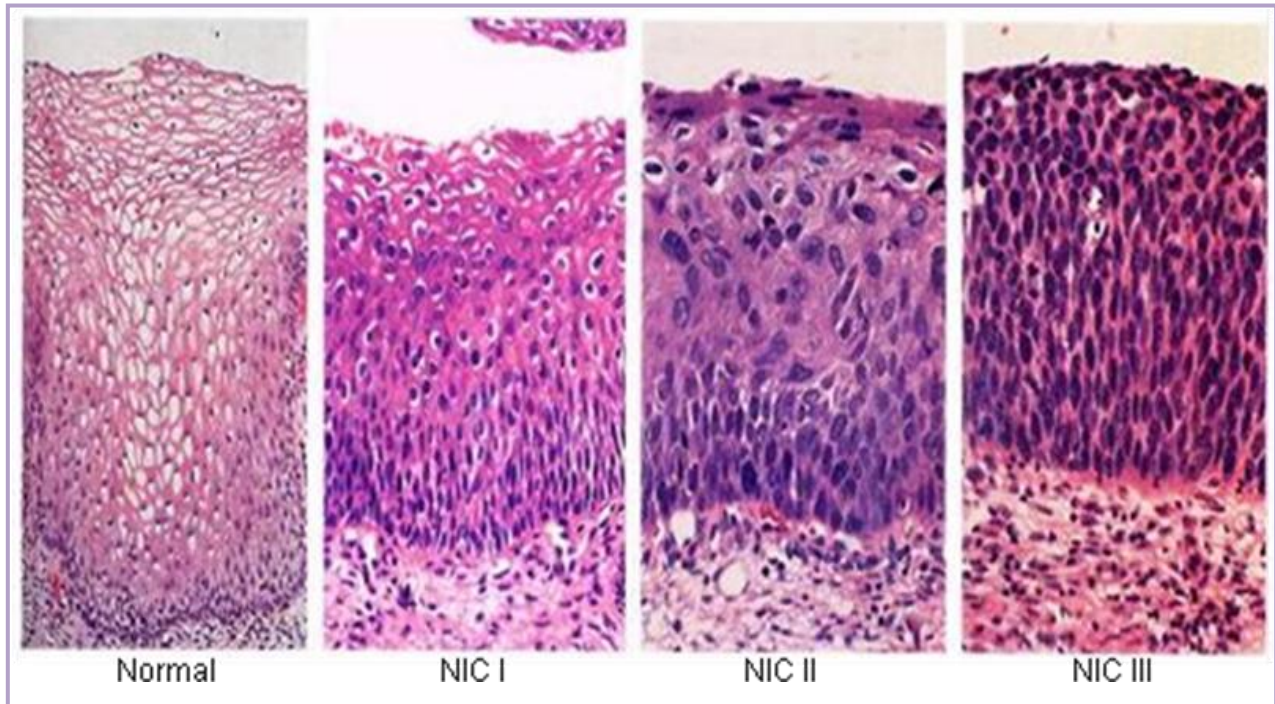


Figura 9. Cambios en la maduración y la diferenciación celular del epitelio escamoso. Un NCI I afecta la maduración de 2/3 de la superficie del epitelio. Un NCI II presenta maduración de las capas superficiales con atipias nucleares próximas a la superficie y mitosis anormales en NCI III existe escasa maduración, las atipias nucleares se evidencian en todas las capas celulares y la mitosis se encuentra en todos los niveles (Talaat, S. & Tadros, MD., 2008)

Diagnóstico convencional del virus del papiloma humano.

Desde hace más de 50 años la citología cérvico-vaginal realizada por el método de Papanicolaou ha sido el procedimiento de rutina para el monitoreo y diagnóstico del cáncer de cuello uterino (Brestovac *et al.*, 2005). Esta metodología permite sugerir la presencia de infección por VPH mediante la evaluación de los cambios que sufren las células de las capas superficiales del epitelio escamoso, las cuales poseen características morfológicas y de tinción bien definida. Un cambio citológico diagnóstico de VPH es la célula coilocítica o coilocito, cuyas características morfológicas completas se consideran patognomónicas de la infección. Estas células superficiales presentan un halo perinuclear amplio e irregular, condensación citoplasmática periférica, hipercromacia y angulaciones nucleares con o sin multinucleación. Otras células asociadas a la infección por VPH son los disqueratocitos y las células parabasales, células con núcleos picnóticos y núcleos atípicos sin angulaciones respectivamente (Torres, 1998).

La colposcopia, es la técnica o procedimiento que permite visualizar mediante un aparato binocular (colposcopio) áreas específicas de células infectadas por el virus; gracias a la reacción producida por la aplicación de ácido acético diluido y/o lugol sobre el tejido, generando zonas blanquecinas temporales para identificar cambios sutiles del epitelio inapreciables a simple vista. El estudio colposcópico tiene la finalidad de confirmar la lesión, determinar sus características y seleccionar la conducta terapéutica o tratamiento a seguir (De Palo, 1996). Otro tipo de diagnóstico es el histopatológico, que permite determinar el grado de extensión de la lesión; se analizan fragmentos de tejido obtenidos a partir de una biopsia bajo el microscopio, logrando diferenciar los estratos del epitelio infectado y el área de invasión (García, 2005; Márquez, 2005).

Diagnóstico de VPH por métodos moleculares.

El desarrollo de la tecnología para verificar la presencia de ADN de VPH en especímenes celulares, así como la capacidad de discriminar entre los grupos de alto/intermedio y bajo riesgo, tuvo sus inicios a principios de los años 80. Según Bosch *et al.* (2002) la evolución en las técnicas de investigación para detectar e identificar el virus del papiloma humano en cáncer cervical incluyen: entre 1980-1990; Southern blot, Hibridación *in situ* (HI) y PCR-tipo específica y para los años 1990-2000; Captura de híbridos (HC) y PCR-primer general.

El Southern blot se basa en la digestión del ADN viral con enzimas de restricción, los fragmentos generados se separan por electroforesis y el patrón de bandas es transferido a una membrana de nylon e hibridado con sondas específicas, posteriormente, se compara con patrones controles (Klug *et al.*, 2006). La HI se basa en la utilización de sondas de ADN o ARN marcadas capaces de hibridar con el ADN de VPH intracelular, ésta técnica permite localizar la infección en las muestras facilitando la correlación entre la presencia del virus y el estado morfológico del tejido (Molijn *et al.*, 2005). Estos métodos poseen baja sensibilidad debido a que se requieren grandes cantidades de ADN viral aunado a su alto costo y laboriosidad para ser aplicados en monitoreos masivos de la población así como en investigación (Márquez, 2005; Fernández, 2009).

La Captura de Híbridos (HC) es un método que utiliza sondas que tienen la capacidad de hibridar con el ADN viral en solución (Lorincz, 1996; Bozzetti *et al.*, 2000 citado por Molijn *et al.*, 2005). La HC II (Hc2) detecta 13 tipos de VPH de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y 5 tipos de VPH de bajo riesgo oncogénico (6, 11, 42, 43 y 44), está estandarizada y es sumamente reproducible.

Esta técnica es reconocida por la FDA estadounidense (*Foods and Drugs Administration*) como único método de diagnóstico *in vitro* del VPH. La HC II genera señales de luz proporcionales a la cantidad de ADN del VPH presente en la muestra; el principio de la técnica es la formación de híbridos ADN-ARN que se exponen al reconocimiento de anticuerpos que están acoplados a moléculas quimioluminiscentes (Molijn *et al.*, 2005). La HC proporciona una sensibilidad cercana a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), no obstante, muestra desventajas: solo puede realizarse sobre muestras cervicales extendidas en base líquida y no en tejido incluido en parafina, la tipificación no es exacta; ya que no especifica el tipo viral que está produciendo la infección (Smits *et al.*, 1995; Cope *et al.*, 1997 citado por Molijn *et al.*, 2005).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es el método de amplificación de ADN más utilizado para obtener múltiples copias a partir de un único fragmento de ADN (Molijn *et al.*, 2005). La amplificación de un fragmento específico de ADN se lleva a cabo mediante el uso de oligonucleótidos sintéticos; conocidos como *primers*, capaces de hibridar con la secuencia a amplificar y delimitar la región de amplificación, son necesarios además dNTPs (desoxirribonucleótidos), así como una ADN polimerasa termoresistente encargada de adicionar los dNTPs para generar múltiples copias del fragmento de ADN; esto ocurre en ciclos repetidos de tres reacciones con cambios en la temperatura que implican desnaturalización, alineación y extensión en un aparato termociclador. En teoría la cantidad de ADN amplificado está limitada por el número de repetición de ciclos (García, 2005; Márquez, 2005; Klug *et al.*, 2006).

Las ventajas de el PCR incluyen la sensibilidad, rapidez y especificidad en la detección de secuencias de ADN en muestras con escaso material genético, además de que este último no requiere estar purificado ni clonado (Márquez, 2005). Schiffman *et al.* (1991) compararon el Southern blot y el PCR como métodos para la detección de ADN de VPH, validaron el PCR como un método sensible para verificar posibles infecciones mixtas en mujeres. Años más tarde se alcanzaron acuerdos de diagnóstico que condujeron al uso amplio de esta técnica.

Dos métodos de PCR son relevantes para la detección de ADN de VPH: el PCR tipo específico y el PCR general o de amplio espectro (Figura 10), el primero implica la realización de múltiples reacciones por separado para detectar la presencia de ADN de VPH en una sola muestra, lo cual requiere de una labor intensa, mientras que, el PCR general utiliza oligonucleótidos que permiten detectar un gran número de genotipos de VPH, tales oligonucleótidos tienen como blanco una región conservada en los diferentes genotipos de papilomavirus (Molijn *et al.*, 2005).

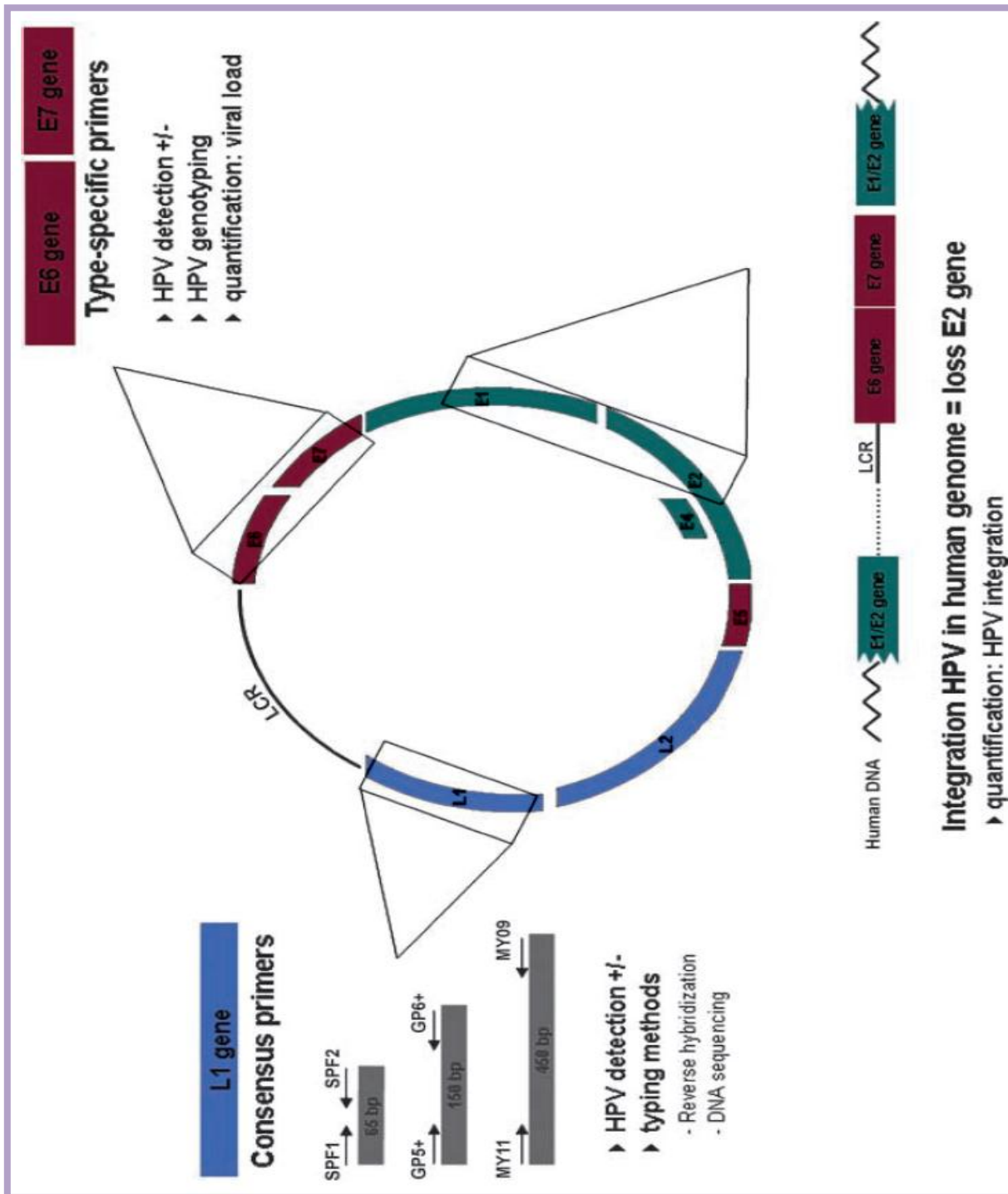


Figura 10. Regiones para la detección de VPH mediante PCR tipo específica y PCR general o de amplio espectro. Se muestra una representación esquemática de las regiones del genoma del virus que son importantes para el análisis por PCR. En la región L1 los oligonucleótidos consenso SPF, GP5+/GP6+ y MY09/11 tienen como blanco diferentes regiones conservadas dentro del Gen L1 permitiendo la amplificación de muchos tipos de VPH en una sola reacción. Para la región E6/E7 el diseño de oligonucleótidos tipo específicos permite la amplificación de sólo un tipo de VPH, lo que implica múltiples reacciones. El PCR Tiempo Real permite establecer la presencia del virus, su genotipo y la carga vira; la cuantificación de el gen E2 permite determinar el estado de integración del virus (Boulet *et al.*, 2008).

El método de PCR general más popular es el que amplifica el gen L1 utilizando los oligonucleótidos MY09/MY11, GP5+/GP6+, entre otros. La desventaja de este sistema de PCR, es que el ORF del gen que se usa como blanco para la amplificación puede perderse cuando el virus se integra en el genoma de la célula hospedera, por lo que se ha empleado el sistema PCR tipo específica; que utiliza oligonucleótidos para los genes E6 y E7 (Figura 10), los cuales se mantienen intactos y nunca se pierden durante la integración viral y además poseen secuencias nucleotídicas ligeramente variables, del mismo modo, estos genes admiten el empleo de sistemas de PCR como el PCR cuantitativo (PCR tiempo real), que permite determinar carga viral (Boulet *et al.*, 2008; Morris, 2005).

Park *et al.* (1993) evaluaron la eficiencia de los oligonucleótidos MY09/MY11 y de oligonucleótidos específicos para E6 en la detección de VPH, reportaron una tasa de detección significativamente alta con los oligonucleótidos E6 de 54% en comparación con un 26% para los oligonucleótidos L1, no obstante, a pesar de los resultados obtenidos, apoyan el uso de los oligonucleótidos consenso L1 por su capacidad para detectar simultáneamente varios tipos de VPH. Resnick *et al.* (1990) así como también Yoshikawa *et al.* (1991) diseñan sistemas para la detección de VPH que emplean oligonucleótidos consenso E6, tipificando por Southern Blot y RFLP respectivamente, diez años más tarde, Sasagawa *et al.* (2000) amplifican todo el gen E6 y parte N-terminal del gen E7 de más de 34 papilomavirus, estos amplificados, son analizados mediante RFLP para tipificación. De igual modo, Sotlar *et al.* (2004) diseñan un sistema PCR nested multiplex del gen E6 que permite tipificar por diferencias en el tamaño de los amplificados.

El producto de la amplificación por PCR general o de amplio espectro puede ser analizado mediante varios métodos, como lo son: la hibridación en placas de microvaloración, el secuenciamiento directo, el análisis de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción, la hibridación con sondas específicas (hibridación reversa), el polimorfismo de conformación de cadena sencilla, entre otros (Boulet *et al.*, 2008).

Polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP).

La técnica de SSCP es una técnica que permite detectar variaciones en secuencias nucleotídicas, mutaciones y polimorfismos; ésta se basa en la movilidad electroforética de una hebra de ADN en función de su estructura conformacional y peso molecular (Orita *et al.*, 1989). Cualquier cambio incluso de una sola base en los fragmentos que se amplifican, pueden detectarse en relación directa con los cambios en los patrones de movilidad electroforética (Cruz, 2003; Márquez, 2005).

La PCR-SSCP se ha utilizado para la tipificación del virus del papiloma humano permitiendo identificar en una sola reacción varios tipos de VPH (Alonio *et al.*, 2000; Gómez *et al.* 2001). En Suecia Zehbe *et al.* (1996) detectaron y tipificaron 12 tipos de VPH mediante PCR-SSCP empleando los oligonucleotidos consenso GP5+/GP6+, mientras que Alonio *et al.* (2000) en México del mismo modo que Gómez *et al.* (2001) en argentina diseñan sistemas de PCR-SSCP para diagnostico y tipificación de 6 y 7 tipos de VPH respectivamente, empleando los oligonucleótidos MY09/MY11 y GP5+/GP6+ demostrando que esta metodología es eficiente y altamente reproducible.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A nivel mundial la mayoría de las pruebas para la detección del ADN viral por PCR tienen como blanco la región L1. Esta metodología ha demostrado ser eficiente y altamente reproducible, sin embargo, el efecto oncogénico del virus es dependiente de la expresión continua de los genes E6 y E7; necesaria para la persistencia y transformación de los fenotipos malignos de las células, por lo cual se puede incurrir en diagnósticos falso-negativos a causa de la integración del virus en el genoma de las células.

Estrategias dirigidas a la región E6/E7 del genoma del virus, son prometedoras para el diagnóstico del VPH, ya que, entre los tipos de alto y bajo riesgo estas secuencias difieren y su uniformidad en cada tipo de papilomavirus significa menor probabilidad de alineamientos no específicos durante la PCR (Morris, 2005).

La cantidad de tipos virales infectantes detectados en la población merideña es considerable. Estudios realizados por Quintero *et al.* (2008), reportan como tipos virales más frecuentes para la población merideña: 6, 16, 31, 53, 59, 61 y 68. A nivel mundial, los tipos de VPH 6, 11, 16 y 18 son los más frecuentes, siendo 16 y 18 de alto riesgo oncogénico, el VPH tipo 18 es el segundo tipo más común en mujeres infectadas (de Sanjosé *et al.*, 2007).

Actualmente, el Laboratorio de Biología y Medicina Experimental (LABIOMEX) realiza la detección y tipificación del VPH en muestras de pacientes que asisten a consulta pública y privada, provenientes de la población merideña y de otras regiones del país mediante la técnica PCR-RFLP del gen L1. Por lo tanto, resulta necesario diseñar y estandarizar un sistema de PCR que permita detectar un amplio espectro de tipos de VPH en una sola reacción utilizando como blanco la región E6, con miras a disminuir la realización de posteriores ensayos de confirmación y mejorar el diagnóstico y seguimiento de los procesos malignos asociados al virus.

HIPÓTESIS

La variabilidad de la secuencia del gen E6 entre los distintos tipos de VPH permitiría diseñar un sistema de PCR-SSCP capaz de detectar y tipificar el virus a partir de muestras del área genital incluso en aquellos casos donde se sospecha de integración viral.

OBJETIVO GENERAL

Diseñar un sistema de PCR-SSCP del gen E6 de VPH que permita detectar y tipificar la presencia del virus en muestras del área genital.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Diseñar un par de oligonucleótidos iniciadores consenso-degenerados para amplificar un fragmento del gen E6 de 25 tipos de VPH incluyendo tipos de alto y bajo riesgo.
- ✓ Realizar una revisión retrospectiva y seleccionar las muestras que resultaron positivas para los 25 tipos de VPH durante el periodo de diagnóstico Junio 2007-Enero 2009.
- ✓ Cuantificar la cantidad de ADN de muestras ya purificadas y tipificadas mediante PCR-RFLP del gen L1 por métodos espectrofotométricos.
- ✓ Estandarizar un sistema de PCR que permita amplificar un segmento del gen E6, utilizando los oligonucleótidos diseñados, a partir de las muestras de ADN ya tipificadas por PCR-RFLP del gen L1.
- ✓ Evaluar la sensibilidad de los oligonucleótidos diseñados comparándolos con el sistema MY09/MY11.
- ✓ Examinar casos en los cuales las muestras resultaron negativas para VPH por el sistema MY09/11.
- ✓ Optimizar la técnica SSCP para determinar los patrones de movilidad electroforética de los VPH tipo 6, 11,16 y 18.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de oligonucleótidos consenso degenerados.

Mediante un estudio paralelo llevado a cabo en el Laboratorio de Biología y Medicina Experimental LABIOMEX-ULA, en el cual se realiza la detección y tipificación del VPH en muestras de pacientes que asisten a consulta pública y privada, provenientes de la población merideña y de otras regiones del país mediante la técnica PCR-RFLP del gen L1, 25 tipos de papilomavirus fueron detectados y tipificados (45, 83, 33, 31, 11, 58, 39, 56, 35, 52, 54, 66, 62, 59, 80, 26, 70, 44, 67, 51, 61, 6, 53, 16 y 18) en el período de diagnóstico comprendido entre Junio 2007-Mayo 2008. Se ubicaron las secuencias del gen E6 de estos 25 tipos de VPH en la base de datos del NCBI (Tabla 4) (*National Center for Biotechnology Information*). Seguido a esto, se realizó el alineamiento de las 25 secuencias en el programa Mult Alin versión 5.4.1. Una vez obtenida la secuencia consenso, se seleccionó de forma manual la región que mediante el uso de los programas Oligo Analyzer 1.1.2 y el programa BLAST del NCBI cumpliera con las condiciones del diseño de oligonucleótidos: una longitud entre 20-24 pb, entre 40-60% de contenido GC (Guanina-Citosina), temperatura de alineamiento similar, evitar regiones con potencialidad para formar estructuras secundarias internas y la formación de dímeros de oligonucleótidos.

Tabla 4. Números de acceso en el Gen Bank de las secuencias codificantes del gen E6 por tipo de VPH.

Tipo de VPH	Nº de acceso	Tipo de VPH	Nº de acceso
45	Y13218	59	X77858
83	AF151983	80	Y15176
33	M12732	26	X74472
31	J04353	70	U21941
11	M14119	44	U31788
58	D90400	67	D21208
39	M62849	51	Determinada mediante alineamiento*
56	X74483	61	U31793
35	M74117	6	AF092932
52	X74481	53	X74482
54	U37488	16	K02718
66	U31794	18	X05015
62	AY395706		

*Ver apéndice

Muestras biológicas.

Para la estandarización del sistema PCR-SSCP del gen E6 de VPH se utilizaron muestras de ADN de cepillados y biopsias del área genitales de pacientes que asistieron a consulta pública y privada a los cuales se les practicó, previo consentimiento, un examen de tipificación de VPH por biología molecular el cual se realiza en las instalaciones del Laboratorio de Biología y Medicina Experimental (LABIOMEX) mediante protocolo propuesto por Quintero *et al.* (2008). Para la selección de las muestras se realizó una revisión retrospectiva de las muestras que resultaron positivas para VPH durante el periodo de diagnóstico Junio 2007-Enero 2009; las muestras seleccionadas incluyen:

- 25 muestras de ADN de cepillados y biopsias genitales, cada una positiva para un solo tipo de VPH por el sistema PCR-RFLP del gen L1.
- 4 muestras de ADN de cepillados y biopsias genitales, cada una positiva para VPH 6.
- 4 muestras de ADN de cepillados y biopsias genitales, cada una positiva para VPH 11.
- 4 muestras de ADN de cepillados y biopsias genitales, cada una positiva para VPH 16.
- 2 muestras de ADN de cepillados y biopsias genitales, cada una positiva para VPH 18.

En la tabla 5 se observa la identificación que poseen las muestras seleccionadas.

Tabla 5. Número de muestra seleccionada por tipo de VPH para la estandarización.

Tipo de VPH	Nº de muestra	Tipo de VPH	Nº de acceso
45	2182	59	01046
83	2065	80	1191
33	2229	26	06307
31	06318	70	1190
11	07464,07778,J921,2568	44	07189
58	1903	67	1859
39	2099	51	06229
56	06224	61	07374
35	04086	6	2027,06509,07950,2801,2628
52	06243	53	1829
54	07024	16	2030,06513,07953,2572,2640
66	2323	18	04083,07622,ADN de células <i>Hela</i>
62	1536		

Una vez seleccionadas las muestras se procedió a determinar la cantidad de ADN.

Cuantificación del ADN por espectrofotometría.

Para determinar la cantidad de ADN total contenida en las muestras se realizaron diluciones 1/50 (volumen final 50 μ l) de cada una y seguidamente se realizaron mediciones de densidad óptica (D.O.) a 260 nm y 280 nm (para la estimación de la concentración de ADN y de proteínas respectivamente) en un espectrofotómetro Spectroscopy System Agilent 8453, empleando el software UV-Visible Chem-Station.

La concentración de ADN se calculó empleando los valores de la D.O. a 260 nm, basándose en que una D.O. de 1 a 260 nm equivale a 50 ng/ μ l de ADN, así:

$$[\text{ADN ng}/\mu\text{L}] = (\text{D.O. 260 nm}) \times (\text{Factor de Dilución}) \times 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

La pureza del ADN se determinó mediante la relación D.O. 260 nm/280 nm teniendo en cuenta que un rango óptimo de pureza se encuentra entre 1,5 - 2, valores inferiores son indicativos de contaminación con proteínas y un valor superior a 2 indica contaminación con ARN (Sambrook *et al.*, 1989).

Cabe destacar que las muestras seleccionadas para este estudio fueron previamente sometidas a tipificación de VPH por biología molecular mediante protocolo propuesto por Quintero *et al.* (2008). Esta metodología incluye una evaluación de la calidad e integridad del ADN purificado mediante la amplificación de un fragmento del gen humano β -globina por medio de los oligonucleótidos PC04 y GH20 (Saiky *et al.*, 1996 citado por Márquez, 2005). Los oligonucleótidos empleados, los componentes de la mezcla de reacción y el programa de amplificación de este sistema se resumen en las tablas 6, 7 y 8 respectivamente. Las muestras fueron positivas para VPH por el sistema de PCR MY09/11 y posteriormente sometidas a la técnica RFLP utilizando las endonucleasas de restricción DdeI y RsaI. Los oligonucleótidos empleados, los componentes de la mezcla de reacción, y el programa de amplificación del sistema de PCR MY09/11 se muestran en las tablas 9, 10 y 11 respectivamente.

Tabla 6. Oligonucleótidos empleados para amplificar mediante PCR un fragmento del gen humano β -globina.

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del amplificado	Referencia
PC04	5 'CAACTTCATCCACGTTCCACC 3'	268 pb	Saiky <i>et al.</i> , 1996 citado por Márquez, 2005
GH20	5 ' GAAGAGCCAAGGACAGGTAC 3'		

Tabla 7. Componentes de la mezcla de reacción del sistema de PCR β -globina.

Componentes	Concentración Final
Tampón de PCR*	1X
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPs	25 mM
Oligonucleótido PC04	25 pmol
Oligonucleótido GH20	25 pmol
ADN polimerasa (Taq*)	0.5 U
Agua m.p.e	c.s.p. 25 μ l
ADN molde	Entre 50 y 100 ng
Volumen final	25 μ l

*Ver apéndice

Tabla 8. Programa de amplificación del sistema PCR β -globina.

Paso	Temperatura °C	Tiempo (min)
1	94	3
2	94	1
3	55	1
4	72	1
5	Ir al paso 2, por 30 ciclos	

Tabla 9. Oligonucleótidos empleados para amplificar mediante PCR un fragmento del gen L1 de VPH.

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del amplificado	Referencia
MY09	5 'CGTCCMARRGGAWACTGATC 3'	450pb	Manos <i>et al.</i> , 1989 citado por Márquez, 2005
MY11	5 ' GCMCAGGGWCATAAYAATGG 3'		

Tabla 10. Componentes de la mezcla de reacción del sistema de PCR MY09/11.

Componentes	Concentración Final
Tampón de PCR*	1X
MgCl ₂	5,5 mM
dNTPs	200 µM
Oligonucleótido PC04	50 pmol
Oligonucleótido GH20	50 pmol
ADN polimerasa (Taq*)	2,5 U
Agua m.p.e	c.s.p. 25 µl
ADN molde	Entre 50 y 100 ng
Volumen final	25 µl

*Ver apéndice

Tabla 11. Programa de amplificación del sistema de PCR MY09/11.

Paso	Temperatura °C	Tiempo
1	94	1 min
2	94	30 seg
3	55	45 seg
4	72	30 seg
5	Ir al paso 2, 35 por 35 ciclos	
6	72	2 min

Sistema PCR general del gen E6 de VPH.

Con la finalidad de amplificar un segmento del gen E6 de los 25 tipos de VPH incluyendo tipos de alto y bajo riesgo se diseñaron oligonucleótidos iniciadores consenso de tipo degenerados denominados DAM_E6F y DAM_E6R1/R2 (Tabla 12). Los componentes de la mezcla de reacción se resumen en la tabla 13 y las condiciones del programa de amplificación se pueden observar en la tabla 14. Se utilizó un termociclador Eppendorf *Mastercycler ep gradient S*[®].

Tabla 12. Oligonucleótidos iniciadores consenso-degenerados DAM_E6F y DAM_E6R1/R2 diseñados para amplificar mediante PCR un fragmento del gen E6 de 25 tipos de VPH.

Oligonucleótido	Secuencia
DAM_E6F	5 'GAGGTATATGANTTTGCATT 3'
DAM_E6R1	5 ' GGACACAANGGTTTTTGACA 3'
DAM_E6R2	5'TTTTCTTCTGGACACAANGGTTT 3'

N= A, C, G ó T; de acuerdo al código IUB (ver apéndice)

Tabla 13. Componentes de la mezcla de reacción del sistema PCR general del gen E6.

Componentes	Concentración Final
Tampón de PCR*	1X
MgCl ₂	3 mM
dNTPs	25 mM
Oligonucleótido DAM-E6F	25 pmol
Oligonucleótido DAM-E6R1/R2	25 pmol
ADN polimerasa (Taq*)	0.5 U
Agua m.p.e	c.s.p. 25 µl
ADN molde	Entre 50 y 100 ng
Volumen final	25 µl

*Ver apéndice

Tabla 14. Programa de amplificación del sistema PCR general del gen E6.

Paso	Temperatura °C	Tiempo (min)
1	94	3
2	94	1
3	56	1
4	72	1
5	Ir al paso 2, 35 por 35 ciclos	
6	72	1

Se realizó un estudio para evaluar la sensibilidad de los oligonucleótidos iniciadores consenso-degenerados DAM_E6F/R1 diseñados, comparándolos con el sistema MY09/MY11 (Ver tablas 7 y 10). Para ello se realizaron diluciones seriadas de una de las muestras de estudio (nº 07464) positiva para VPH 11 mediante el sistema PCR_RFLP del gen L1, siguiendo los parámetros ya establecidos para cada una de las reacciones (Tablas 11 y 14).

Además de la prueba de sensibilidad se examinaron 16 casos donde las muestras resultaron negativas para VPH por el sistema MY09/11 (estudio paralelo realizado en LABIOMEX), para ello se sometieron dichas muestras al sistema de PCR con los oligonucleótidos iniciadores degenerados diseñados DAM_E6F/R1 bajo las condiciones ya establecidas.

Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Los amplificadores obtenidos fueron corridos en geles de poliacrilamida al 6% preparados de acuerdo al protocolo propuesto por Cruz J (Comunicación Personal). Inicialmente se preparó una mezcla de acrilamida-bisacrilamida (29:1) al 30%. Para preparar los geles se tomaron 17,5 ml de agua m.p., 2,5 ml de tampón TBE 0,5X, 5 ml de poliacrilamida 30%, 80 µl de TEMED (N, N, N', N'-Tetrametil-etilendiamina -Sigma-) y 750 µl de persulfato de amonio 10%. Esta mezcla fue vertida en una lámina soporte a la cual se le insertó un peine para la formación de los pozos donde posteriormente se colocaron las muestras. Una vez polimerizado el gel, se sumergió en una cámara electroforética modelo Termo EC, Minicell Primo 330 y se retiró el peine. Seguidamente las muestras fueron cargadas en los pozos. La cantidad de muestra por pozo fue de 3 µl del amplificado mezclado con 2 µl de tampón de carga (ver Apéndice).

Las muestras fueron sometidas a un campo eléctrico de 120 V, 300 mA, 30 W, en una fuente de poder modelo EC 4000P series 90 por 40 minutos. Luego de transcurrido el tiempo de corrida, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio 0,0006% (Promega) durante 15 min y fueron observados en un trans-iluminador bajo luz ultravioleta para observar las bandas.

Sistema SSCP del gen E6.

Para determinar los patrones de movilidad electroforética de los VPH tipo 6, 11, 16 y 18 se optimizó la técnica SSCP cuyo protocolo original de Orita *et al.* (1989) fue adaptado por Cruz (2003) y Márquez (2005). Se procedió a la preparación de las 2 placas de vidrio donde se vierte la mezcla para el gel. En un primer paso las placas fueron lavadas con agua y detergente líquido, luego se introdujeron en una estufa hasta que se secaran completamente. Posteriormente los vidrios, los separadores y el peine fueron limpiados con etanol absoluto para eliminar cualquier residuo que pudiera afectar la corrida de las muestras. Una vez limpios, se procedió a preparar la solución para pegar el gel a uno de los vidrios, ésta consistió de 300 μ l de etanol absoluto, 1.5 μ l de ácido acético glacial y 1.5 μ l de Blind Silane (Sigma). Esta mezcla fue vertida sobre el vidrio frotándola uniformemente con papel para lente hasta que estuviera completamente seca.

El vidrio que despegar del gel fue tratado con 300 μ l de solución de silicón Sigmacotte (Sigma), ésta fue agregada al vidrio frotándolo uniformemente con papel para lente hasta que estuviera completamente seco. Los vidrios se juntaron colocando entre ellos los separadores, se fijaron con cinta adhesiva y se colocaron en un soporte. Seguidamente se preparó el gel de poliacrilamida 12%; la mezcla fue realizada con 6 ml de acrilamida - bisacrilamida (29:1) al 30% (preparada con anterioridad), 1.5 ml de tampón TBE 5X, 1.5 ml de glicerol 10%, 25 μ l de TEMED, 180 μ l de persulfato de amonio 10% y agua destilada c.s.p. 15 ml. Esta mezcla fue agregada inmediatamente entre las dos placas de vidrio, se insertó el peine para formar los pozos y se dejó polimerizar.

Una vez polimerizado el gel, se retiró el peine y los pozos fueron lavados cuidadosamente con agua destilada para eliminar los residuos de poliacrilamida sin polimerizar. Los vidrios tienen una medida de 18 x 16 cm, el grosor del gel es de 0.4 mm.

Las placas de vidrio junto con el gel fueron introducidos en la cámara de electroforesis de marca Hoffer SE 660 Amersham Bioscience, acoplada a un refrigerante Poly Science Moldel 90, se empleó como tampón de corrida TBE 0.5X con glicerol 1%, y se realizó una pre-corrída de 2 h a 1285 V, 300 mA, 30 W en una fuente de poder modelo EC 4000P series 90. Antes de ser cargados a los pozos del gel, los amplificados fueron desnaturalizados, empleando para ello tampón de carga para SSCP (ver Apéndice), se sometieron a 95°C durante 10 min y se colocaron inmediatamente en hielo por 10 min. Seguidamente se cargaron en el gel. Las muestras fueron sometidas a un campo eléctrico bajo las mismas condiciones de la pre-corrída, durante un tiempo de 4 h.

Transcurrido el tiempo de la corrida electroforética, las placas de vidrio se separaron usando una paleta plástica, y el gel, adherido a uno de los vidrios, fue teñido con nitrato de plata cuyo protocolo se describe a continuación.

Tinción con Nitrato de Plata (según BIORAD).

El vidrio que posee el gel adherido fue sumergido en ácido acético glacial al 10% (solución fijadora), durante 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, el gel se lavó con abundante agua destilada 5 veces. Luego se transfirió a la solución de tinción durante 30 min en agitación, esta solución está compuesta por 0,250 g de nitrato de plata, 375 µl de formaldehído 37% y agua m.p. para 250 ml.

Pasado los 30 min, el gel se enjuagó durante 10 seg con agua m.p. y fue sumergido en la solución de desarrollo; ésta incluye 8 g de Carbonato de Sodio, 750 µl de formaldehído 37% y 100 µl de Tiosulfato de Sodio 10% y agua m.p. hasta completar 400 ml (esta solución de desarrollo es previamente enfriada a 0 °C antes de sumergir el gel). Cuando comenzaron a visualizarse las bandas en el gel, la reacción se detuvo agregando ácido acético glacial al 10%. Por último se tomó la fotografía del gel.

RESULTADOS

Diseño de Oligonucleótidos consenso degenerados.

Las secuencias codificantes del gen E6 para los 25 tipos de VPH que poseen los números de acceso en el Gen Bank que se resumen en la tabla 7 de la sección Materiales y Métodos se alinearon utilizando el programa Mult Alin versión 5.4.1. (Figuras 11a y 11b).

Obtenida la secuencia consenso; la región que presentó la mayor homología para el caso del oligonucleótido sentido fue la región que se encuentra entre los 142-161 pb (Figura 11a) Para el caso del oligonucleótido antisentido se seleccionaron 2 regiones, la primera (oligonucleótido antisentido 1) entre 340-359 pb (Ver Figura 11b) y la segunda (oligonucleótido antisentido 2) entre 346-368 pb (Ver Figura 11b).

Con la finalidad de determinar el tamaño de los fragmentos amplificados para cada tipo de VPH se realizaron los alineamientos de cada juego de oligonucleótidos con cada una de las secuencias del gen E6 de los 25 tipos VPH (Ver Apéndice), resultando en su mayoría una longitud de 214 pb para el amplificado del juego DAM_E6F/R1 y 223 pb para el amplificado del juego DAM_E6F/R2 (Tabla 15)

Tabla 15. Tamaño de los fragmentos amplificados por juego de oligonucleótidos y tipo de VPH.

Tipo de VPH	Tamaño del amplificado por DAM_E6F/R1	Tamaño del amplificado por DAM_E6F/DAM_E6R2
45	214 pb	223 pb
83	214 pb	223 pb
33	214 pb	223 pb
31	214 pb	223 pb
11	214 pb	223 pb
58	214 pb	223 pb
39	214 pb	223 pb
56	214 pb	223 pb
35	214 pb	223 pb
52	214 pb	223 pb
54	214 pb	23 pb
66	214 pb	223 pb
62	87 pb	96 pb
59	214 pb	223 pb
80	143 pb	165 pb
26	214 pb	223 pb
70	214 pb	223 pb
44	214 pb	223 pb
67	214 pb	223 pb
51	214 pb	223 pb
61	286 pb	294 pb
6	214 pb	223 pb
53	214 pb	223 pb
16	214 pb	223 pb
18	214 pb	223 pb

Muestras biológicas.

Todas las muestras seleccionadas para este estudio fueron utilizadas para estandarizar el sistema de PCR general del gen E6 con los oligonucleótidos diseñados DAM_E6F/R1. Estas muestras tal y como se describe en la sección Materiales y Métodos fueron previamente sometidas a evaluación de la calidad e integridad del ADN por medio de la amplificación de un fragmento del gen humano β -globina, resultaron positivas para VPH por el sistema de PCR MY09/11 y mediante la técnica RFLP presentaron el patrón característico para un solo tipo de VPH.

Cuantificación del ADN por espectrofotometría.

Las muestras seleccionadas presentaron una concentración de ADN total mínima de 24,17 ng/ μ l y máxima de 740,69 ng/ μ l. La pureza mínima fue de 1,32 y la máxima de 2,20.

Sistema PCR general del gen E6 de VPH.

Se realizó la estandarización del sistema de PCR bajo los parámetros de amplificación que se muestran en la tabla 14 (sección Materiales y Métodos).

Los oligonucleótidos diseñados permitieron amplificar un fragmento del gen E6 en todas las muestras.

Oligonucleótidos DAM_E6F/R1 Vs. oligonucleótidos DAM_E6F/R2:

Se realizó una prueba exploratoria con la finalidad de evaluar la sensibilidad de cada juego de oligonucleótidos. Ésta se realizó con diez muestras correspondientes a los tipos de VPH que se indican en la Figura 12, cada muestra se amplificó con ambos juegos de oligonucleótidos; resultó más sensible el par de oligonucleótidos DAM_E6F/R1.

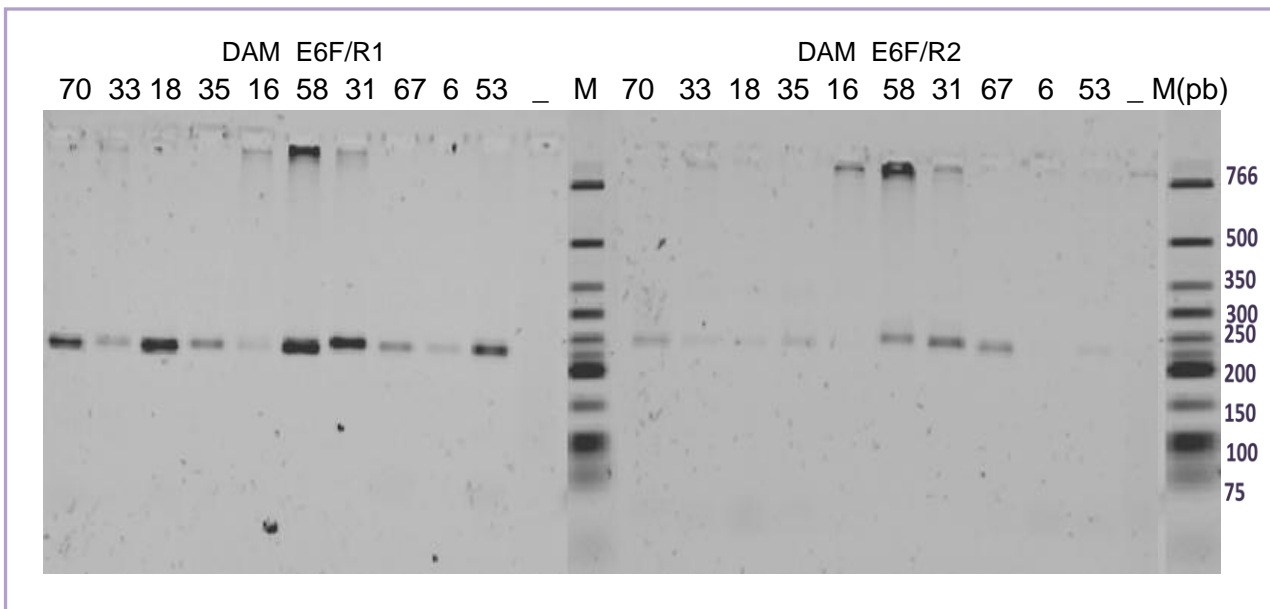


Figura 12. Amplificados del fragmento del gen E6 para los tipos de VPH 70, 33, 18, 35, 16, 58, 31, 67, 6, 53 con los oligonucleótidos DAM_E6F/R1 y DAM_E6F/R2. **M:** marcador de peso molecular BioLabs.

En base a esta prueba exploratoria, donde resultó ser más sensible el juego de oligonucleótidos DAM_E6F/R1, el sistema de PCR general del gen E6 de VPH utiliza estos oligonucleótidos iniciadores consenso-degenerados para amplificar un fragmento del gen E6 de 25 tipos de VPH incluyendo tipos de alto y bajo riesgo

Amplificados del fragmento del gen E6 por el sistema PCR general DAM_E6F/R1.

Al someter las 25 muestras de los diferentes tipos de VPH al sistema de PCR general del gen E6 (Figura 13) se obtuvo para todas ellas una banda que se encuentra entre los 200-250 pb.

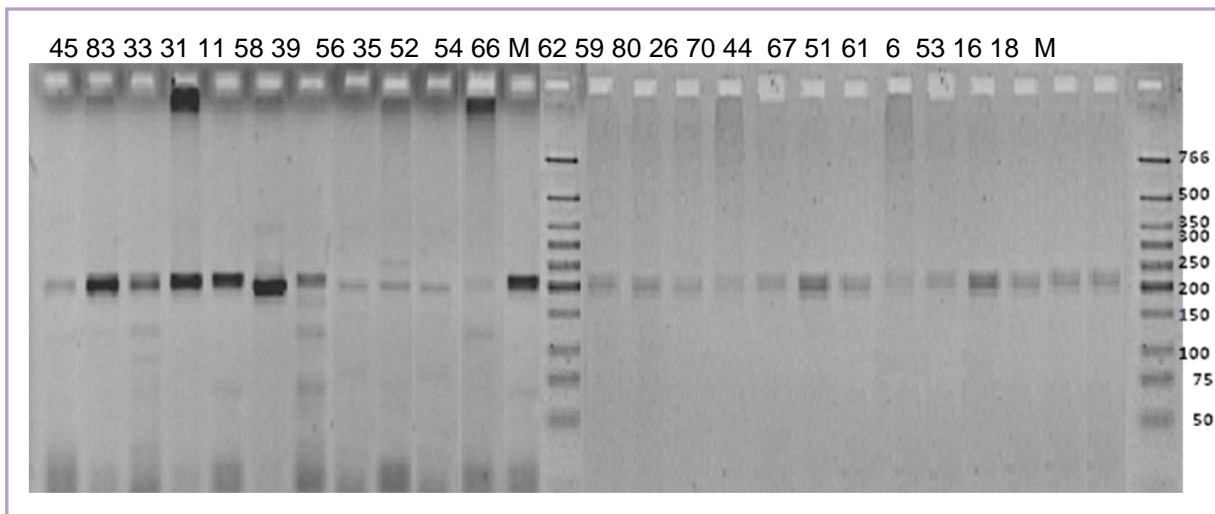


Figura 13. Amplificados del fragmento del gen E6 para los 25 tipos de VPH con los oligonucleótidos DAM_E6F/R1. **M:** marcador de peso molecular BioLabs.

Las muestras seleccionadas para VPH 6 permitieron la amplificación de un fragmento de aproximadamente 214 pb mediante el sistema de PCR general del gen E6 de VPH (Figura 14).

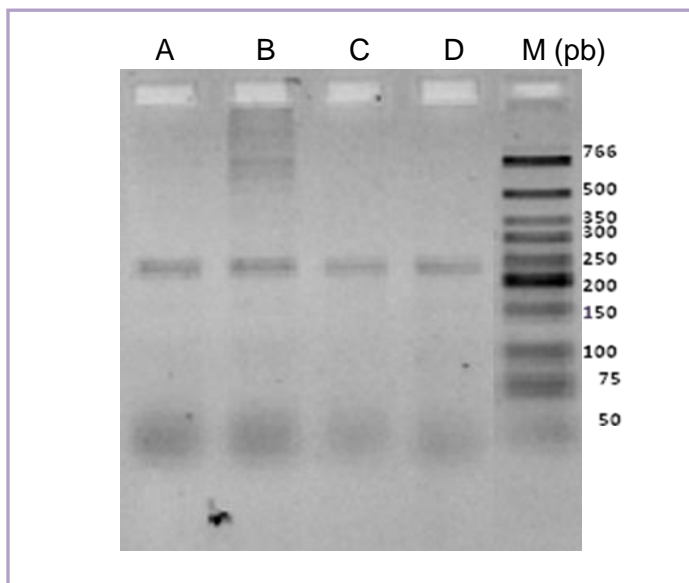


Figura 14. Amplificados de 214 pb del fragmento del gen E6 para las 4 muestras de VPH 6. A: muestra nº 06509. B: muestra nº 07950. C: muestra nº 2801. D: muestra nº 2628. M: marcador de peso molecular BioLabs.

En la figura 15 se pueden observar los amplificados de aproximadamente 214 pb correspondientes al fragmento del gen E6 obtenidos para las 4 muestras de VPH 11.

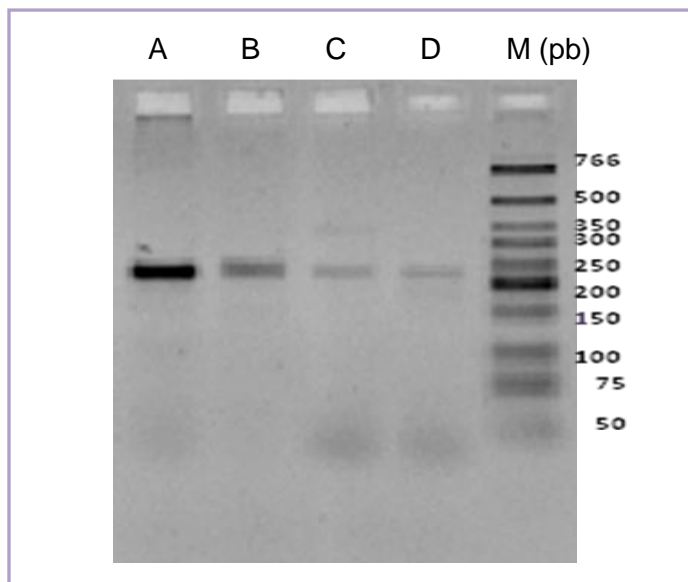


Figura 15. Amplificados de 214 pb del fragmento del gen E6 para las 4 muestras de VPH 11. A: muestra nº 07778. B: muestra nº 07464. C: muestra nº J921. D: muestra nº 2568. M: marcador de peso molecular BioLabs.

De igual modo las 4 muestras seleccionadas para VPH 16 permitieron la amplificación de un fragmento de aproximadamente 214 pb mediante el sistema de PCR general del gen E6 de VPH (Figura 16).

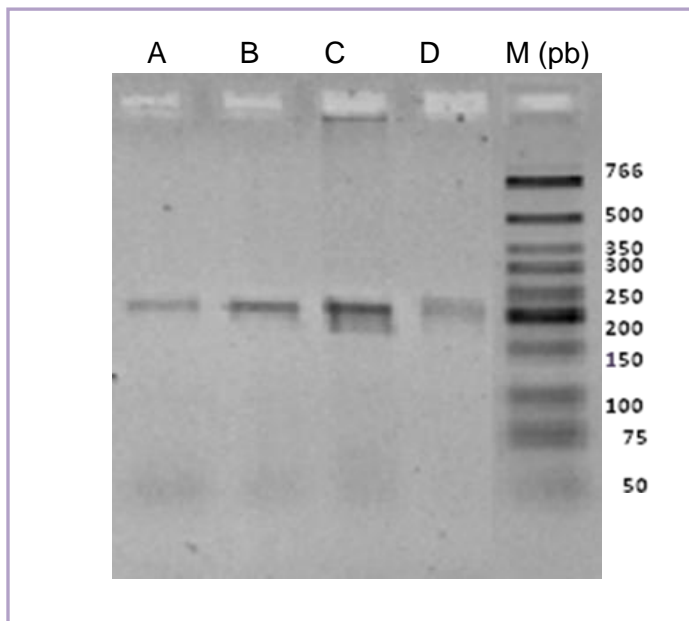


Figura 16. Amplificados de 214 pb del fragmento del gen E6 para las 4 muestras de VPH 16. A: muestra nº 06513. B: muestra nº 07953. C: muestra nº 2572. D: muestra nº 2640. M: marcador de peso molecular BioLabs.

Finalmente para las 3 muestras de VPH 18 las bandas obtenidas correspondientes a un amplificado de aproximadamente 214 pb se observan en la figura 17.

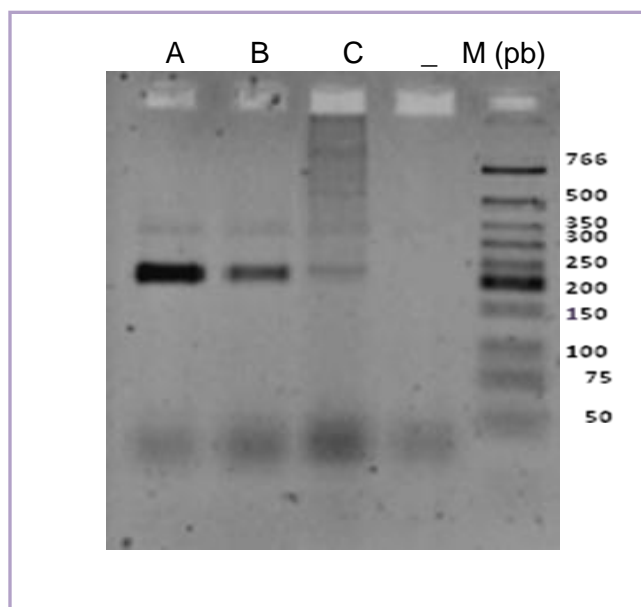


Figura 17. Amplificados de 214 pb del fragmento del gen E6 para las 4 muestras de VPH 18. A: muestra nº 04083. B: ADN de HeLa. C: muestra nº 07622 M: marcador de peso molecular BioLabs.

Prueba de sensibilidad comparada.

Se realizó una prueba de sensibilidad que compara el sistema PCR del gen E6 que utiliza los oligonucleótidos DAM_E6F/R1 con el sistema de PCR del gen L1 que emplea los oligonucleótidos MY09_MY11. Se realizaron diluciones seriadas de la muestra nº 07464 positiva para VPH 11 por PCR_RFLP del gen L1, estas diluciones fueron probadas bajo los parámetros de reacción ya estandarizados para DAM_E6F/R1, así como también bajo los parámetros ya establecidos para la reacción MY09_MY11. En la figura 18 se pueden observar los amplificados correspondientes a cada dilución para ambos casos.

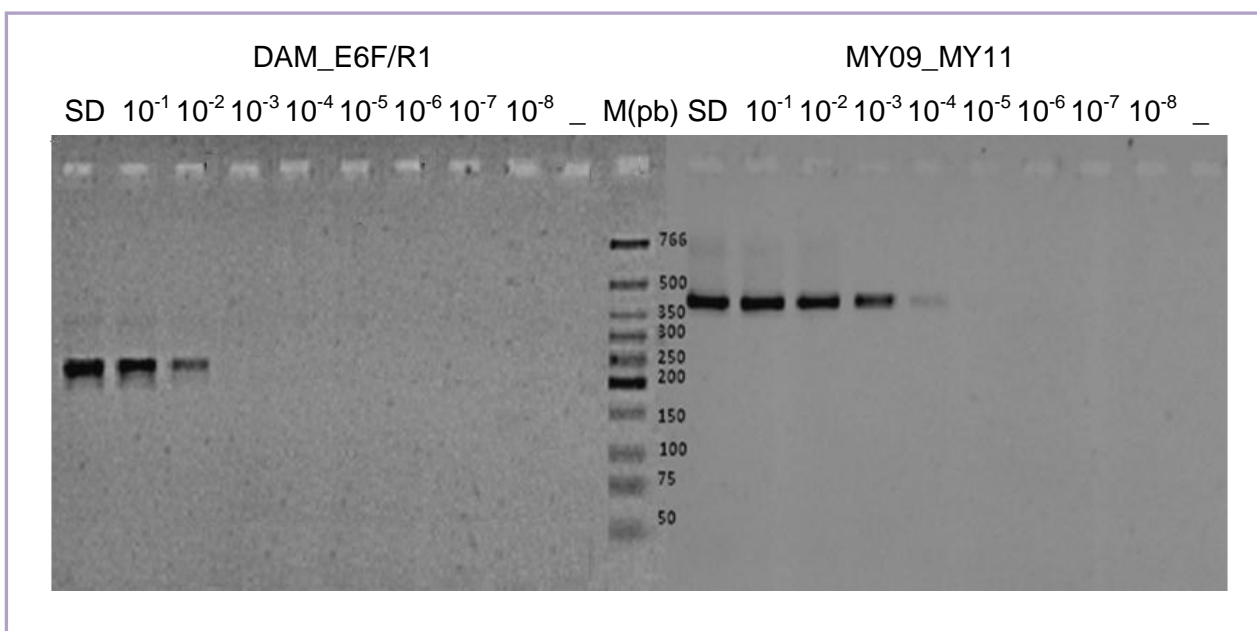


Figura 18. Prueba de sensibilidad comparada de los sistemas de PCR DAM_E6F/R1 y PCR MY09_MY11 SD: muestra sin diluir con una concentración de ADN total de 196,78 ng/ μ l. Diluciones seriadas: 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} 10^{-7} 10^{-8} M: marcador de peso molecular BioLabs.

Al someter 15 muestras negativas para VPH por el sistema MY09/11 (seleccionadas de un estudio paralelo llevado a cabo en LABIOMEX) al sistema de PCR general del gen E6 bajo las condiciones establecidas, 9 de ellas presentaron la banda de 214 pb (Figura 19) correspondiente al tamaño del amplificado esperado con los oligonucleótidos diseñados DAM_E6F/R1.

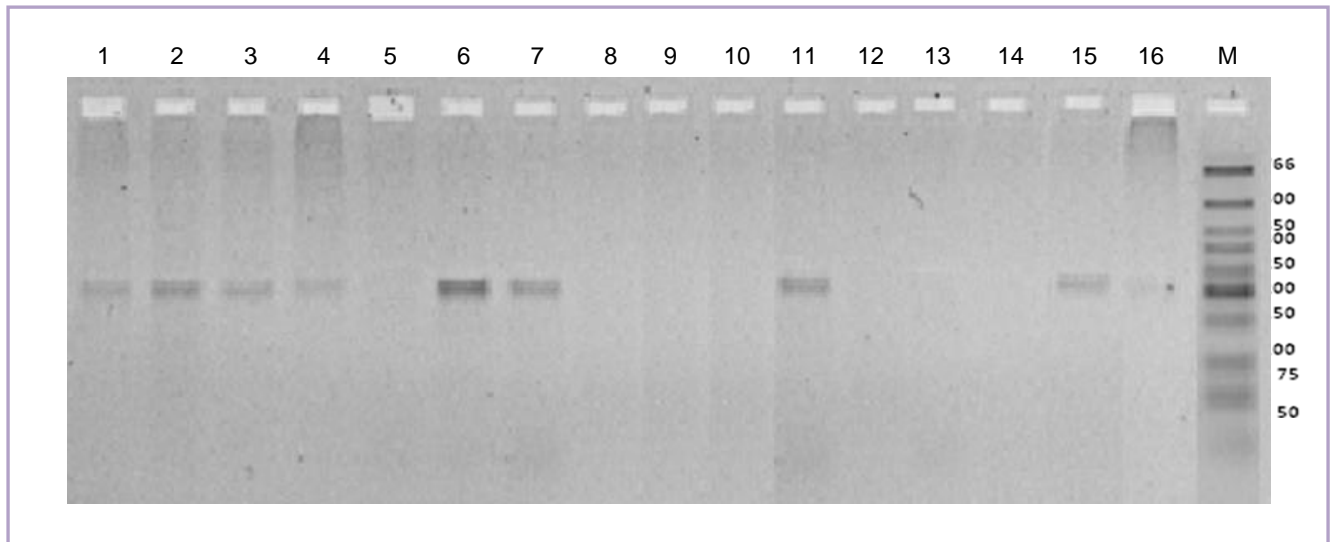


Figura 19. Amplificados por el sistema PCR general del gen E6 utilizando los oligonucleótidos DAM_E6F/R1 de 15 muestras negativas para VPH por el sistema PCR MY09/11. Nueve de estas muestras presentaron la banda de 214 pb.

Sistema SSCP del gen E6.

Los amplificados fueron sometidos a la técnica SSCP tal como se describe en materiales y métodos.

SSCP para VPH 6.

Los patrones de movilidad electroforética encontrados para el fragmento del gen E6 en las 4 muestras de VPH 6 se muestra en la figura 20.

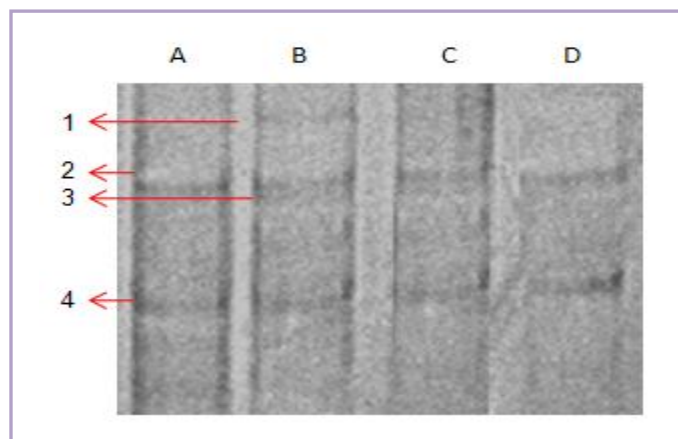


Figura 20. Patrón de movilidad electroforética del fragmento del gen E6 para las 4 muestras de VPH 6. A: muestra nº 06509 con 2 bandas (2 y 4). B: muestra nº 07950 con 4 bandas (1, 2,3 y4). C: muestra nº 2801 con 3 bandas (2,3 y4). D: muestra nº 2628 con 2 bandas (2 y 4).

SSCP de VPH 11.

Los patrones de movilidad electroforética encontrados mediante la SSCP para los amplificados de VPH 11 se muestran en la figura 21.

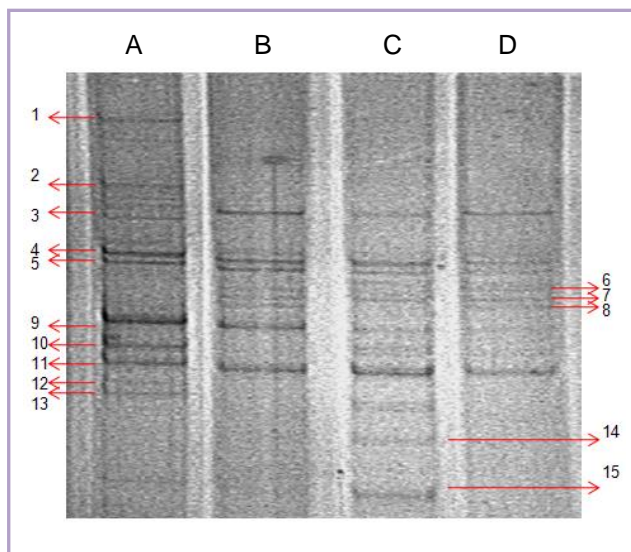


Figura 21. Patrón de movilidad electroforética del fragmento del gen E6 para las 4 muestras de VPH 11. A: muestra nº 07778 con 10 bandas (1, 2, 3, 4, 5, 9, 10, 11, 12 y 13). B: muestra nº 07464 con 8 bandas (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 11). C: muestra nº J921 con 9 bandas (3, 4, 5, 7, 9, 11, 13, 14 y 15). D: muestra nº 2568 con 7 bandas (3, 4, 5, 6, 7, 8, y 11).

SSCP de VPH 16.

Los amplificados de 214 pb del fragmento del gen E6 para las 4 muestras de VPH 16 se sometieron a SSCP, los patrones obtenidos se muestran en la figura 22.

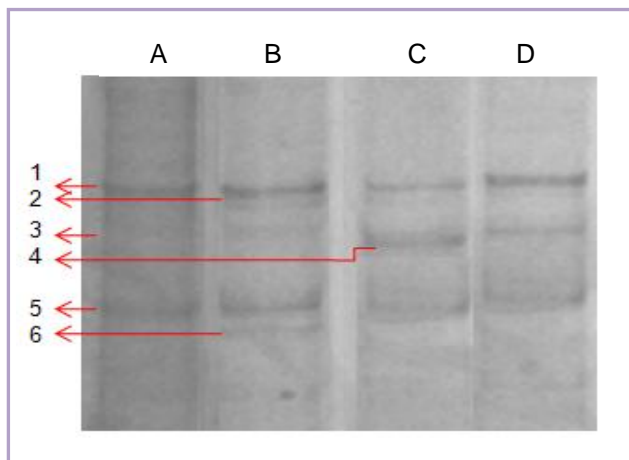


Figura 22. Patrón de movilidad electroforética del fragmento del gen E6 para las 4 muestras de VPH 16. A: muestra nº 06513 con 2 bandas (1, y 5). B: muestra nº 07953 con 4 bandas (1, 2, 5 y 6). C: muestra nº 2572 con 4 bandas (1, 3, 4 y 5). D: muestra nº 2640 con 3 bandas (1, 3 y 5).

SSCP de VPH 18.

Los amplificados del fragmento del gen E6 de dos muestras de ADN positivas para VPH 18 y de ADN de células Hela se les sometió a la técnica SSCP encontrando los patrones de movilidad electroforética que se observan en la figura 23.

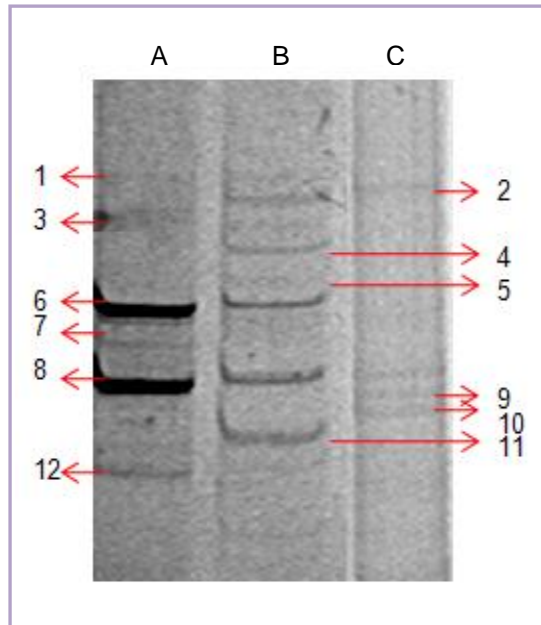


Figura 23. Patrón de movilidad electroforética del fragmento del gen E6 para las 2 muestras de VPH 18 y del ADN de células hela. A: muestra nº 04083 con 6 bandas (1, 3, 6, 7,8 y 12). B: ADN de células hela con 6 bandas (1, 2, 4, 5,8 y 11). C: muestra nº 07622 con 4 bandas (2, 8,9 y 10).

DISCUSIÓN

Debido a que numerosos estudios epidemiológicos y moleculares han demostrado la asociación del VPH con el desarrollo de lesiones preneoplásicas y neoplásicas del tracto anogenital, las infecciones localizadas en el cuello uterino constituyen el principal foco de atención por presentar mayor susceptibilidad a la transformación maligna (Alonio *et al.*, 2000). Estudios epidemiológicos realizados en Brasil, Colombia, México, Perú y Costa Rica, entre otros países, ratifican la importancia del cáncer del cuello uterino en Latinoamérica. En Venezuela, desde la década de los años cuarenta, el cáncer del cuello uterino es una de las principales causas de muerte por cáncer en la mujer. El cáncer cervical es responsable aproximadamente del 20% del total de las muertes por cáncer en Venezuela; los Estados Trujillo, Guárico, Yaracuy, Zulia, Lara, Aragua, Mérida, Táchira, Bolívar y Falcón son las entidades más afectadas por esta patología, con tasas de mortalidad superiores al promedio nacional (Molina *et al.*, 2005)

El gran número de tipos, subtipos y variantes del VPH descritos hasta el momento, solo admite el desarrollo de técnicas moleculares que permitan el estudio de tal diversidad genética. Considerando la importancia clínica que posee el conocimiento del tipo viral presente para el seguimiento de mujeres con tratamiento de las lesiones y posterior al mismo, así como el desarrollo de estudios epidemiológicos detallados; generar nuevas metodologías que aborden dicho asunto reviste de gran importancia (Gómez *et al.*, 2001; Sotlar *et al.*, 2004).

Diseño de Oligonucleótidos consenso degenerados.

Mediante el alineamiento de las secuencias codificantes del gen E6 de los 25 tipos de VPH seleccionados para este estudio (Figura 11a y 11b) se logró determinar las regiones consenso que permitieron el diseño de los oligonucleótidos iniciadores consenso degenerados DAM_E6F/R1 y DAM_E6F/R2. Actualmente en nuestro país no existe una metodología de diagnóstico y detección que utilice la región E6 como blanco; con el diseño de estos oligonucleótidos iniciadores consenso degenerados se pretende iniciar una línea de investigación que apunte a la estandarización de una técnica que detecte un amplio espectro de tipos de VPH y mejore el diagnóstico y seguimiento de los pacientes, disminuyendo la posibilidad latente de diagnosticar falsos negativos cuando se utiliza la región L1.

El tamaño de los productos de PCR esperado según los alineamientos de cada juego de oligonucleótidos con la secuencia de cada tipo de VPH correspondieron con el tamaño de la banda observada luego de la amplificación en la mayoría de los casos, el tamaño de dicha banda se encuentra entre los 200-250 pb del marcador de peso molecular BioLabs (Figura 13). Para el caso de los papilomavirus tipo 61, 62 y 80 el tamaño del amplificado obtenido no se corresponde con el tamaño que se determinó mediante los alineamientos, no obstante podría decirse que de igual modo como en estudio realizado por Márquez, (2009) estos VPH hayan sido tipificados erróneamente por confusión de patrones de digestión similares en la RFLP, así como también, hay que tener en cuenta que a pesar de que la bioinformática es una poderosa herramienta que ayuda a simular condiciones en los sistemas biológicos, sólo es un instrumento de predicción y las condiciones reales pueden ser diferentes. También resultaría interesante realizar el secuenciamiento automático del amplificado de cada tipo de VPH para determinar con mayor exactitud el tamaño de cada amplificado dado que el gen E6 y su secuencia.

Procesamiento de las muestras biológicas.

En la aplicación de los sistemas de PCR la calidad y cantidad del ADN son factores que determinan la obtención de resultados confiables (Cáceres, 2009). Las muestras seleccionadas para cada tipo de VPH (Tabla 5 Materiales y Métodos) fueron utilizadas en la estandarización del sistema PCR general del gen E6, éstas poseen una concentración promedio de ADN total mínima de 24,17 ng/μl y máxima de 740,69 ng/μl, la pureza mínima fue de 1,32 y la máxima de 2,20. Fue necesario evaluar la concentración y pureza de más de una muestra por tipo de VPH a pesar que previamente habían resultado positivas para el sistema de PCR β-globina y sistema de PCR MY09/MY11. Un estudio realizado por Smith et al. (2005) (citado por Fernández, 2009) determinó que el ADN se preserva mejor seco a temperatura ambiente o en presencia de trealosa a -80°C y que la calidad de éste disminuye significativamente a 4°C y -20°C. Por lo tanto, las condiciones de almacenamiento juegan un rol fundamental en el proceso de conservación; las condiciones de almacenamiento utilizadas en el laboratorio son 4 °C y -20 °C en tampón TE, probablemente estas condiciones estén favoreciendo la degradación del ADN viral presente en las muestras (Fernández, 2009) e impidiendo la reproducibilidad del resultado anterior.

Sistema PCR general del gen E6 de VPH.

Para la estandarización del sistema PCR general se ensayaron distintas condiciones que permitieron establecer las concentraciones óptimas de los componentes así como los parámetros del sistema de amplificación. La mayor eficiencia del par de oligonucleótidos DAM_E6F/R1 sobre el par DAM_E6F/R2 fue determinada mediante la prueba exploratoria que se realizó para ambos juegos de oligonucleótidos (Figura 12) bajo los mismos parámetros de amplificación, por consiguiente, el sistema de PCR general del gen E6 utiliza estos oligonucleótidos iniciadores consenso degenerados. Otra prueba realizada (datos no mostrados) fue un intento por estandarizar una PCR multiplex utilizando ambos oligonucleótidos antisentido, esta no fue factible por la formación de dímeros de oligonucleótidos, los cuales hibridan a causa de su complementariedad.

Los oligonucleótidos diseñados hibridan con pequeñas regiones consenso dentro del gen E6 en 25 papilomavirus permitiendo la amplificación de tipos de alto y bajo riesgo como se puede observar en la figura 13; estos resultados se corresponden con el estudio realizado por Resnick *et al.* (1990) en California donde dos regiones conservadas en la región E6 identificadas por medio de alineamientos permiten el diseño de oligonucleótidos consenso que amplifican un fragmento de 240-250 pb para los VPH 6, 11, 16, 18, 31 y 33. Años más tarde la reproducibilidad con respecto al diseño de oligonucleótidos consenso degenerados para la región E6/E7 sigue en aceptación gracias a estudios como los de Sasagawa *et al.* (2000) en Japón y Sotlar *et al.* (2004) en Alemania.

La prueba de sensibilidad que compara el sistema de PCR general del gen E6 diseñado en este estudio con el sistema de PCR general del gen L1 MY09/MY11 (Figura 18), muestra que a partir de una concentración de 1,9678 ng/μl (correspondiente a la dilución 10^{-2}) el sistema de PCR que emplea los oligonucleótidos diseñados DAM_E6F/R1 no es capaz de amplificar un fragmento del gen E6, mientras que para el sistema PCR MY09/11 del gen L1 se observa amplificado hasta la dilución 10^{-3} (correspondiente a una concentración de 0,19678 ng/μl), estos resultados contradicen los resultados obtenidos por Sasagawa *et al.* (2000) en Japón donde un sistema PCR LCR-E7 en el cual amplifican todo el gen E6 y parte N-terminal de E7, resulta más sensible que la PCR MY09/11; reportando una sensibilidad equivalente a 0,01 copias de genoma de VPH por célula y en donde los resultados de su tipificación por ambos sistemas concuerdan en un 96%. A pesar de que nuestro sistema de PCR general del gen E6 no resulte tan sensible en comparación con el sistema MY09/11 del gen L1, es de resaltar la amplitud de tipos de VPH que logra amplificar.

Se sometieron al sistema de PCR general del gen E6 16 muestras que resultaron negativas para VPH por el sistema MY09/11 (escogidas al azar y sin distinciones de ningún tipo) de un estudio paralelo realizado en LABIOMEX. Nueve de estas muestras presentan la banda de 214 pb correspondiente al amplificado del fragmento del gen E6 mediante los oligonucleótidos diseñados (Figura 19). De las nueve muestras positivas para E6, 6 presentan LIEBG y 3 no presentan lesiones por lo que se apoya el hecho de que la amplificación de regiones del gen E6 permiten la detección del virus en estado integrado donde la región L1 podría perderse (Park *et al.*, 1993). Sin embargo, ésta es sólo una pequeña prueba exploratoria de la eficiencia de los oligonucleótidos diseñados. Para comprobar el argumento referido en la literatura por muchos autores y que se ha expuesto previamente en este trabajo; donde la elección del gen E6 resulta ventajosa para el diagnóstico como sitio blanco para el diseño de oligonucleótidos iniciadores consenso degenerados porque este gen no se pierde a consecuencia de la integración del genoma viral en el genoma de las células y su expresión continua ha demostrado ser necesaria para la transformación de las células hospederas (Resnick *et al.*, 1990) es necesario un estudio estadísticamente significativo en nuestra población que permita evidenciarlo.

En vista de la necesidad de que en nuestro país se desarrolle una metodología de diagnóstico que utilice la región E6 como blanco, resulta importante determinar los patrones de movilidad electroforética, con el propósito de establecer un protocolo de detección y tipificación viral, para ello, en este estudio se aplicó la técnica SSCP a los amplificados de los VPH tipo 6, 11, 16 y 18.

Sistema SSCP del gen E6 para VPH 6, 11, 16 y 18.

Gracias a que la SSCP permite detectar sustituciones de nucleótidos en varias posiciones ⁶⁷ un mismo fragmento (Orita *et al.*, 1989), esta técnica es empleada frecuentemente para realizar análisis de mutaciones puntuales y resulta una herramienta poderosa para determinar variabilidad genética. La eficiencia en la resolución electroforética está relacionada con el tamaño del fragmento amplificado; para fragmentos menores de 200 pb existe un 90% de eficiencia, mientras que para un fragmento de 200 a 400 pb se encuentra entre 70-80% (Cruz, 2003). Los amplificados de 214 pb correspondientes a las 4 muestras de VPH 6, 11 y 16 y de las 3 muestras de VPH 18 (figuras 66-69) fueron sometidos a la técnica SSCP; la información que se obtuvo de esta es que los productos de PCR no son idénticos.

Se encontró para todos los casos (figuras 20-23), patrones de movilidad electroforética que difieren para un mismo tipo de VPH; para VPH 6 las bandas 2 y 4 son comunes en todas las muestras, la banda 1 solo aparece en una de las muestras mientras que la banda 3 es común para 2 muestras (figura 20), en el caso de VPH11 sólo 4 bandas son comunes (3, 4, 5, 11 ver figura 21). El VPH 16 presenta 2 bandas comunes (1 y 5 ver figura 22) mientras que VPH 18 sólo muestra en el patrón de movilidad electroforética de las tres muestras evaluadas una banda en común (banda 8 ver figura 23). Estos resultados se corresponden con los encontrados por Márquez, (2009) donde la técnica SSCP para la región L1C1, reveló patrones de migración distintos en muestras tipificadas con el mismo tipo viral; sugiriendo variación nucleotídica intratipo de esta región, contradictoriamente, años atrás los estudios realizados por Zehbe *et al.*, (1996), Alonio *et al.*, (2000) y Gómez *et al.*, (2001) en los que diseñaron sistemas de PCR-SSCP, se establecieron patrones de bandas específicos por tipo viral para el diagnóstico y tipificación de VPH empleando los oligonucleótidos MY09/MY11 y GP5+/GP6+, afirmando que esta metodología es eficiente y altamente reproducible por ser L1 un gen bien conservado dentro del genoma viral.

En un principio se planteó realizar la tipificación por PCR-SSCP para los tipos de VPH 6, 11, 16 y 18 utilizando los oligonucleótidos diseñados, dado que la técnica SSCP resulta tan sensible y permite detectar diferencias de un solo nucleótido, la variación intra tipo existente en nuestra población no pasa desapercibida, es por ello que se requiere un estudio detallado de variación intratipo con análisis de secuenciamiento que permitan corroborar la variabilidad del ORF E6 tal y como lo realizó Moreno *et al.* (2008) en VPH 16 presente en la población colombiana.

El fundamento para la identificación de las variantes intratipo es la comparación con la respectiva secuencia de un clon referencial, estas secuencias referenciales se emplean a nivel mundial como base para el establecimiento de protocolos de diagnóstico y tipificación; así como también, el desarrollo de vacunas (Márquez, 2009). En vista de que no se contaba con un clon referencial puesto a que los objetivos iniciales no fueron determinar variabilidad y aunado al limitado número de muestras analizadas, no es posible estimar ningún índice de variabilidad del ORF E6 ni la frecuencia de posibles variantes en nuestra población.

No obstante, resulta interesante determinar variantes del ORF E6 de los papilomavirus 68 presentes en nuestra población, con la finalidad de determinar las diferencias entre las variantes y los prototipos utilizados como referencia a nivel mundial ya que al momento de decidir si un protocolo de diagnóstico se ajusta a las variantes presentes en esta población es relevante.

CONCLUSIONES

- El alineamiento de las secuencias codificantes del gen E6 para los 25 tipos de VPH seleccionados en este estudio permitió determinar las regiones consenso que hicieron posible el diseño de los oligonucleótidos iniciadores consenso degenerados DAM_E6F/R1 y DAM_E6F/R2.
- Los alineamientos de cada juego de oligonucleótidos con cada una de las secuencias del gen E6 de los 25 tipos de VPH, permitió determinar la longitud del fragmento amplificado, resultando en su mayoría una longitud de 214 pb para el amplificado del juego DAM_E6F/R1 y 223 pb para el amplificado del juego DAM_E6F/R2.
- Se logró la estandarización del sistema de PCR general del gen E6 que utiliza los oligonucleótidos iniciadores consenso degenerados DAM_E6F/R1 permitiendo la amplificación de un fragmento del gen E6 de 25 tipos de VPH.
- Se consiguió la optimización de la técnica SSCP para determinar los patrones de movilidad electroforética del fragmento del gen E6 amplificado en los tipos de VPH 6, 11, 16 y 18.
- La técnica SSCP resulta tan sensible para detectar diferencias de un solo nucleótido que permitió revelar patrones de movilidad electroforética diferentes en un mismo tipo de VPH, lo que sugiere variación nucleotídica intratipo en esta región del ORF del gen E6.

RECOMENDACIONES

- Con respecto al diseño de oligonucleótidos consenso degenerados para la región E6 ampliar el número de muestras analizadas para afianzar la reproducibilidad de utilizar esta región como blanco para la detección de ADN de VPH.
- Para diseñar un protocolo de diagnóstico es importante primero determinar las variantes intratipo que presenta un mismo tipo de VPH, con la finalidad de ajustar dicha metodología a la población en estudio.
- Para futuros análisis de variabilidad del ORF de gen E6 comparar con la respectiva secuencia de un clon referencial.
- Realizar análisis de secuenciamiento que permitan corroborar variabilidad en el ORF del gen E6.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonio L., Dalbert D., Picconi M., Cervantes G., Garcia A., Distefano A., Mural J., Bartt O., Bazan G. & Teyssie A. (2000). Mutaciones en genes Ha-ras y p53 detectadas mediante PCR-SSCP en lesiones premalignas y malignas de cuello uterino asociadas con virus papiloma humano. *Medicina*, **60**(6), 895-901.
- Androphyl E., Hubbert N., Schiller J. & Lowy D. (1987). Identification of the HPV-16 E6 protein from transformed mouse cells and human cervical carcinoma cell lines. *EMBO J*, **6**(4), 989-992.
- Banks L., Edmonds C. & Vousden K. (1990). Ability of the HPV 16 E7 protein to bind RB and induce DNA synthesis is not sufficient for efficient transforming activity in NIH3T3 cells. *Oncogene*, **5**, 1383-1389.
- Barbosa M., Lowy D. & Schiller J. (1989). Papillomavirus Polypeptides E6 and E7 Are Zinc-Binding Proteins. *J Virol*, **63**(3), 1404-1407.
- Bosch FX., Lorincz A., Muñoz N., Meijer CJLM. & Shah KV. (2002). The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*, **55**, 244-265.
- Boulet G., Horvath C., Vanden Broeck D., Sahebali S. & Bogers J. (2007). Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. *Int J Biochem Cell Biol*, **39**, 2006-2011.
- Boulet G., Horvath C., Berghmans S. & Bogers J. (2008). Human Papillomavirus in Cervical Cancer Screening: Important Role as Biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **17**(4), 810-817.
- Brestovac B., Harnett G., Smith D., Frost F. & Shellam G. (2005). Multiplex nested PCR (MNP) assay for the detection of 15 high risk genotypes of human papillomavirus. *J Clin Virol*. **33**, 116-112.
- Cáceres M. (2009). *Análisis mutacional de los exones 3 y 18 del gen RB1 en pacientes con lesiones cervicales asociadas a VPH*. Trabajo especial de grado. Facultad de Ciencias. Laboratorio de Biología y Medicina Experimental (LABIOMEX). Universidad de Los Andes.
- Cole ST. & Danos O. (1987). Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. *J Mol Biol*, **193**(4), 599-608.
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. "Multalin" Nucl.Acids Res. Disponible en: <http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/>

- Cricca M., Morselli-Labate A., Venturoli S., Ambretti S., Gentilomi G., Gallinella G., Costa S., Musiani M. & Zerbini M. (2007). Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions. *Gynecol Oncol*, **106**, 549-557.
- Cruz J. (2003). *Estandarización del análisis del polimorfismo del gen humano p53 mediante la técnica SSCP*. Trabajo de ascenso. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Laboratorio de Biología y Medicina Experimental (LABIOMEX). Universidad de Los Andes.
- Cruzick J., Sasieni P., Davies P., Adams J., Normand C., Frater A., van Ballegooijen M. & van den Akker-van Marle E. (2000). A systematic review of the role of human papilloma virus (HPV) testing within a cervical screening programme: summary and conclusions. *Br J Cancer* **83**(5), 561-565.
- De Palo G. (1996). *Colposcopia y Patología del Tracto Genital Inferior*. 2^{da} Edición. Madrid. Panamericana. pp 135-206.
- de Sanjosé S., Diaz M., Castellsagué X., Clifford G., Bruni L., Muñoz N. & Bosch X. (2007). Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, **7**, 453-459
- de Villiers E-M., Fauquet C., Broker TR., Bernard H-U & zur Hausen H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, **324**, 17-27.
- Dell G. & Gaston K. (2001). Contributions in the domain of cancer research: Review Human papillomaviruses and their role in cervical cancer. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci*, **58**, 1923–1942.
- Doorbar J., Ely S., Sterlin J., Mclean C. & Crawford L. (1991). Specific interaction between HPV-16 E1–E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*, **352**, 824-827.
- Doorbar J. (2005). The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*, **32S**, S7-S15.
- Doorbar J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*, **110**, 525–541.
- Fernández L. (2009). *Clonamiento y secuenciación parcial del gen L1 de los papilomavirus humanos (VPH) más frecuentes en la población de Mérida- Venezuela*. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias. Postgrado en Biología Molecular. Laboratorio de Biología y Medicina Experimental (LABIOMEX). Universidad de Los Andes.
- Frattini MG. & Laimins L. (1994). Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci*, **91**, 12398-12402.

- García A. (2005). *Test rápido para detectar y tipificar el virus del papiloma humano (VPH) mediante la aplicación de una PCR multiplex*. Trabajo especial de grado. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Laboratorio de Biología y Medicina Experimental (LABIOMEX). Universidad de Los Andes.
- Garnett TO. & Duerksen-Hughes PJ. (2006). Modulation of apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins. *Arch Virol*, **151**, 2321-2335.
- Gómez M.A., Abba M.C. & Golijow C.D. (2001). Detección y genotipificación del papilomavirus humano (HPV) por PCR-LIS-SSCP. *Rev Argent Microbiol*, **33**, 22-27.
- Grases PJ., Tresserra-Casas F. & López-Marín L. (2006). Cuello uterino: atipias y lesiones premalignas no invasoras. *Rev Obstet Ginecol Venez*, **66**(2), 81-90.
- Guerrero I., Mejía R., Velazco R., Misad O. & Pow-Sang M. (1999). Oncogenes E6-E7 de los papilomavirus humanos de alto riesgo detectados por PCR en biopsias de pene incluidas en parafina. *Rev Med Exp*, **XV**, 40-43.
- Halbert C. & Galloway D. (1988). Identification of the E5 Open Reading Frame of Human Papillomavirus Type 16. *J Virol*, **62**(3), 1071-1075.
- Hegde RS., Grossman SR., Laimins LA. & Sigler PB. (1992). Crystal structure at 1.7Å of the bovine papillomavirus-1E2 DNA-binding domain bound to its DNA target. *Nature*, **359**, 502-512.
- Hughes F-J. & Romanos M-A. (1993). E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Research*, **21**(25), 5817-5823
- Klug W., Cumming M. & Spencer C. (2006). *Conceptos de Genética*. Octava edición. Madrid. Pearson Prentice Hall. pp 512-514, 518.
- Kuulasmaa T. (2002). Oligo Analyzer -1.1.2. disponible en: www.uku.fi/~kuulasmaa/OligoSoftware
- Lane DP. & Crawford LV. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, **278**, 261-263.
- Longworth M. & Laimins L. (2004). Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev*, **68**(2), 362-372.
- Mantovani F. & Banks L. (2001). The Human Papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*, **20**, 7874 -7887.
- Mark E., Schiller J., Viscidi R., Strickler H., Coursaget P., Tan T., Halsey N. & Jenkins D. (2009). Clinician's guide to human papillomavirus immunology: knowns and unknowns. *Lancet Infect Dis*, **9**, 347-356.

- Márquez L. (2005). *Análisis mutacional del exón 7 del gen p53 en pacientes con lesiones cervicales de VPH*. Trabajo especial de grado. Facultad de Ciencias. Laboratorio de Biología y Medicina Experimental (LABIOMEX). Universidad de Los Andes.
- Márquez, L. *Análisis de la región MY09/MY11 del gen L1 para la identificación de variantes de los papilomavirus humano tipo 6, 11, 16, 18, 31 y 58*. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias. Postgrado en Biología Molecular. Laboratorio de Biología y Medicina Experimental (LABIOMEX). Universidad de Los Andes.
- Ministerio del Poder Popular para la Salud. (2007). *Anuario de mortalidad 2006*. Caracas. Dirección general de Epidemiología, Dirección de Información y Estadísticas de Salud.
- Molijn A., Kleter B., Quint W. & Van Doorn L-J. (2005). Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol*, **32S**, S43–S51.
- Molina J., Guzman C., Mendez V., Blasco E. & Tamayo J. (2005). Alteraciones cromosómicas en el cáncer de cuello uterino. *VITAE Academia Biomédica Digital*, **25**.
- Moreno P., Molano M., Huertas A., González M., Bravo Ma. & García A. (2008). A non-radioactive PCR-SSCP analysis allows to distinguish between HPV 16 European and Asian-American variants in squamous cell carcinomas of the uterine cervix in Colombia. *Virus Genes*, **37**, 22–30.
- Morris BJ. (2005). Cervical human papillomavirus screening by PCR: advantages of targeting the E6/E7 region. *Clin Chem Lab Med*, **43**(11), 1171-1177.
- Motoyama S., Ladines-Llave C., Villanueva S. & Maruo T. (2004). The Role of Human Papilloma Virus in the Molecular Biology of Cervical Carcinogenesis. *Kobe J. Med. Sci*, **50**(1), 9-19.
- NCBI. (2008). *BLAST*. Programa de alineamiento de secuencias en Internet. Disponible en: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- NCBI. (2008). *Gen Bank*. Base de datos en Internet. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K. & Sekiya T. (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natd Acad Sci*, **86**, 2766-2770.
- Park J-S., Namkoong S-E., Han S-K., Nha D-J., Lee H-Y. & Kim S-J. (1993). Comparison of L1 Consensus Primers with E6 Type Specific Primers for Detection of Human Papillomaviruses in Paraffin Sections of Cervical Neoplasia. *J Korean Med Sci*, **8**(1), 60-67.
- Phelps W., Münger K., Yee C., Barnes J. & Howley P. (1992). Structure-Function Analysis of the Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncoprotein. *J Virol*, **66**(4), 2418-2427.

- Quintero M., Cruz J., Bastidas M., Márquez L. & Puig J. (2008). Detección y tipificación de virus de papiloma humano (VPH) mediante PCR-RFLP. *Rev Obstet Venez*, **68**(1), 25-31.
- Resnick R.M., Cornelissen M.T.E., Wright D.K., Eichinger G.H., Fox H.S., ter Schegget J. & Manos, M.M. (1990). Detection and typing of Human Papillomavirus in Archival Cervical Cancer Specimens by DNA Amplification with Consensus Primers. *J Natl Cancer Inst*, **82**(18), 1477-1484.
- Richart MD. (1967). Natural History of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Clin Obstet Gynecol*, **10**(4), 748-784.
- Sambrook J., Fritsch E. & Maniatis T. (1987). *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Segunda edición. N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory, CSH.
- Sánchez MA. (2004). Virus y cancer. *Biocancer*, 1, ISSN 1697-6452. Disponible en: <http://www.biocancer.com/>
- Sasagawa T., Minemoto Y., Basha W., Yamazaki H., Nakamura M., Yoshimoto H., Sakaike J. & Inoue M. (2000). A new PCR based assay amplifies the E6-E7 genes of most mucosal human papillomaviruses (HPV). *Virus Res*, **67**(2), 127-139.
- Scheffner M., Werness B., Huibregtse J., Levine A. & Howley M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, **63**, 1129-1136.
- Schiffman M., Bauer H., Lorincz A., Manos M., Byrne J., Glass A., Cadell D. & Howley P. (1991). Comparison of Southern Blot Hybridization and Polymerase Chain Reaction Methods for the Detection of Human Papillomavirus DNA. *J Clin Microbiol*, **29**(3), 573-577.
- Schiffman M., Castle P.E., Jeronimo J., Rodriguez A.C. & Wacholder S. (2007). Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*, **370**, 890-907.
- Smotkin D. & Wettstein F. (1987). The Major Human Papillomavirus Protein in Cervical Cancers Is a Cytoplasmic Phosphoprotein. *J Virol*, **61**(5), 1686-1689.
- Sotlar K., Diemer D., Dethleffs A., Hack Y., Stubner A., Vollmer N., Menton S., Menton M., Dietz K., Wallwiener D., Kandolf R. & Bültmann B. (2004). Detection and Typing of Human Papillomavirus by E6 Nested Multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, **42**(7), 3176-3184.
- Spinoso V. & Muniesca J. (2008). *El virus del papiloma humano ¿un enemigo vencido?*. Boletín oncológico del Hospital general de Teruel España. Extraído el 15-08-2009. Disponible en : <http://www.boloncol.com/boletin-25/el-virus-de-papiloma-humano-un-enemigo-vencido.html>

- Stevens A. & Lowe J. (2006). *Histología humana*. Tercera edición. España. Elsevier. pp 348-352.
- Talaat S. & Tadros MD. (2008). El cáncer cervicouterino o cervical: NIC y la Etapificación del Cáncer. *Cancerquest* .Escuela de Medicina. Universidad de Emory. Imagen extraída el 11-04-2009. Disponible en: <http://www.cancerquest.org/>
- Tjalma W., Van Waes T., Van den Eeden L. & Bogers J. (2005). Role of human papillomavirus in the carcinogenesis of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, **19**(4), 469-483.
- Torres J. (1998). Lesiones escamosas intraepiteliales cervicales L.E.I.C. *Rev Col Obstet Ginecol*, **49**(4), 220-225.
- Trejo-Solórzano O., Tolentino-López JA., Gómez-Orihuela J., López-Velásquez JL. & García-Martínez M^a del Carmen. (2007). *Rev Fac Med UNAM*, **50**(4), 155-157.
- Tungteakkhun S. & Duerksen-Hughes P. (2008). Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Arch Virol*, **153**, 397-408.
- Yoshikawa H., Kawana T., Kitagawa K., Mizuno M., Yoshikura H. & Iwamoto A. (1991). Detection and typing of multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. *Jpn J Cancer Res*, **82**, 524-531.
- Yu T., Ferber M., Cheung T., Hung Chung T., Wong Y. & Smith D. (2005). The role of viral integration in the development of cervical cancer. *Cancer Genet Cytogenet*, **158**, 27-34.
- [Zehbe I.](#), [Sällström JF.](#), [Evander M.](#), [Edlund K.](#), [Rylander E.](#), [Wadell G.](#) & [Wilander E.](#) (1996). Nonradioisotopic detection and typing of human papillomaviruses by use of polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism. *Diagn Mol Pathol*, **5**(3), 206-213.
- Zheng Z-M. & Baker C-C. (2006). Papillomavirus Genome Structure, Expression, and Post-Transcriptional Regulation. *Front Biosci*, **11**, 2286–2302.
- zur Hausen H. (2000). Papillomaviruses causing cancer: evasion from host–cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*, **92**, 690–98.

Alineamientos que permitieron determinar la longitud de los fragmentos amplificados:

Par de oligonucleótidos DAM_E6F/R1:

VPH 45

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
39:102-578	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	ATGGCGCGCTTTGACGATCCAACGCAACGCCCTACAGCTACCCAGATCTGTGCACAGATTGATACATCACTACAGACGTATCTATTGCCGTGTATATTGCAAGCAACATTGGAACGCACAGAGG													
Reverse														
Consensusgagg													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
39:102-578	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	TATATCAATTTGCTTTTAAAGATTATTTATAGTGTATAGAGCTGTATAGCATATGCTGCATGCCATAAATGTATAGACTTTTATCCAGATTAGAGATTAGATATTATTCARACTCTGTATATGG													
Reverse	TATATGANTTTGCATT													
Consensus	tatat.a.tttgc.tt.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
39:102-578	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	AGAGACACTGGAAAAATAACTAATACAGAGTTGTATATTTGTTAATAGGTGCCCTGCGGTGCCGAAACATTGAAACCCAGCAGAAAAACCTAGACACCTTAGGACAAACAGAGATTCCACAGCATA													
Reverse	TGCAAAACCCNTTGTGTCC													
Consensustg.ca.aaacc.ttg...cc.....													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	477				
39:102-578	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	GCTGGACAGTACCGAGGGCAGTGTATACATGTTGTGACAGGGCAGGCAAGAAAGACTTCGCAGACGTAGGGAAACACACAGTATAG													
Reverse														
Consensus													

VPH 83

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
59324:1-444	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	ATGTCAGGAGTGCGGTACCCACCACACATATTTCTGCTGTGCAAGACTGCGAGGTGATTTGAGAGCTTACGACTGATTTGCATTATTGCACAATGATTAACACAGCAGAGTGTGTCCTTTG													
Forward														
ConsensusGAGGTATATGANTTTGga.gt......tttg													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
59324:1-444	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	CATGGAGGAGCTGTGTATTAGTGGGACCACGACTGCCCTACGGAGCTGTGCACAGTGTCTACGTAAGCAGCAAGGTGCGAGAGCTACGGCACTGGAGCCACTCAGCTACGGGGCAGCAGTAGA													
Forward	CATT													
Consensus	cat.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
59324:1-444	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	AGAGAAACAAAACACCACTGGCACAGCTGTATATACGATGCCATATGTCCTGAAAGCCGTTGAGTAGTCAGAAAAGAAATATTTGGTCAACAGGTGATAGACTTCATATATAGCAGGACAGTGG													
Forward	TGCAAAACCCNTTGTGTCC													
Consensustg.c..aa.cc.ttg.gt.....													
	391	400	410	420	430	440	444							
59324:1-444	----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	ACAGGACGGTGTGCCATTGTAGGGCACCATGCACGGCCATACAGCAACATAG													
Forward														
Consensus													

VPH 33

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
049:109-558	-----													
Forward	ATGTTTCAAGCACTGAGGAAAACCCAGACATTCATGATTTGTGCCAAGCATTGGAGACAATAACACACATTGAACACAGTGCCTGGGATGCAAAAACCTTTGCACGATCTGAGGTATATG													
Reverse														
Consensusgaggtat.g													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
049:109-558	-----													
Forward	ATTTTGCATTGCAGATTTACAGTTGTATATAGAGAGGGAAATCCATTTGGAAATGTAAACGTGTTTGCAGTTCTTATCTAAATTAGTGAAATAGACATTATATTATTCTGTATATGGAAATAC													
Reverse	ANTTTGCATT													
Consensus	a.tttgcatt.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
049:109-558	-----													
Forward	ATTAGAACAAACAGTTAAAAACCTTAAATGAATATTATTAGGTGATTATATGTCAAAAGACCCTTGTGTCCTCAGAAAAAAACGACATGTGGATTAAACAAACGATTTCATATATTTCCGGT													
Reverse														
Consensustgtcaaa.acc.ttgtgtcc.....													
	391	400	410	420	430	440	450							
049:109-558	-----													
Forward	CGTTGGCAGGGCGCTGTGCGGCGTGTGGAGGTCCTGACGTAGAGAACTGCACGTGTA													
Reverse														
Consensus													

VPH 31

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
048:108-557	-----													
Reverse	ATGTTCAAAAATCCTGCAGAAAGACCTCGGAATTCATGAACCTAGCTCGGATTTGAAATACCTACGATGAACCTAGATTGAATTTGTCTACTGCARAGGTACGTTAACGAAACAGAGGTATTAG													
Forward														
Consensusgaggtat.g													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
048:108-557	-----													
Reverse	ATTTTGCATTACAGATTTACAAATAGTATATAGGACGACACACACAGGAGTGTACAAAATGTTAAGATTTTATTCAAAAGTAGTGAAATTAGATGATATAGTGTATGGAACAC													
Forward	ANTTTGCATT													
Consensus	a.tttgcatt.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
048:108-557	-----													
Reverse	ATTAGAAAATTGACAACAAAGGTATATGTGATTTGTTAATTAGGTGATACCTGTCAAAAGACCCTTGTGTCCTCAGAAAAAAACAGACATTTGGATAAAAGAAACGATTCACACATAGGAGGA													
Forward														
Consensustgtcaaa.acc.ttgtgtcc.....													
	391	400	410	420	430	440	450							
048:108-557	-----													
Reverse	AGGTGGACAGGACGTTGCATAGCATGTTGGAGAGACCTCGTACTGAACCCAGGTGTA													
Forward														
Consensus													

VPH 11

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
26:102-554	-----													
Reverse	ATGGAAAGTAAAGATGCTCCACGTCTGCACATCTATAGACCAGTTGTGCAGACGTTAATCTTTCTTGCACACTCTGCRAATTCAGTGCCTGTTTGCAGGAATGCCTGACCACCCGACGAGATAT													
Forward														GAGGTAT
Consensus														gag.tat
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
26:102-554	-----													
Reverse	ATGCATATGCCTATAGAACCTAAGGTTGTGTGGCGAGACACTTCCCTTTGCAGCGTGTGCTGTTGCTTAGAAGTGCARAGGGAAATTAACCAATATAGACACTTAAATATGCTGCATATGCACC													
Forward														ATGANTTGCATT
Consensus														atg.t.tgc.t.
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
26:102-554	-----													
Reverse	TACAGTAGAGGAGAACCAATGAGATATTTAAAGTGTAAATTCGTTGTTACCTGTGTCACAGCCGTTGTGTGAATAGAAAACCAAGCACATATTGGGAAGGCACGCTTCATAAACTAAAT													
Forward														TGTCARAAACCNTTGTGTC
Consensus														tgtca.aa.cc.ttgtgt.
	391	400	410	420	430	440	450	453						
26:102-554	-----													
Reverse	AACAGTGGAGGGTCGTTGCTTACACTGCTGGACACATGCATGGAGACTGTTACCCATA													
Forward														
Consensus														

VPH 58

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
386:110-559	-----													
Forward	ATGTTCCAGGACGACAGAGGAGAACACGGACATTGCATGATTTGTGTCAGGCGTTGGAGCATCTGTGCATGAATCGAATGAATGCGTTGAATGCARAAAGACTTTGCAGCGATCTGAGGTATATG													
Reverse														GAGGTATATG
Consensus														gaggtatatg
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
386:110-559	-----													
Forward	ACTTTGTATTTCAGATTTAAGATAGTATAGAGATGGAAATCCATTTGCAGTATGTAAGTGTGCTTACGATTGCTATCTAAATTAAGTGAGTATAGCATTATAATTATTCGCTATATGGAGCAC													
Reverse														ANTTGCATT
Consensus														a.tttg.att.
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
386:110-559	-----													
Forward	ATTAGACAAACACTAAAAGTGTAAATGAATATTAATAGATGATTTATTTGTCARAGACCATTGTGTCACAGAAAAAAGGCATGATTTAACAAGAGTTTCATAATATTTCCGGT													
Reverse														TGTCARAAACCNTTGTGTC
Consensus														tgtcaaa.acc.ttgtgcc.
	391	400	410	420	430	440	450							
386:110-559	-----													
Forward	CGTTGGACAGGGCGCTGTGAGTGTGTTGGAGACCCGACGTAGACAAACACAGTGTAA													
Reverse														
Consensus														

VPH 39

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
245:107-583	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	ATGGCGCATTTCAACATCCTGCAGAACGGCCATACAAATTGCCAGACCTGTGCACACGCTGGACACCACCTTGACAGGACATTACAAATAGCTGTGTCTATTGCAGACGACCACTACAGCAAACGGAGG													
Reverse														
Consensusgagg													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
245:107-583	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	TATATGATTTTGCATTAGTGATTTATATGTAGTATATAGGGACGGGARCCACTAGCTGCATGCCAATCATGTATAAAATTTTATGCTAAATACGGGAGCTACGATATTACTCGGACTCGGTGTATGC													
Reverse	TATATGANTTTGCATT													
Consensus	tatatga.tttgcatt.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
245:107-583	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	AACTACATTAGAAAATATACTAATACAAAGTTATATATATTATTAATAGGTGCATGTGTCTGAARCCGCTGTGTCCAGCAGAAAATTAAGACACCTAATAGCAACGAGATTTTCATAAATA													
Reverse	TGCAAAAACCCNTTGTGTCC													
Consensustgtc..aaacc..tgtgtcc.....													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	477				
245:107-583	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	GCAGGAGCTATACAGGACAGTGTGACGGTGTGGACCAAAAACGGGAGGACCGCAGACTAACACGAGAGAAACCCAGTATAA													
Reverse														
Consensus													

VPH 56

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
53:102-566	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	ATGGAGCCCAATTCACATCCACAGGACGCTCCACGAGCCTGCACCCTTGAGTGAGGATTAGAATAACCTTATTGATCTTAGATTATCATGTGTATATTGCAAAAAGGAACTAACACGTGCTG													
Reverse														
Consensusg													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
53:102-566	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	AGGTATATAATTTGCATGCCTGAATTAATAGTGATAGGGATGATTTCCCTATGCAGTGTGCAGATATGTTATTGTTTATAGTAAGTTAGAAAATATAGGTATTATGACTATTACGTGTA													
Reverse	AGGTATATGANTTTGCATT													
Consensus	aggatata.a.tttgcatt.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
53:102-566	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	TGGAGCTACACTAGAAAGTATACTAATAAACAGTTATGTGATTTATTAATAGGTGTACAGATGTCAAAAGTCCGTTAATCCGGAGAAAAGCAATTGCATTGTACAGAAAAGACGATTTTCATCTA													
Reverse	TGCAAAAACCCNTTGTGTCC													
Consensustgtcaaa..cc.tt..tcc.....													
	391	400	410	420	430	440	450	460	465					
53:102-566	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	ATAGCACATGGTTGACCGGGTCATGTTGGGGTGTGGAGCAAAACATCTAGAGACCTAGAGAAATCTACAGTA													
Reverse														
Consensus													

VPH 35

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
050:110-559	-----													
Forward	ATGTTTCAGGACCCAGCTGACGACCTTACAACCTGCATGATTTGTGCACGAGGTAGAGAAGCAGCATCCATGAATTTGTTGAATTTGTATCTGCAACACAGAAATACAGCGAGTGAGGTATATG													
Reverse														
Consensusgaggtat.at.g													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
050:110-559	-----													
Forward	ACTTTGCATGCTATGATTTGTGTATAGTATATAGAGAGGCCAGCCATATGGAGTATGCATGAATGTTTAAATTTTATTCAAAATAAGTGAATATAGATGGTATAGATAGTGTGTATGGAGAAC													
Reverse	ANTTTGCATT													
Consensus	a.tttgcat.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
050:110-559	-----													
Forward	GTTAGAAAAACAAATGCAACAAACAGTTATGTCATTATTATTAGGTGATTACATGTCAAAAACCGCTGTGTCCAGTTGAAAGCAAGACATTTAGAGAAAAAACGATCCATACATCGGTGGA													
Reverse														
ConsensusTGTCAAAAACNTTGTGTCC tgtcaaaaacc.tgtgtcc.....													
	391	400	410	420	430	440	450							
050:110-559	-----													
Forward	CGGTGGACAGGTCGGTGTATGTCCTGTTGGAACCAACACGTAGAGAACCAGGTGTAA													
Reverse														
Consensus													

VPH 52

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
038:102-548	-----													
Reverse	ATGTTTGAGGATCCAGCAACACGACCCCGACCTGCACGATTTGTGAGGTGCTGGAAGARTCGGTGCATGAARTAGGCTGCAGTGTGTGCAGTGCAAAAAAGAGCTACACGAGAGAGGATATACA													
Forward														
ConsensusGAGGTATATG gaggtata..													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
038:102-548	-----													
Reverse	AGTTTCTATTACAGATTTACGARTAGTATATAGAGCAATAATCCATATGGCGTGTATTATGTGCCACGCTTTTATCTAAGATAGTGAATATAGGCATTATCAATATTCACCTGTATGGGAAC													
Forward	ANTTTGCATT													
Consensus	a.ttt..att.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
038:102-548	-----													
Reverse	ATTAGAGAGGAGGGTAAAAAACCCATTAGTGAARTACTATTAGATGTATATTTGTCAAACGCCATTATGTCCGAGAGAAAAAGAAAGACATTTAATGCAACACAGCGATTTTCATATATATGGGT													
Forward														
ConsensusTGTCAAAAACNTTGTGTCC TGTCAAAAACNTTGTGTCC tgtcaaaa..cc.tt.tgtcc.....													
	391	400	410	420	430	440	447							
038:102-548	-----													
Reverse	CGTTGGACAGGGCGCTGTTACAGAGTGTGGAGACCCCGACCTGTGACCCAGGTGTAA													
Forward														
Consensus													

VPH 54

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
782:102-536	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	ATGTCGTCTACTGAACCCACACGACCAGCCGCGTACTCTAGCTGATTTGTGCAGGATGCAATATCCATGCTAGTTTGCRACTTCCTTGTGCCTTTTGCAGAGACGGTGTACAGCAGAGA													
Forward														GAGG
Consensusgag.													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
782:102-536	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	TTTATGCATTTCAATATAGGACCTATTTGGTGTGGAGACACGGCTTCCACATGCTGCATGTGCCTAGAACTGCACGGGCAATTAATTATAGAGGCATCGCGACCCGTGCGTGCCTGTG													
Forward	TATATGANTTTGCAAT													
Consensus	t.tatg...ttt...at.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
782:102-536	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	GGAAACAGTGGACACAGAGTGTGGAAAGCCATTGGAGAAATATTTATAGGTGCTGGCTGTGCCATAAACCTTTGTGCACGTGGAAAGCACGGCACGTAGATTACACAGGCGATTCACCTGTGT													
Forward														TGCAAAACCCNTTGTGTCC
Consensustg.ca,aaacc,ttgtg.....													
	391	400	410	420	430	435								
782:102-536	----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	AGAGGCTATTGGAGGGTAGGTGTCTACATTGCTGGAGCCATAA													
Forward														
Consensus													

VPH 66

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
290:102-569	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	ATGGATTCATATTCAGCAATACACAGGACCGTCCACGAGCCTGCACCATCTGAGCGAGGTATTACAAATACCTTACTTGATCTTAGATTATCATGTGTATCTGCAAAAGGAACTTACAGTTTAG													
Reverse														
Consensusg													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
290:102-569	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	AGCTATATAGGTTTGCATGTATTGAGTTAAACTAGTATATAGAACCAATTGGCCATATGCAATGATAGGGTATGTTTATGTTTATAGTAGGTTAGAAATATAGGTAATAAATTCAGTGTAT													
Reverse	AGGATATGANTTTGCATT													
Consensus	ag.tatat...tttgcatt.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
290:102-569	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	TGGGGCACATTAGAAGTATAACTAARAAACAGTTATCTGATTTATCAATAGGTGCTACCGATGTCCATACACCGGAGGAAACCAATTCACCTGTGACATTAAGAGCAGTTTCATTTAT													
Reverse														TGCAAAACCCNTTGTGTCC
Consensustgtcaa...cc,tt...cc.....													
	391	400	410	420	430	440	450	460	468					
290:102-569	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	ATAGCATATGCATGGACCGGTCATGTTTGCAGTGTGGAGACATACAGTAGACAGCTACAGAACTACAGTATAA													
Reverse														
Consensus													

VPH 62

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
32599:1-447	-----													
Reverse	ATGACTGCAGGGCCAGCAAGGCCACGACCTGTTTTGCTGTGTAAGGAGTATGATGTGGACCTGGACGACCTGCACCTAACCTGCATATTTGCAAAACAGACCTGTCCGCCGGTGAACCTGCTGTCCCT													
Forward	GAGGTATATGANTTTGCATT													
Consensusa.g.a.tg.tttgc.t.....t.t.aaaac.....tgtcc.....													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
32599:1-447	-----													
Reverse	TTGCATACGGGACTACACGTGGTGGCGAAGGACTGGCCATTTGGAGTATGCGCAGCATGCCATTGAGAGAGATTAAAGTAAGAGAGCTACGGCGTGGCAGCACTCATGCTTTGGATAACAGT													
Forward														
Consensus													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
32599:1-447	-----													
Reverse	AGAAGAGGAACAGGCAGTCCGCTTGACAAATATATATTAGATGCCATGCTGTATGCCATTAACTGTGAGGAAAGGAGTATCAGGTAGAGGGGGAGTGCCTTCCACAAATAGCAGGAGTG													
Forward														
Consensus													
	391	400	410	420	430	440	447							
32599:1-447	-----													
Reverse	TGGACAGGACGGTACCACCAATTGTAGAGGAGTATGCACGGCCAGGCAGCAACTATAA													
Forward														
Consensus													

VPH 59

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
'236:55-537	-----													
Forward	ATGGCAGCCTTTGAGGATCCTACACAGCACCATACAACTGCCTGATTTGAGCACACATTTGATATTCCTCTGCATGATATTCGCATCATTGTGTGTTTGCARAGGGGAACTGCARAGAAAGAGAGGG													
Reverse	GAGG													
Consensusgagg													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
'236:55-537	-----													
Forward	TATTTGAATTTGCTTTTAAAGACTTATTTATAGTGTATAGAGACTGTACACCGTATGACGCTGTCTGAATGCATTTTCATTTTATGCARAGGTAGAGGATTAAGATATTATAGAGATCCGTTGATGG													
Reverse	TATATGANTTTGCATT													
Consensus	tat.tga.tttgc.tt.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
'236:55-537	-----													
Forward	AGAAACATTAGAGGCTGAACCAAGACCCGTTACATGAGCTGCTGATACGCTGTTATAGATGCCAAAACCTATGTCCACACAGATAAATTAAGCATATACTGA AAAAAGAGATCCATATATA													
Reverse	TGCAAAAACNTTGTGTCC													
Consensustg.c.aaaacc..t.tgtcc.....													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	483			
'236:55-537	-----													
Forward	GCTGGAAATATACAGGACAGTGTCTGGGTGTCGGACCCGAGCAGACACCTAAGACAGCAGCAGCAGCGCTAGTGAACACTGGTGTAA													
Reverse														
Consensus													

VPH 80

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
565:200-625	-----													
Forward	ATGGATAGGCCAAGCCTTCTCTGTGCAGGAGCTTGAGACACTCTTTGTATACCTTTAGTAGATATTTATTGCCGTGTAGGTTTTGTCAAGATTTTAACTTATATAGGTTAGTAGTTTGATC													
Reverse														
ConsensusTGCAAAACCNTTGTGTCC.....tg..a.a.c.ttgt.t.c.....													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
565:200-625	-----													
Forward	GCAATGTTTGCAGTTGATTTGGACTGARGAGACTTTGTCTTTGGCTTGTGTAGCAGTTGTGCTTTTGTACTGCACAAATTTGAATTTTCTACATTTATGACAGTCAGTGTGTGGTGGGAGATTGA													
Reverse														
Consensusga.g..t.tg..tttgc.t.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
565:200-625	-----													
Forward	GGTAGTTGAGCGAARAGCTGTTGGAGACATTACTATTTCGTTGCAATTTTGTAAAGAAATAGATTAAATAGAAAGTTAATATTTGTACAAACCAGCAGCAATTCATAGGTAAGGCGCAATTTG													
Reverse														
Consensus													
	391	400	410	420	426									
565:200-625	-----													
Forward	AAAGGATTGTGTAGCATTGTGGGTCGATAGATGA													
Reverse														
Consensus													

VPH 26

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
6956:97-549	-----													
Forward	ATGTCGAGGATCCTAGAAGACACCCAGAACGCTACATGAGCTATGTGAAGCTTGAATACTCTTTGCCAAATTTGCAGGTACAGTGTGTATTTGCAGGAACCTTCAATGGGCTGATGTATATA													
Reverse														
Consensusga.gtatat..GAGGTATATG													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
6956:97-549	-----													
Forward	ATTTTGCATTTGTGACCTAAGAGTAGTATATAGAGATAGGAGTCCGATGTCTGCATGCAAAAGATGTGAATATTTTATTCAAATAACAGAGTATAGACGCTATACATGTTCTGTGTATGGTCAC													
Reverse														
Consensus	a.tttgca.t.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
6956:97-549	-----													
Forward	ATTAGAGCCTTAACTAAAAAGTTTATGTAATTTGTTAATAGGTGTATAGATGTCAAAATGCCATTGGGGCCAGAGAAAAACAAGATTTGGATGAAAGCGACGATTTCCAGAAATAGCAGGG													
Reverse														
ConsensusTGCAAAACCNTTGTGTCC.....tgtcaaa..cc.ttg.g.cc.....													
	391	400	410	420	430	440	450	453						
6956:97-549	-----													
Forward	CAGTGGAAAGGGTTGTACAAATTTGTGGAGCCAGGCGCCAAACAGAAACACACAGTGTAA													
Reverse														
Consensus													

VPH 70

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
493:107-583	-----													
Forward	ATGGCGCGATTCCCAATCCTGCAGAACGGCCATACAAATTGCTGACCTGTGCACGGCGTGGACACTACATTGCACGACATTACATAGACTGTGCTATTGTAARAACACAGCTACAGCAACAGAGG													
Reverse	GAGG													
Consensusgagg													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
493:107-583	-----													
Forward	TATATGAATTTGCATTAGTGATTATTATAGTATATAGAACGGGGAGCCATATGCTGCATGCCAAAATGTATTAATTCATGCTAAGTARGGGACTACGGCATTATTCGAACTCGGTGTATGC													
Reverse	TATATGANTTGCATT													
Consensus	.tatatga.tttgcatt.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
493:107-583	-----													
Forward	AACAACTTTGGAAAGCATACTAATACCAAGTTATATAATTTATCAATAGGTGCATGAGTTGCCGAAACCATTTGGTCCAGCAGAAAATTAGGCATGTTAATACCAAAAGAGATTACCAAAATA													
Reverse	TGCAAAAACCCNTTGTGTCC													
Consensustg.c..aaacc.ttgtgcc.....													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	477				
493:107-583	-----													
Forward	GCAGGAGCTATACAGGACAGTCCGACACTGCTGGACCAGCAACCGGAGGACCAGCAGCTATACGAGAGAAACACAAGTATA													
Reverse														
Consensus													

VPH 44

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
242:105-557	-----													
Reverse	ATGGAAAGTGCAATGCCTCCACGCTGCACAAAGTATAGACCAGTTGTGCAAGGAGTGACACATTCCTATGCACARTCTGCAAAATTTATGCGTGTTCGAGAAAACGTTAAGTACTGCAGAGGTT													
Forward	GAGGTAT													
Consensusgaggt.t													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
242:105-557	-----													
Reverse	ATTCAATTCGCATATAAACAGTTATATGTAGTGTACCGAGGAACTTCCATTTGCAGCCTGTGCCATTTGTTTAGAACTACAGGTARGGTCAATCAATTTAGGCATTTTAACTACGCGGGATATGCAGT													
Forward	ATGANTTGCATT													
Consensus	.at...tt.gcat.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
242:105-557	-----													
Reverse	AACAGTGGAGAGAAACAAATAGTCARTTCTGGACGTGCTGATACGCTGATTTTGGCCACAAACCATTTGTGCCACGCTGGAAAGGTGCGCCACATATTGGACAGGGCGCATTCAATTAATTACAA													
Forward	TGCCACAAACCATTTGTGCCACGCTGGAAAGGTGCGCCACATATTGGACAGGGCGCATTCAATTAATTACAA													
Consensustg.ca..aaacc.ttgtg.c.....													
	391	400	410	420	430	440	450	453						
242:105-557	-----													
Reverse	GATACCTGGAGGGTCCGCTCCATTGTTGGACATCATGCATGGAACATATACTACCTTAA													
Forward														
Consensus													

VPH 67

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
267:102-551	-----													
Reverse	ATGTTTCAGGACACAGACGAAAAACACGCAACCTGCACGAATTGTGTGAAGCTTTGGAAACCCACGGTGCATGAARATAGTTTGCCCTGCGTGCAGTGCRAAAAAACTTTGGACAGAACGAGGTATATG													
Forward														GAGGTATATG
Consensus														gaggTatAtg
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
267:102-551	-----													
Reverse	ACTTTTATTACTGATTTGAAATAGTATACAGATGTTGGGATCCGATGGGTATGTARGCATGCTTARAGCTGTTATCAAAAGTTAGTGAATATAGATATTTTAACTATTCAATATATGGAATAC													
Forward														ANTTTGCATT
Consensus														a.ttt..att
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
267:102-551	-----													
Reverse	TTTAGAGGAATGTGCATAAACATTAAATGAATTACATACGATGATATACATGTCAAAAGACCATTTGTGCCACAGAAAGCAAGGCATGTTGATCGCAAAAGCGATTTTCATAATATTTCCAT													
Forward														TGTCAAAACCCNTTGTGTCC
Consensus														tgTcaaa.acc.ttgTgtcc
	391	400	410	420	430	440	450							
267:102-551	-----													
Reverse	CGTTGGACGGGACGGTTCAGTGTGTTGGAGACCTCACGAAACGACGCCAGGTATATA													
Forward														
Consensus														

VPH 51

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
secuencia	-----													
Forward	ATGTTTCAGGACACAGAGGGAAAGACCACGAAACCTGCATGAATATGTGTGAAGCTTTGACGTTTCTATGCACATATACAGGTAGTGTGTGTTATTGTAARAAAGGAATATGTAGAGCA													
Reverse														GAGGTATATA
Consensus														ga.gTatAt.
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
secuencia	-----													
Forward	ATGTAGCATTACTGAATTAAGATTGTATATAGGGATAATCCATATGCAGTATGCAACCAATGTTACTGTTTATCAAAATTAAGAGATATAGACGTTATAGCAGGTCGTGTATGGTACTAC													
Reverse														ANTTTGCATT
Consensus														a..t.gcatt
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
secuencia	-----													
Forward	ATTAGAGGCATTACTAAAAAAGCTTATATGATTTATCGATAAGGTGTCATAGATGTCAAAAGACCATTTGGGCTGAGAAAGCAAAATTTGGTGGACGAAAAAAGGTTCCATGAATAGCGGGA													
Reverse														TGTCAAAACCCNTTGTGTCC
Consensus														tgTcaaa.acc.t..g.cc
	391	400	410	420	430	440	450	456						
secuencia	-----													
Forward	CGTTGGACGGGCAATGCGCTAATTGCTGGCAACGTACACGACACGTAACGAACCCAGTGTAA													
Reverse														
Consensus														

VPH 61

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
82:102-542	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	ATGGGACCGTGCAATCCAACTAATATTTTCTGCTGCAAGGACTACGAGGTGGACTTTGAGGATTTAAGGCTGACATGTGATTTTGC AAAATGATTAACACAGAGATTGCTGGCGTTGCAC													
Reverse	GAGGTATATGANTTTGCATT													
Consensusagg..ta.ga..t.g.tt.....													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
82:102-542	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	TAARAGGAGCTAAGCATTGTGTGGAGACATAACTGGCCATTTGGAGTATGCGCACCATGCTTGGCACGTGAAGTAAAGTGAGGGAGCTGCGACATTGGGACCATTCCTGTTACGGACCCACTGTGGARCA													
Reverse														
Consensus													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
82:102-542	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	GACACAGGACGGTCATTAGCTGAACATATATACGGTGCCATGTCAGGCAACCCGTTAAGTATACAGGAARAGGAGCATCAGGTACAGGCATACATCCACTTCCACTATATAGCTGGACAGTGGACG													
Reverse	TGTCAAARACNTTGTGTCC													
Consensustg...aaacc.tt..gt.....													
	391	400	410	420	430	441								
82:102-542	----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	GGARAGGTGTGCCAGTGTAGAGGGCCATGCACGGCCAGGTGGCAACATAA													
Reverse														
Consensus													

VPH 6

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
612:103-555	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	ATGGAAGTGCRAATGCCTCCACGCTGCACACGACCATAGACCAGTTGTGCAAGACGTTTARTCTATCTATGATACGTTGCAAAATTAATTTGTGTTTTGCAAGATGCACAGGACTGACAGGATTT													
Forward	GAGGTAT													
Consensusgag.t.t.....													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
612:103-555	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	ATTCTATGCAATATAACAGCTAAGGTCCTGTTTCGAGGCGGCTATCCATATGCAAGCTGCGCGTGCCTAGAATTCATGGAAATTAACCAATATAGACACTTTGATTATGCTGGATATGCAC													
Forward	ATGANTTTGCATT													
Consensus	at...t.tgcat.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
612:103-555	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	AATGTTGAGAGAGAACTAACAGACATTTAGACGTGCTAATTCGGTGTACCTGTGTCACAAACCGCTGTGTGAGTAGAARAGGTAAACATATACTAACAGGCACGGTTCATTAAGCTAAT													
Forward	TGTCAAARACNTTGTGTCC													
Consensustgtca.aaacc..tgtgt.....													
	391	400	410	420	430	440	450	453						
612:103-555	----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	TGTACGTGGARAGGTCGCTGCCTACACTGCTGGACACATGCTGAGAGACATGTTACCCCTAA													
Forward														
Consensus													

VPH 53

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
46:102-566	ATGGATCGTCAGTATTTGAAATACAGAGAGCGACCACGTACATTGCACCAGCTATGTGAAGTTGTGARTAAACCATTGCTGGAGCTGCARCTTGGCTGTGTCTTGCAGAGAGGCATTGACAGCGT													
Forward														
Reverse														
Consensus													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
46:102-566	CAGAGGTATATAATTTTGCATATACAGATCTAAGAGTAGTGTATAGAGACGGGTATCCGTATGGAGTGTGCAAACTCTGTTGCTATTTTATAGTAGGTCGAAATTAAGATATTACAATTGTTTCAGT													
Forward														
Reverse	GAGGTATATGANTTTGCATT													
Consensus	..gaggtatat.a.tttgcat.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
46:102-566	GTACGGGGCTAGCCTGGAGCACTAACTAAAAAAGTTATCTGATTTATCAATAGGGTGTACAGATGTCARACATCCGTTGACACCAGAGGAAACAGTTACACTGTGACTATAGAAACGGTTTCAC													
Forward														
Reverse	TGTCAAAAACCCNTTGTGTC													
Consensustgtcaa.a.cc.ttg...cc.....													
	391	400	410	420	430	440	450	460	465					
46:102-566	AAATTTCCATATGTGGACCGGGTCGTGCTGACATGCTGGAGACACACACAGCAACTGAATCAGCAGTATAA													
Forward														
Reverse														
Consensus													

VPH 16

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
33031:83-559	ATGCACCAAAAGAGACTGCARTGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCACAGTTATGCACAGAGCTGCARACACTATACATGATATAATATTAGAAATGTGTACTGCAGCACACGT													
Forward														
Reverse														
Consensus													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
33031:83-559	TACTGCAGCTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTTATGCATAGTATATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGTAATGTTAAAGTTTATTTCTAAAATTAGTGGATATAGACATTATTG													
Forward														
Reverse	GAGGTATATGANTTTGCATT													
Consensusgaggtatatga.tttgc.tt.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
33031:83-559	TTATAGTTGTATGGACACACATTAGAACAGCAATACACAAACCGTTGTGTATTTGTTAATTAGGTGATTAACTGTCARAAACCACTGTGTCTTGAGAAAGCAAGACATCTGGACAAAAGCAA													
Forward														
Reverse	TGTCAAAAACCCNTTGTGTC													
Consensustgtcaaaa.cc..tgtgtcc.....													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	477				
33031:83-559	AGATTCCATATAATAGGGTCCGGTGGACCGGTCGATGTATGCTTGTGTCAGATCATCAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAA													
Forward														
Reverse														
Consensus													

VPH 18

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
975:105-581	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	ATGGCGCGCTTTGAGGATCCARCACGGCGACCCACACAGCTACCTGATCTGTGCACGGAACTGAACTCTCACTGCAGACATAGAARTAACCTGTGTATATTGCAGACAGTATTGGAACCTACAGAGG													
Reverse														
Consensusgagg													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
975:105-581	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	TATTGAATTTGCATTTAAGATTATTGTTGGTATAGAGACAGTATACCCATGCTGCATGCCATAAATGTATAGATTTTATTCTAGAATTAGAGATTAGACATTATTCAGACTCTGTGTATGG													
Reverse	TATATGANTTTGCATT													
Consensus	lat.tga.tttgcatt.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
975:105-581	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	AGACACATTGGAAAACCTAACAACACTGGGTTATACATTTATTAAATAGGTGCCGTGCGGTGCCAGAAACCGTTGATCCAGCAGAAAACCTTAGACACCTTAATGAAAACGACGATTTCCACACATA													
Reverse														
ConsensusTGCAAAACCCNTTGTGTCCtg.ca.aaacc.ttg..tcc.....													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	477				
975:105-581	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	GCTGGGCACATAGAGGCCAGTGCATTTCGTGCTGCACCCGACGACGACGAGGAACTCCACGACGCGAGGAAACACACAGTATAA													
Reverse														
Consensus													

Par de oligonucleótidos DAM_E6F/R2:

VPH 45

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
839:102-578	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	ATGGCGCGCTTTGACGATCCARCACACGACCCACACAGCTACCTGATCTGTGCACGAAATGAATACATCACTACAAGACGTATCTATTGCCGTGTATATTGCAAGCACACATTGGACGACACAGAGG													
Forward														
Consensusgagg													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
839:102-578	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	TATATCAATTTGCTTTAAGATTATTATAGTGTATAGAGACTGTATAGCATATGCTGCATGCCATAAATGTATAGACTTTTATTCCAGAATTAGAGATTAGATATTATCAAACTCTGTATATGG													
Forward	TATATGANTTTGCATT													
Consensus	lat.at.a.tttgc.tt.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
839:102-578	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	AGAGACACTGGAAAARATACATAACAGAGTTGTATATTTGTTAAATAGGTGCCGTGCGGTGCCAGAAACCTTAGACACCTTAGGACAAACGAGATTCCACAGCATA													
Forward														
Consensusaaacc.ttg...ccag.agaaaa.....													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	477				
839:102-578	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	GCTGGACAGTACCAGGGCAGTGTATACATGTTGTGACCCAGGACGACGAGGAAAGACTTCGACGACGTAGGGAAACACACAGTATAG													
Forward														
Consensus													

VPH 83

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
59324:1-444	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	ATGTCAGGAGTGCGGTACCCACCAACATATTTCTGTGTGCAAGACTGCGAGGTGGATTGGAGACTTACGACTGATTTGCATTTATTGCACAATGAATTAACACAGCAGAGTGTCTTTG													
Forward														
ConsensusGAGGTATATGANTTTG ga.gt.....tttg													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
59324:1-444	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	CATGGAGGAGCTGTGTATTAGTGGGACACGACTGCCCTACGGAGCGTGTGCACAGTGTCTACGTAAGCAGCAAGGTGCGAGAGCTACGGCCTGGGCCACTCAGCTACGGGACACAGTAGA													
Forward	CATT													
Consensus	cat.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
59324:1-444	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	AGAGGAACAACAAACACCCTGGCACAGCTGTATATACGATGCCATATGTGCCTGAGCCGTTGAGTAGTCAGAAAAAGAAATATTTGGTGCAACAGGTGATAGACTTCATAATATAGCAGGACAGTGG													
Forward	AACCNTTGTGTCCAGAGAAAA													
Consensusaa.cc.ttg.gt...aagaaaa.....													
	391	400	410	420	430	440	444							
59324:1-444	----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	ACAGGACGGTGTGCCATTGTAGGGACCATGCACGGCCATACGCAACAAATAG													
Forward														
Consensus													

VPH 33

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
049:109-558	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	ATGTTTCAGACACTGAGGAAAACACGACATTGCATGATTTGTCCAGCATTGGAGACACTATACACACATTGAACTACAGTGCCTGGGATGCARAAAACCTTTGCACGATCTGAGGTATATG													
Reverse	GAGGTATATG													
Consensusgaggtatatg													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
049:109-558	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	ATTTTCGATTTCAGATTTAACAGTTGTATATAGAGGGAAATCCATTTGGAATATGTAACCTGTTTGCAGTTCTTATCTAAATATTAGTGAATATAGACATTATAATTCTGTATATGGAATAC													
Reverse	ANTTTCATT													
Consensus	a.tttgcatt.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
049:109-558	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	ATTAGAACAAACAGTTAAAAACCTTAAATGAATATTATTAGGTGATTATATGCAAGACCTTTGTCTCAGAAAAAAACGACATGCGATTAAACAAACGATTTCATAATATTCGGGT													
Reverse	AACCNTTGTGTCCAGAGAAAA													
Consensusa.acc.ttgttcc..aagaaaa.....													
	391	400	410	420	430	440	450							
049:109-558	----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	CGTTGGGACGGGCGCTGTGCGGCTGTTGGAGGTCCCGACGTAGAGAACTGCACCTGTGA													
Reverse														
Consensus													

VPH 31

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
3048:108-557	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	ATGTTCAAAATCCTGCAGAAAGACCTCGGAATTGCATGAACTAAGCTCGGCATTGGAATACCTACGATGAACTAAGATTGAATTGTGCTACTGCARAGGTCAGTTAACAGAACAGAGGTATTAG													
Forward														
ConsensusGAGGTATATG.....gaggtat..g													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
3048:108-557	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	ATTTTGCAATTACAGATTTAACAAATAGTATATAGGGACGACACACACCGAGTGTGTACAAATGTTTAAAGATTTATTCAAAGTAGTGATTTAGGTTAGGTTAGATATAGTGTGTATGGACACAC													
Forward	ANTTTGCAATT													
Consensus	a.tttgcatt.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
3048:108-557	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	ATTAGAAAATTGCARACARAGGTATATGTGATTTGTTAATTAGGTGTATACGTGTCAARAGCCGTTGTGTCAGAGAGAAAACAARAGCATTGGATAAARAGAACGATTCACACATAGGAGGA													
Forward	AARCCNTTGTGTCAGAGAGAAA													
Consensusa.acc.ttgtgtccagaagaaaa.....													
	391	400	410	420	430	440	450							
3048:108-557	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	AGGTGGACAGGACGTTGCATAGCATGTTGGAGAGACCTCGTACTGAACCCAAAGTGTAA													
Forward														
Consensus													

VPH 11

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
026:102-554	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	ATGGAAAGTAAGATGCTCCACGTCGCACATCTATAGACCAGTTGTGCAAGACGTTTAACTTTCTTTGCACACTCTGCAATTCAGTGCCTGTTTGCAGGAAATGCACAGCCCGAGGATAT													
Forward														
ConsensusGAGGTAT.....gag.tat													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
026:102-554	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	ATGCATATGCCATAAGAACCTAAGGTTGTGTGGCGAGACACTTCCCTTTGCAGCGTGTGCCTGTTGCTTAGAACTGCARAGGAAATTAACCAATATAGACACTTAAATTATGCTGCATATGCACC													
Forward	ATGANTTTGCAATT													
Consensus	atg..t.tgc.t.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
026:102-554	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	TACGTAGAGAGAAACCAATGAAATATTTTAAAGTGTAAATTCGTTGTTACCTGTGTCACARAGCCGTTGTGTAATAGAAAACCTAAGCACATATTGGGAAGGCACGCTTCATAAACTAAT													
Forward	AARCCNTTGTGTCAGAGAGAAA													
Consensusaa.cc.ttgtgt..a..agaaaa.....													
	391	400	410	420	430	440	450	453						
026:102-554	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	AACCAGTGGAGGGTCGTTGCTTACACTGCTGGACACATGCATGGAGACTTGTACCTAA													
Forward														
Consensus													

VPH 58

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
386:110-559	-----													
Reverse	ATGTTCCAGGACGCAGAGGAGAACCCACGGACATTGCATGATTTGTGTGTCAGGCGTTGGAGACATCTGTGCATGAATCGAATTGAATGCGTTGATGCAAAAGACTTTGCAGCGATCTGAGGTATATG													
Forward														
ConsensusGAGGTATATG gaggtatatg													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
386:110-559	-----													
Reverse	ACTTTGTATTGCGAGATTTAAGAAATAGTGTATAGAGATGGAAATCCATTTGCAGTATGTAAGTGTGCTTACGATTGCTATCTAAATAGTGAGTATAGCATTATAATTATTTCGCTATATGGAGCAC													
Forward	ANTTTGCATT													
Consensus	a.tttg.att.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
386:110-559	-----													
Reverse	ATTAGACAAACACTAAAAAGTGTAAATGAATATTAAATAGATGATATTATTGTCARAGCCATTGTGTCCACAGAGAAAARAAAGGCATGTGGATTAAACAAAGGTTTCATATATTTCCGGT													
Forward	AAACCNTTGTGTCCAGAGAAA													
Consensusa.acc.ttgtcca.aagaaaa.....													
	391	400	410	420	430	440	450							
386:110-559	-----													
Reverse	CGTTGGACAGGGCGCTGTGCAGTGTGTTGGAGACCCGACGTAGACAAACACAGTGTAA													
Forward														
Consensus													

VPH 39

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
245:107-583	-----													
Reverse	ATGGCGCGATTTCAACATCTGCAGACGGCCATACAAATTCAGACCTGTGCACACGCTGGACACCCTTGACGGACATTACAAATAGCCTGTGTCTATTGCAGACGCCACTACAGCAACCGAGG													
Forward														
ConsensusGAGG gagg													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
245:107-583	-----													
Reverse	TATATGAATTTGCATTAGTGATTTATATAGTATATAGGGACGGGACCCACTAGCTGCATGCCAATCATGTATAAAATTTTATGCTAAATACGGGAGCTACGATTTACTCGACTCGGTGTATGC													
Forward	TATATGANTTTGCATT													
Consensus	t.atatga.tttgcatt.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
245:107-583	-----													
Reverse	AACTACATTAGAAATATAACTAATACAAGTTATATAATTTATTAAATAGGTGCATGTGTTGTCTGAARCCGCTGTGTCCAGCAGAAAATTAGACACCTAATAGCAACCGAGATTTCAAAAATA													
Forward	AAACCNTTGTGTCCAGAGAAA													
Consensusaaacc..tgtgtccag.agaaaa.....													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	477				
245:107-583	-----													
Reverse	GCAGGAGCTATACAGGACAGTGTGACGGTGTGGACCACAAACGGGAGGACCCGACACTAACACGAAGAGAACCCAGTATAA													
Forward														
Consensus													

VPH 56

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
053:102-566	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	ATGGAGCCACAAATCAACAATCCACAGGACGTCACGAGCCTGCACCCTTGAGTGAGGTATTAGAATACCTTTAATTGATCTTAGATTATCATGTGTATATTGCAAAAAGAAGTACACGCTGCTG													
Reverse														
Consensusg													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
053:102-566	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	AGGTATATATTTTGCATGCACCTGAATTAARATAGTGTATAGGGATGATTTTCCTTATGCAGTGTGCAGAGTATGTTTATTGTTTTATAGTAAGTTAGAAATATAGTATTATGACTATTCAGTGTA													
Reverse	AGGTATATGANTTGCATT													
Consensus	aggtatat.a.tttgcat.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
053:102-566	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	TGGAGCTACACTAGAAGTATACTAAAAACAGTTATGTGATTATTAATAGGTGCTACAGATGCAAGTCCGTTACTCCGGAGGAAAGCAATTGCATTGTGACAGAAAAGACGATTTTCATCTA													
Reverse														
ConsensusAAACCNTTGTGTCAGAGAAAAa..cc.tt...tcc.ga.gaaaa.....													
	391	400	410	420	430	440	450	460	465					
053:102-566	----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	ATAGCACATGTTGGACCGGTCATGTTGGGGTCTGGAGACAACATCTAGAGAACCTAGAGAACTACAGTA													
Reverse														
Consensus													

VPH 35

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
050:110-559	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	ATGTTTCAGGACCCAGCTGAACGACCTTACAACCTGCATGATTTGTGCACGAGGTAGAGAAAGCATCCATGAATTTGTTGAATTGTGTACTGCAAAACAGGAATTACAGCGGAGTGAGGTATATG													
Forward														
ConsensusGAGGTATATGgaggtatatg													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
050:110-559	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	ACTTTGCATGCTATGATTTGTGTATAGTATATAGAGAGGCCAGCCATATGGAGTATGCATGAATGTTTAAATTTTATTCAAAATAAGTGAATATAGTGGTATAGATATAGTGTGTATGGAGAAC													
Forward	ANTTGCATT													
Consensus	a.tttgcat.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
050:110-559	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	GTTAGAAAACAAATGCACAAACAGTTATGTCAATTAATAGGTGATTACATGTCAAAACCCGCTGTGTCAGTTGAAAAGCAAGACATTTAGAGAAAAAAACGATTCATACATCGGTGGA													
Forward														
ConsensusAAACCNTTGTGTCAGAGAAAAaaacc.tgtgtccag..gaaaa.....													
	391	400	410	420	430	440	450							
050:110-559	----- ----- ----- -----													
Reverse	CGGTGGACAGGTCGGTGTATGTCCTGTTGAAACCAACACGTAGAGAACCGAGGTGTAA													
Forward														
Consensus													

VPH 52

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
7038:102-548	-----													
Reverse	ATGTTTGAGGATCCAGCAACACGACCCCGACCCCTGCACGAATTGTGTGAGGTGCTGGAGAGATCGGTGCATGAATAGGCTGCAGTGTGTGCAGTGCARAAAGAGCTACAACGAAGAGAGGTATACA													
Forward														
ConsensusGAGGTATATGgaggtata..													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
7038:102-548	-----													
Reverse	AGTTTCTATTACAGATTTACGAATAGTATATAGAGACAATAATCCATATGGCTGTGTATTATGTCCCTACGCTTTTATCTAAGATAAGTGAATATAGGCATTATCAATATTCCTGTATGGGAATC													
Forward	ANTTTGCATT													
Consensus	a.ttt..att.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
7038:102-548	-----													
Reverse	ATTAGAGAGAGGGTAAAAAACCATTAAGTGAATTAATCTATTAGATGATATTTGTCAACCGCCATTATGCTCTGAGGAAAAAGAAAGACATGTTAATGCARACAGGCATTTCATATATTATGGGT													
Forward	AAACCCNTTGTGCCAGAGAAAA													
Consensusa..cc.tt.tgtcc.gaagaaaa.....													
	391	400	410	420	430	440	447							
7038:102-548	-----													
Reverse	CGTTGGACAGGGCGCTGTTCCAGAGTGTGGAGACCCCGACCTGTGACCCAAAGTGTAA													
Forward														
Consensus													

VPH 54

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
782:102-536	-----													
Reverse	ATGTCTGCTACTGAACCCACACGACCGACCCGCTACTTAGTGTATTTGTGCAAGGTATGCAATATTTCTATGATAGTTTGCARCTTCTTGTGCTTTTGCARAGAGACGGTGTACACAGAGG													
Forward														
ConsensusGAGGgag.													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
782:102-536	-----													
Reverse	TTTATGCATTTCAATATAAGGACCTATTTGTGTTGTGGAGACACGGCTTTCACATGCTGCATGTGCCTAGACTGCACGGGCAATTAATTTATAGAGGCATCGGACCGTGCCTGCTGTT													
Forward	TATATGANTTGCATT													
Consensus	t.tatg..ttt..at.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
782:102-536	-----													
Reverse	GGAAACAGTGGAAACAGAGTGTGGAAAGCCATTGGAGAGAAATTTATAGGTGCTGGCTGTGCCATTAACCTTTGTGCARCTGGAAAGCAACGGCACGTAGATTACACAGGCATTCCACTGTGTT													
Forward	AAACCCNTTGTGCCAGAGAAAA													
Consensusaaacc.ttgtg...g..gaaaa.....													
	391	400	410	420	430	435								
782:102-536	-----													
Reverse	AGAGGCTATTGGAGGGTAGGTGTCTACATTGCTGGAGCCATAA													
Forward														
Consensus													

VPH 66

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
290:102-569	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	ATGGATTCCATATTCAGCAATACACAGGACGTCACGAGCCTGCACCATCTGAGCGAGGTATTACAAATACCTTTACTTGATCTTAGATTATCATGTGTATACTGC AAAAAGGAACCTACAAAGTTAG													
Reverse														
Consensusg													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
290:102-569	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	AGCTATATAGGTTTGCATGTATTGAGTTAAACTAGTATATAGAACAAATTGGCCATATGCAGTATGTAGGGTATTGTTATTGTTTATAGTAGGTTAGAAATATAGGTACTATAAATATTCAGTGTA													
Reverse	AGGTATATGANTTGCATT													
Consensus	ag.tat.at...tttgc.at.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
290:102-569	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	TGGGGC A C A T T A G A A G T A T A C T A R A A A C A G T T A T C T G A T T A T C A A T A G G T G C T A C C G A T G C A A T G T C C G T T A A C A C C G G A G A A A A C A A T T G C A C T G T G A A C A T A A A G A C G A T T T C A T T A T													
Reverse	A A A C C N T T G T G T C C G A G A G A A A A													
Consensuscc.tt....cc.ga.gaaaa.....													
	391	400	410	420	430	440	450	460	468					
290:102-569	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	ATAGCATATGATGGACCGGTCATGTTTGCACTGTTGGAGACATACGAGTAGACAGCTACAGAACTACAGTATAA													
Reverse														
Consensus													

VPH 62

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
32599:1-447	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	ATGACTGCAGGGCCAGCAGGCCACGAACTGTTTTTTCGTGTATAGGAGTATGATGTGGACCTGGACGACCTGCACCTACCTGCATATTTGCAAAACAGACCTGTCTCCGCCGGTGAACCTGCTGTCTCT													
Forward	A A A C C N T T G T G T C C G A G A G A A A A													
Consensusa.g.a..tg..tttgc.t.....aac...tgtcc...g..aa.....													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
32599:1-447	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	TTGC A A T A C G G A G C T A C A C G T G G T G C G G C G A A G G A C T G G C A T T T G G A G T A T G C G C A G C A T G C C T A T T G A G A G A T T A A G T A A G A G A G C T A C G G C G G T G C C A G C A C T C A T G C T T T G G A A T A C A G T													
Forward														
Consensus													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
32599:1-447	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	A G A G A G G A A A C A G G C A G T C C G C T T G C A C A A T A T A T A T A G A T G C C A T G C A T G C T A T G C C A T T A A C C T G T C A G G A A A G G A G T A T C A G G T A G A G G G G A G T G C A C T T C C A C A A A T A G C A G G A G T G													
Forward														
Consensus													
	391	400	410	420	430	440	447							
32599:1-447	----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	TGGACAGGACGGTACCCGCAATTTGAGGGAGTATGCACGGCCAGGCAGCACTATAA													
Forward														
Consensus													

VPH 59

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
7236:55-537	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	ATGGCAGCCTTTGAGGATCCTACACACGACCCATACAACTGCCTGATTTGAGCACACATTGAATATTCCTCTGCATGATATTCGCATCAATTGTGTGTTTTGCAAGGGGAACTGCAGAAAGAGAGGG													
Reverse	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensus													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
7236:55-537	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	TATTTGAATTTGCTTTAATGACTTATTTATAGTGTATAGAGACTGTACACCGTATGCAGCGTGTCTGAATGCATTTTCATTTATGCAAGAGTAAGAGATTAGATATTATAGAGATCCGTGTATGG													
Reverse	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensus	tat.tga.tttgc.tt.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
7236:55-537	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	AGAAACATTAGAGGCTGAARCCAGAGACCCGTTACATGAGCTGCTGATACGCTGTTATAGATGCCTAARACCTCTATGTCCACAGATAAATTAAAGCATATACTGAARAAAGAGATTCCATATATA													
Reverse	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
ConsensusAARCCNTTGTGTCCAGAGAAAA aaacc..t.tgtcca..aga.aa.....													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	483			
7236:55-537	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	GCTGGAATATATACAGGACAGTGTCTGGGTGTCTGGACCCGAGCAGACACCTAAGACAGCAACGACAAAGCGCTAGTGAACACTGGGTAA													
Reverse	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensus													

VPH 80

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
565:200-625	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	ATGGATAGGCCAAGCCTTCTTCTGTGCAGGAGCTTGACAGACTCTTTGTATACCTTTAGTAGATATTTATTTGCCGTGTAGGTTTTGTCAAGATTTTAACTTATATAGAGTTAGTAGTTTTGATC													
Reverse	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensus													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
565:200-625	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	GCAATGTTGACGTTGATTTGGACTGAAGAGACTTTGCTTTGCTTTGTAGCAGTTGTCTTTGTACTGCACATTTGAATTTTCTACATTTTATGACAGTCAGTGTGTGGTTGGGAGATTGA													
Reverse	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensusga.g.t.tg.tttgc.t.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
565:200-625	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	GGTAGTTGAGCCAAAGCTGTTGGAGACATTACTATTCTGCAAAATTTGTTTAAAGAAATTAAGATTTAATAGAAAGTTAATATTTGTTACACCCAGCAGCAATTCATAGGTAAGCCCAATTTGG													
Reverse	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
ConsensusAARCCNTTGTGTCCAGAGAAAA aa..tgt.t..agaa..a.....													
	391	400	410	420	426									
565:200-625	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	AAAGGATTGTGTAGCATTGTGGGTCGATAGATGA													
Reverse	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensus													

VPH 26

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
6956:97-549	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	ATGTTTCGAGGATCCTAGAGAACGACCCAGAACGCTACATGAGCTATGTGAAGCTTGAATCTACTTTGCAAAATTTGCAGGTACAGTGTGTATATTGCAGGAACCTTACAAATGGGCTGATGTATATA													
Forward														GAGGTATATG
Consensus														ga.gtatat.
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
6956:97-549	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	ATTTTGCATTTTGTGACCTAAGAGTAGTATATAGAGATAGGAGTCCGTATGCTGCATGCAAAAGATGTGTATATTTTATTCAAAATAACAGAGTATAGACGCTATACATGTTCTGTGTATGGTGCACC													
Forward	ANTTTGCATT													
Consensus	a.tttgca.t													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
6956:97-549	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	ATTGAAAGCCTTAACTAAAAAAGTTTATGTAATTTGTTAATAGGTGTCATAGATGTCARATGCCATTGGGGCCAGAGAGAAAACAAGGATTTGGATGAAAGCCGCGATTTACGAAATAGCAGGG													
Forward	AARCCNTTGTGTCCAGAGAGAAA													
Consensus	a.cc.ttg.g.ccagaagaaaa													
	391	400	410	420	430	440	450	453						
6956:97-549	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	CAGTGGAAAGGGTGTGTACAAATTTGTTGGAGACCAGGGCCCAACAGAAACACAGTGTAA													
Forward														
Consensus														

VPH 70

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
493:107-583	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	ATGGCGGATTTCCCAATCCTGCAGACGGCCATACAAATGCTGACCTGTGCACGGCGCTGGACACTACATTGCACGACATTACAAATAGACTGTGTCTATTGTAARACACAGCTACAGCAACAGAGG													
Forward														GAGG
Consensus														gagg
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
493:107-583	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	TATATGATTTGCATTAGTGATTTATTTATAGTATATAGAACGGGGAGCCATATGCTGCATGCCAAAATGTATTAAATTTTCATGCTAAGTAAGGGAACTACGGCATTATTCGAATCGGTGTATGC													
Forward	TATATGANITTTGCATT													
Consensus	latatga.tttgcatt													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
493:107-583	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	AACAACTTTGGAAAGCATACTAATACCAAGTTATATATTTATCAATAGGTGCATGAGTTGCTGAARCCATTGTGTCCAGCAGAAAAATTAGGCATGTTAATACCAAAAGAGATTTCAACAAATA													
Forward	AARCCNTTGTGTCCAGAGAGAAA													
Consensus	aaacc.ttggtccag.agaaaa													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	477				
493:107-583	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	GCAGGAGCTATACAGGACAGTGCCGACACTGCTGGACCAGCACCCGGGAGGACCAGCAGCATATACGAGAGAACACAGTATARA													
Forward														
Consensus														

VPH 44

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
242:105-557	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	ATGGAAGTGCAATGCCTCCACGCTGCACAAAGTATAGACCAGTTGTGCAAGGAGTGCAACATTCCTATGCACARTCTGCAAAATTTATGCGTGTTCGAGAAAACGTTAAGTACTGCAGAGGTTT													
Forward														GAGGTAT
Consensus														gaggt.t
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
242:105-557	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	ATTCAATTCGATATAAACAGTTATATGATGTACCGAGGAAACTTCCATTTGCAGCCTGTGCCATTTGTTAGAACTACAAGGTAAAGTCATCAATTTAGGCATTTTAACTACGCGGGATATGCAGT													
Forward														ATGANTTGCATT
Consensus														at...tt.gcat.
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
242:105-557	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	AACAGTGGAGAGAAACAATAAGTCAATTCGGACGTGCTGATACGCTGCTATTTGTCACAAACCATTTGTGCACAGTGGAAAAGGTGCGCCACATATTGGACAAGGCGGATTCATTAAATTACAA													
Forward														AAACCNTTGTGTCAGAGAAAA
Consensus														aaacc.ttgt.c.g.gaaaa.
	391	400	410	420	430	440	450	453						
242:105-557	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	GATACCTGGAGGGTCGCTGCTCCATTTGTTGGACATCATGCATGGAACATACTACCTTAA													
Forward														
Consensus													

VPH 67

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
267:102-551	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	ATGTTTCAGGACACAGACGAAAACCCACGACCTGCACGARTTGTGTGARGCTTTGGAARCCACGGTGCAATGAATAGTTTGCCCTGCGTGCAGTGCAAAAAACTTTGGACGAAACGAGGTATATG													
Forward														GAGGTATATG
Consensus														gaggtatAtg
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
267:102-551	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	ACTTTTATTACTGATTTGAAATAGTATACAGATGTGGGARTCCGTATGGGTATGTARGCAATGCCATAGACTGTTATCAAAAGTTAGTGAAATAGATATTTAACTATTCAGTATATGGAATAC													
Forward														ANTTGCATT
Consensus														a.ttt..att.
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
267:102-551	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	TTTAGAAGAAATGTGCATAAACCATTAATGAATTAACATACGATGTATAACATGTCAAGACCATTTGTGTCACAGAAAAGCAAGGGCATGTTGATCGCAAAAGCGATTCATAATATTTCCAT													
Forward														AAACCNTTGTGTCAGAGAAAA
Consensus														a.acc.ttgtgtcca.aagaaaa.
	391	400	410	420	430	440	450							
267:102-551	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	CGTTGGACAGGACGGTTCAGTGTGTTGGAGCCTCAACGACGACGCCAGGTATAA													
Forward														
Consensus													

VPH 51

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
secuencia	ATGTTTCGAGACAGAGGGGAAGACCACGACGCTGCATGAATTATGTGAGCTTTGACGTTTCATGCACAAATACAGGTAGTGTGTGTATTGTAARAAGGAAATTATGTAGAGCAGATGTATATA													
Reverse														
Forward														
ConsensusGAGGTATATG ga.gt.at.at.													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
secuencia	ATGTAGCATTACTGAATTAAAGATTGTATATAGGGATATATCCATATGCAGTATGCAACCAATGTTACTGTTTTATTCAAAATTAGAGAGTATAGCATTATAGCAGGTCTGTGTACTACT													
Reverse														
Forward	ANTTGCATT													
Consensus	a..t.gcatt.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
secuencia	ATTAGAGCAATTACTAAAAAGCTTATATGATTTATCGATAGGTGTCATAGATGTCARAGACCCTTGGCCCTGARGAARAGCAAAAATTGGTGGACGAAAAAAGGTTCCATGAATAGCGGGA													
Reverse														
Forward														
Consensusa.acc..t..g.cc.gaagaaaa.....													
	391	400	410	420	430	440	450	456						
secuencia	CGTTGGACGGGCATGCGCTAATTGCTGGCAACGTACACGACACGTACGAAACCAAGTGTAA													
Reverse														
Forward														
Consensus													

VPH 61

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
282:102-542	ATGGGACCGTGCAATCCAACCTATATTTCCCTGCTCGCAGGACTACGAGGTGGACTTTGAGGATTAAGGCTGACATGTGTATTTTGCAAAATGAATTACACACAGAGGAATTGTGCGCTTTCAC													
Reverse														
Forward														
ConsensusGAGGTATATGANTTGCATT agg..ta.ga..t.g..tt.....													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
282:102-542	TAAAGAGCTAAGCATTGTGTGGAGACATAACTGGCCATTTGGAGTATGCGACCCATGCTGGCACGTGAAGTAAAGTGAGGGAGCTGCACATTGGGACCATTCCTGTTACGGACCCACTGTGGAAAC													
Reverse														
Forward														
Consensus													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
282:102-542	GACACACAGGACGGTCATTAGCTGAACCTATATACGGTGCCATGCAATGCAAGCACACACCTTAAGTATACAGGAAAGGAGCATCAGGTACAGGCATACATCCACTTCCACTATATAGCTGGACAGTGGAGC													
Reverse														
Forward														
Consensusaaacc.tt..gt..a.a.gaaaa.....													
	391	400	410	420	430	441								
282:102-542	GGAGGTGTTGCCAGTGTAGAGGGCCATGCACGGCCAGGTGGCAACCATAA													
Reverse														
Forward														
Consensus													

VPH 6

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
612:103-555	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	ATGGAAAGTGCAATGCCTCCACGCTGCAACGACCATAGACAGTTGTGCAAGACGTTTARTCTATCTATGCATACGTTGCAATTAATTGTGTGTTTGCAGAGATGCACTGACCACTGCAGAGATTT													
Forward														GAGGTAT
Consensusgag.t.t
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
612:103-555	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	ATTTCATATGCATATAAACAGCTAAGAGTCTGTTTCGAGGCGGCTATCCATATGCAGCCTGCGCGTCTGCCTAGATTTCATGGAAAATTAACCAATATAGACACTTTGATTATGCTGGATATGCAC													
Forward	ATGANTTTGCATT													
Consensus	at...t.tgcat.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
612:103-555	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	AACTGTTGAGAGAACTAAACAGACATTTAGAGCTGCTAATTCGGTGTACCTGTGTGCACAAACCCTGTGTGAGTAGAAAAGGTAACATATACACCAAGGCACGGTTCATAAAGCTAAT													
Forward														AAACCNTTGTGTCAGAGAAAA
Consensusaaacc..Tgtgt..ag.agaaaa.....
	391	400	410	420	430	440	450	453						
612:103-555	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	TGTACGTGGAGGGTCTGCTGCCTACACTGCTGGACACATGCATGGAGACATGTTACCCATA													
Forward														
Consensus													

VPH 53

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
046:102-566	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	ATGGATCGTCAGTTATTGAAATACAGAGAGCGACCACTGACATTGCACCAGCTATGTGAGTTGTGAATTAACCATTTGCTGGAGCTGCAACTGGCTGTGTCTGCAGAGGCATTGACAGCGT													
Reverse														
Consensus													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
046:102-566	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	CAGAGGTATATATTTTGCATATACAGATCTAAGAGTAGTGTATAGAGCGGGTATCCGATGGAGTGTGCAARTTCTGTTTCTATTTTATAGTAGGTCGAAATTAAGATATTACATTTGTCAGT													
Reverse	GAGGTATATGANTTTGCATT													
Consensus	..gaggtatat.a.tttgcat.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
046:102-566	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	GTACGGGCTAGCCTGGAGCACTAACAATAAAGTTATCTGATTTATCAATAGGTGCTACAGATGTCACATCCGTTGACACCCAGAGGAAACAGTTACACTGTGACTATAGAACGGTTTCAC													
Reverse														AAACCNTTGTGTCAGAGAAAA
Consensusa.cc.ttg..ccaga.gaaaa.....
	391	400	410	420	430	440	450	460	465					
046:102-566	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Forward	AAAATTTACATATGTGGACCGGGTCTGCTGACATGCTGGAGACACACACAGCACTGATCAGCAGTATA													
Reverse														
Consensus													

VPH 16

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
33031:83-559	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	ATGCACCAAAAGGAACTGCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCACAGTTATGCACAGAGCTGCARACACTATACATGATATATATTAGARTGTGTACTGCRAAGCAACAGT													
Forward													
Consensus													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
33031:83-559	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	TACTGCCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTCGGGATTTATGCATAGTATATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTTATTCTAARATTAGTGAGTATAGACATTATTG													
Forward	GAGGTATATGANTTTGCATT													
Consensusgaggtatatga.tttgc.tt.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
33031:83-559	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	TTATAGTTTGTATGGARACACATTAGAACAGCAATACARCAACCCGTTGTGTGATTGTTAATTAGGTGATTAACTGTCAAAGCCACTGTGTCTGAGGAAAAGCAAGACATCTGGACAAAAGCAA													
Forward	AAACCNTTGTGTCCAGAGAAAA													
Consensusaa.cc..tgtgtcc.gaagaaaa.....													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	477				
33031:83-559	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	AGATTCATAATATAGGGGTCGGTGGACCGGTCGATGTATGTCTTGTTCAGATCATCAGARACCGTAGAGAAACCCAGCTGTAA													
Forward													
Consensus													

VPH 18

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
975:105-581	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	ATGGCCGCTTTGAGGATCCARACGGCGACCTACAGTACCTGATCTGTGCACGGAACTGAACACTTCACTGCAGACATAGAAATACCTGTGTATATTGCAGACAGTATTGGAACCTACAGAGG													
ForwardGAGG													
Consensusgagg													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
975:105-581	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	TATTGAAATTTGCATTTAAGATTATTTGTGGGTATAGAGACAGTATACCCATGCTGCATGCCAATATGATAGATTTTATTCTAGATTAGAGATTAGACATTATTCAGACTCTGTGTATGG													
Forward	TATATGANTTTGCATT													
Consensustat.tga.tttgcatt.....													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
975:105-581	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	AGACACATTGGAAAARACTAARACTARCACTGGGTATACAAATTTATTATAGGTGCCGCGTGCAGAAACCTTGAATCCAGCAGAAAARACTTAGACACCTTAATGAAAACGACGATTTCCACACATA													
Forward	AAACCNTTGTGTCCAGAGAAAA													
Consensusaaacc.ttg..tccag.agaaaa.....													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	477				
975:105-581	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Reverse	GCTGGGCACTATAGGGCCAGTGCATTCTGTGCTGCARCCGAGCAGCAGGAAACGACTCCACACGCGAGAGAACACAAAGTATAA													
Forward													
Consensus													

Consentimiento informado.

Mediante la presente yo, _____, CI. _____, domiciliada en _____, de ___ años de edad, de oficio _____, luego de ser informada por el médico a cargo de la existencia de un Plan piloto de Despistaje de Cáncer Cervical y VPH, doy mi consentimiento para que se me realice una toma de muestra para Prueba Molecular por PCR con el fin de determinar si hay infección por VPH y, se me informe del resultado.

 Firma del Participante

 Firma del Representante Legal
 Si es menor de edad

 Firma del Médico
Código de la Unión Internacional de Bioquímica (IUB).

Utilizado para la elaboración de oligonucleótidos degenerados:

R: A o G.

Y: T o C.

W: A o T

S: G o C.

M: A o C.

K: G o T

H: A, T o C.

B: G, C o T.

V: G, A o C

D: G, A o T.

N: G, A, T o C.

Tampón TE 1X (Tris-EDTA).

-Tris-HCl pH 8,0 10 mM

-Na₂EDTA 1 mM**Tampón de PCR (Invitrogen).**

-Tris-HCl pH 8,4 200 mM

-KCl 500 mM

Tampón TBE 10X (Tris-Borato-EDTA).

-Tris-HCl pH 8,0	108 g
-Ácido Bórico	55 g
-EDTA	7,6 g

Tampón de carga para geles de poliacrilamida.

-Azul de bromofenol	0,1%
-EDTA	1 mM
-Sacarosa	40%

Tampón de carga SSCP 2X.

-Formamida	95%
-EDTA	20 mM
-Azul de bromofenol	0,05%

Platinum® Taq ADN polimerasa (Invitrogen).

Enzima recombinante que posee la propiedad de bloquear su actividad polimerasa a temperatura ambiente. Concentración 5U/μL.