

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 987**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/70

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07016602 .0**

96 Fecha de presentación: **24.08.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1895018**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.03.2008**

54 Título: **Procedimiento y medio para la detección de virus de papiloma humanos**

30 Prioridad:
28.08.2006 DE 102006041970

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.07.2012

73 Titular/es:
**GENOME IDENTIFICATION DIAGNOSTICS GMBH
EBINGER STRASSE 4
72479 STRASSBERG, DE**

72 Inventor/es:
Weilbach, Alfons

74 Agente/Representante:
Tomas Gil, Tesifonte Enrique

ES 2 384 987 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y medio para la detección de virus de papiloma humanos

5

[0001] La presente invención se refiere a un sistema PCR para la detección de infecciones con virus del papiloma humanos (HPV) y un procedimiento correspondiente. Además la presente invención se refiere a un kit para la detección de infecciones con HPV.

10

[0002] Virus del papiloma humanos (HPV) muestran en su estructura de genoma una estructura unitaria. Ya son conocidos más de 150 virus de papiloma humanos diferentes. Una denominación del HPV se realiza numéricamente continua, subdividida según su secuencia de ácido desoxirribonucleico (ADN). Los virus del papiloma humanos se pueden estructurar en tres grupos: HPV mucocutáneos (formación de verrugas), asociados a epidermodisplasia (neoplasias cutáneas) y anogenitales (condilomas, carcinomas anales y de cérvix).

15

[0003] Los virus del papiloma están difundidos por todo el mundo. Infecciones con estos virus son de tipo y en gran parte órgano-específicos. HPV presentan un genoma anular; que codifica todos los genes virales. Una subdivisión de los genes se realiza por sus fases de expresión en genes tempranos, los llamados "early genes", E1 a E8, y genes tardíos, los llamados "late genes", L1 y L2. Proteínas de los genes tempranos poseen entre otras funciones reguladoras e influyen el crecimiento celular de células humanas infectadas. E6- y E7-productos de gen tienen características transformadoras y son responsables de la potencia oncogénica de tipos de virus, particularmente los tipos de virus HPV 16 y HPV 18.

20

25

[0004] En la infección con el virus papiloma humano se trata de una infección de contacto. Hay una multitud de apariciones clínicas, que dependen mucho del tipo de virus, del tejido afectado y de la situación de resistencia del organismo infestado. Infecciones activas, clínicamente relevantes presentan una probabilidad aumentada de una integración de ADN viral en el genoma humano. Así aumenta la probabilidad de una degeneración tumoral de células. Otros cofactores como inmunosupresión, infección de VIH, fumar, infecciones de herpes y de clamidia y factores genéticos parecen jugar un papel en la opresión o eliminación de la infección HPV.

30

[0005] Se asocian más de 20 tipos de HPV con carcinomas de cérvix invasivos. El tipos de HPV 6, 11, 30, 42, 43 y 44 y otros se clasifican debido a su escaso riesgo oncogénico como tipos de HPV llamados de bajo riesgo ("low risk"). Por el contrario tipos de HPV de alto riesgo, particularmente los tipos de HPV 16, 18, 45 y 56, presentan un riesgo oncogénico alto ("high risk"). Los virus se pueden probar tanto en displasias ligeras, como también en displasias moderadas a pesadas (neoplasias cervicales intraepiteliales, clasificadas en las clases CIN 1 hasta 3) así como en carcinomas invasivos, particularmente en carcinomas de cérvix. Se considera como

35

40

[0006] asegurado, que los HPV representan factores de riesgo necesarios para el origen de enfermedades de cáncer, particularmente de cáncer de cérvix. Particularmente los tipos de VPH 16 y 18 se asocian a carcinomas de cérvix invasivos.

45

[0007] Terapias antivirales específicas, particularmente por vacunaciones, pueden estar disponibles en un futuro próximo, sin embargo pasará un período de tiempo más largo, hasta que terapias de este tipo hayan sido impuestas. Áreas de mucosa o de piel infectadas son tratadas también además según el tamaño por láser, crioterapia o escisión. Con formas malignas de enfermedades en la zona genital generalmente es necesario una eliminación operativa (resección). Un programa de diagnóstico precoz efectivo por lo tanto sigue siendo irrenunciable.

50

55

[0008] Estadios tempranos de carcinomas de cérvix son actualmente principalmente captados por toma de una citología celular (citología cervical, también denominada como citología de Papanicolaou, abreviado citología de Pap), en cooperación con una colposcopia. Aunque la introducción de programas de prevención citológicos ha conducido a un decremento de la incidencia de carcinomas de cérvix, no se ha podido lograr hasta ahora ninguna otra disminución significativa. Procedimientos citológicos están afectados con un error subjetivo relativamente grande, no estandarizados y no pueden proveer ningunos resultados satisfactorios sobre el desarrollo posterior de lesiones individuales. Cultivo y proliferación cultural de HPV son técnicamente muy costosos y se excluyen por lo tanto como prueba. Procedimientos inmunohistoquímicos no son lo suficientemente sensibles, exámenes serológicos con demostración de anticuerpos específicos de HPV no tienen ningún significado para el diagnóstico, ya que con pacientes con carcinoma de cérvix sólo son demostrables anticuerpos en la mitad de todos los casos.

60

65

[0009] Para particularmente con una comprobación citológica llamativa poder adoptar una declaración sobre un desarrollo posible de tumores malignos, se utilizan procedimientos de detección para ácidos nucleicos virales en muestras de tejido clínicas. Particularmente procedimientos para la distinción de tipos individuales de infecciones de HPV de bajo y alto riesgo. Un procedimiento de hibridación de refuerzo de señal de la compañía Digene se conoce como microplaca de captura de híbrido (método HCM). El método HCM usa secuencias de ARN específicas de HPV como sondas de hibridación. La detección de híbridos ARN/ADN se realiza en microplacas mediante anticuerpos conjugados enzimáticamente en un procedimiento fotométrico. Algunos tipos de alto riesgo sin embargo no pueden ser registrados y pueden aparecer reacciones cruzadas entre ambas clases de HPV. Con ello hay que considerar

especialmente lo importantes que son resultados falso negativos o falso positivos para la psiquis de pacientes. Resultados de este tipo se deben evitar por lo tanto en lo posible.

5 [0010] Muchos procedimientos conocidos en el estado de la técnica para la comprobación de ácidos nucleicos virales en muestras de tejido clínicas se basan sobre una amplificación de HPV- ADN. En el procedimiento de reacción de cadena de polimerasa (polymerase chain reaction, PCR) se realiza con ayuda de iniciadores específicos la amplificación del ADN de manera tipo específico.

10 [0011] La solicitud de patente europea EP 05009276 de la solicitante y la solicitud PCT WO 2005/056839 divulgan kits y procedimientos con medios para la comprobación de diferentes tipos de HPV. Son describen a este respecto iniciadores y sondas de oligonucleótidos, como método para la amplificación se realiza preferiblemente el PCR.

15 [0012] Una desventaja notable de procedimientos comerciales conocidos para la comprobación y para la tipificación de genotipos HPV consiste sobre todo en que son utilizadas áreas ADN del HPV poco conservadas como modelo para iniciadores y sondas de oligonucleótido. Esto vale particularmente para sondas e iniciadores de áreas L1. Procedimientos de detección basados en ello presentan de manera condicionada por una variedad de bases alta en estas áreas sólo una especificidad pequeña de sus sondas e iniciadores. De esta manera pueden ser condicionados resultados de prueba de falsos negativos.

20 [0013] Por consiguiente existe una necesidad médica constante de procedimientos rápidos y sencillos para la comprobación segura de tipos de HPV diferentes.

25 [0014] Es por lo tanto tarea de la presente invención, proveer un procedimiento de detección poco complicado para ácidos nucleicos virales, particularmente de áreas ADN del HPV, así como medios para ello, y también un kit para la ejecución del procedimiento, de modo que esté garantizada una seguridad óptima para resultados de detección.

[0015] La presente invención resuelve el problema técnico de base a través de la puesta a disposición de un sistema PCR, procedimiento y lote como se define en las reivindicaciones 1-10.

30 [0016] En el marco de esta invención los conceptos sondas de oligonucleótido, oligonucleótido y sondas de gen deben ser entendidos equivalentemente.

35 [0017] Para la detección in-vitro de una infección viral con tipos de HPV individuales, particularmente también varios, es oportuno efectuar una amplificación de ADN del HPV. En una forma de ejecución preferida de la invención para la amplificación de ADN se realiza una reacción en cadena de polimerasa (polymerase chain reaction, PCR). En el PCR se trata de un método para multiplicar de manera dirigida ácidos nucleicos o secciones determinadas de ácidos nucleicos in vitro, sin emplear un organismo vivo. El PCR se estructura en ciclos de pasos sucesivos de desnaturalización, de hibridación y de alargamiento. En el paso de desnaturalización se divide ADN de doble hélice térmicamente bajo disociación de ligamentos de puentes de hidrógeno en hélices simples, que sirven además como matrices. En el paso de hibridación los iniciadores se sedimentan bajo descenso de temperatura en las matrices (proceso de templado). A raíz de ello se realiza en el paso de alargamiento mediante polimerasas de ADN y unidades de nucleótido libres una síntesis nueva de segmentos de ADN. A través de la elección de iniciadores correspondientes, preferiblemente de pares de iniciador, se prefijan los segmentos de ADN a sintetizar. Después de repetición múltiple, por ejemplo 20 - 40 ciclos, es alcanzada una concentración de ADN, que se adecúa para la comprobación. Después de separación electroforética de un amplicón obtenido de esta manera puede realizarse para la detección de HPV por ejemplo una llamada hibridación por Southern-blot mediante sondas de oligonucleótido marcadas de tipo de virus específicas, que provienen de un segmento ADN del HPV respectivamente a examinar. Alternativamente se puede realizar por ejemplo una secuenciación de un amplicón para la tipificación de HPV. En el caso de un certificado de ARN o segmentos de ARN es necesario, copiar primero el ARN. Esto puede realizarse mediante una polimerasa de ADN dependiente de ARN, una llamada transcriptasa inversa. El otro transcurso se configura entonces como descrito arriba.

40 [0018] Bajo el concepto "PCR" debe entenderse dentro del marco de la invención aquí presente también otras variantes PCR adecuadas para una amplificación de ácido nucleico o variantes similares de PCR, particularmente una PCR anidada (nested), una reacción de cadenas de ligasa (ligase chain reaction, LCR) o en el caso de ARN como material inicial, una reacción de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (NASBA), un PCR de transcriptasa inversa (RT) o una PCR inversa.

45 [0019] En las secuencias de nucleótido de la presente invención vale que M es igual a A o C, R es igual a A o G, W es igual a A o T, S es igual a C o G, Y es igual a C o T, K es igual a G o T, V es igual a A o C o G, H es igual a A o C o T, D es igual a A o G o T, B es igual a C o G o T, N es igual a G o A o T o C. Además I es equivalente a inosina.

50 [0020] En la presente divulgación está previsto, que los amplicones hibriden con las sondas de oligonucleótido con al menos una de las secuencias de nucleótido SEC ID n°. 1 hasta 48 del protocolo de secuencias adjunto y sus secuencias complementarias. Las sondas de oligonucleótido se ponen específicamente a disposición para los tipos de HPV respectivos. Particularmente también se divulga que los amplicones hibridizan con las sondas de oligonucleótido, que se ligan específicamente a ácidos nucleicos, a los que se ligan los ácidos nucleicos con las secuencias de

nucleótido SEC ID n°. 1 hasta 48 de acta de secuencia adjunta, y que secuencias complementarias de los oligonucleótidos son utilizadas. Dentro del marco de la invención aquí presente también deben comprenderse oligonucleótidos cambiados y/o modificados, particularmente degenerados. Particularmente por reducción, prolongación, sustitución, inserción y/o delección pueden ser cambiados y/o modificados los oligonucleótidos según la invención, permaneciendo su función preferiblemente inalterada. Preferiblemente pueden mostrar las secuencias de nucleótidos dentro del marco de descripción con SEC de ID n°. 1 hasta 48 indicadas del protocolo de secuencias adjunto y sus secuencias complementarias una adición y/o delección de 1 hasta 10 nucleótidos y/o una sustitución de 1 hasta 3 nucleótidos. También es posible, que las secuencias sean parte de un polinucleótido. Bajo "polinucleótido" dentro del marco de invención presente debe entenderse un oligonucleótido con 100 o más unidades de nucleótido. Según la invención las sondas de oligonucleótido comprenden preferiblemente 24 hasta 27 unidades de nucleótido.

[0021] En el caso de los ácidos nucleicos empleados en la presente revelación se trata de oligonucleótidos sintéticos, que son designados iniciadores. Se utilizan los así llamados iniciadores hacia adelante y/o iniciadores hacia atrás (también denominados iniciadores hacia atrás). Está divulgado, que la PCR con iniciadores se realiza con al menos una de las secuencias de nucleótidos de SEC de ID n°. 49 hasta 64 del protocolo de secuencias adjunto. Está también divulgado, efectuar la PCR con iniciador, cuyas secuencias son complementarias a las SEC de ID n°. 49 hasta 64. Los iniciadores son específicamente puestos a disposición para tipos de HPV respectivos. Está también divulgado, que la PCR es hecha con iniciadores, que ligan específicamente a ácidos nucleicos, a los que los ácidos nucleicos ligan con las secuencias de nucleótidos SEC ID n°. 49 hasta 64 del protocolo de secuencia adjunto. Está también divulgado, efectuar las PCR con las secuencias complementarias a las SEC ID n°. 49 hasta 64. Además los iniciadores pueden estar modificados, particularmente degenerados.

[0022] Particularmente por reducción, prolongación, sustitución, inserción y/o delección pueden ser cambiados/modificados los iniciadores según la invención, permaneciendo su función preferiblemente inalterada. Preferiblemente las secuencias de nucleótidos indicadas dentro del marco de descripción SEC ID N°. 49 hasta 64 del protocolo de secuencia adjunto así como sus secuencias complementarias muestran una adición y/o delección de 1 hasta 10 nucleótidos y/o una sustitución de 1 hasta 18 nucleótidos. Los iniciadores, comprenden preferiblemente 24 hasta 35 unidades de nucleótido.

[0023] Con infecciones de HPV surge frecuentemente una integración del virus en las células humanas de ADN. Por lo tanto se presentan en muchos casos delecciones en el ADN del HPV, de modo que áreas de este tipo ya no están a disposición para una detección. Debe ser considerado además, que sólo dichas áreas de ADN del HPV pueden tomarse en consideración para la amplificación con los iniciadores, que se conservan en su mayoría, de modo que los iniciadores ligan óptimamente al ADN del HPV, preferiblemente con un número máximo de enlaces por puente de hidrógeno. Variaciones frecuentes, particularmente en campos de gen respectivos, particularmente tipos de HPV de alto riesgo requerirían una multitud de iniciadores y/o sondas de oligonucleótido, para capturar todos los tipos de HPV deseados. Sorprendentemente se mostraba, que las secuencias de nucleótido citadas y/o secuencias complementarias para ellas son especialmente ventajosas para secuencias de objetivo en una sección de gen determinada del E1-Gen de HPV para la detección e incluso para la tipificación de HPV, particularmente para la detección y para la tipificación de todos los tipos de HPV de alto riesgo conocidos, puesto que el E1-Gen está afectado con menos frecuencia de delecciones que por ejemplo el E6-Gen.

[0024] En otra forma de realización mezclas son puestas a disposición de iniciadores, preferiblemente mezclas equimolares de iniciadores, particularmente mezclas de iniciadores con al menos las secuencias de nucleótido de SEC ID n°. 49 hasta 64 del protocolo de secuencias adjunto y también ácidos nucleicos, que ligan específicamente a ácidos nucleicos, a los que ácidos nucleicos ligan con las secuencias de nucleótido de SEC ID n°. 49 hasta 64 del protocolo de secuencias adjunto.

[0025] Esta medida tiene la ventaja de que en una única PCR pueden amplificarse y probarse todos los tipos de HPV demostrables y buscados. Según la invención las mezclas comprenden iniciadores hacia adelante y/o hacia atrás.

[0026] En otra forma de realización las mezclas comprenden iniciadores con al menos las secuencias de nucleótido previamente citadas, donde al menos un nucleótido se sustituye por inosina.

[0027] Esta medida tiene la ventaja de que variaciones en el área ADN del HPV se equilibran por la aplicación de iniciadores, que muestran inosina como una especie de unidad de nucleótido universal. Inosina es ventajosa, puesto que acepta cada base en su posición complementaria como pareja. Especialmente ventajoso es la aplicación de inosina en iniciadores, cuando secuencias de objetivo en el ADN del HPV presentan a posiciones determinadas un grado alto de degeneración, particularmente entonces, cuando todos los 4 tipos de bases pueden existir en las posiciones respectivas. Ventajosamente se reduce por ello el número de iniciadores necesario para la detección.

[0028] En otra forma de ejecución preferida de la presente invención los iniciadores están marcados, particularmente con un no-compuesto de proteína, preferiblemente con biotina.

[0029] Estas medidas tienen la ventaja de que con el amplicón sintetizado con iniciadores marcados se puede demostrar al menos un tipo de detección. Una marcación del amplicón puede ocurrir bajo aplicación de iniciadores

5 marcados y/o unidades de nucleótido marcadas. Como marcadores vienen en consideración por ejemplo sustancias radioactivas, particularmente fósforo radioactivo y/o yoduro radioactivo, colorantes de fluorescente, particularmente fluoresceína, haptenos, antígenos, compuestos sin albúmina, particularmente grupos prostéticos o glucósidos, preferiblemente biotina o digoxigenina. Como ejemplos para métodos de detección son citados entre otras reacciones de amplificación espectroscópicas, fotométricas y/o enzimáticas adecuadas. Según la invención está particularmente previsto que los iniciadores sean marcados con biotina.

10 [0030] La presente invención resuelve el problema técnico de base también en el procedimiento inicialmente mencionado para el diagnóstico de infecciones, particularmente de infecciones con virus del papiloma humano (HPV), donde la detección de ADN se efectúa sobre áreas específicas de ADN del HPV bajo aplicación de al menos una sonda de oligonucleótido con una de las secuencias de nucleótido según la presente invención e iniciadores con al menos una de las secuencias de nucleótido según la presente invención.

15 [0031] El procedimiento según la presente invención está previsto para el diagnóstico de infecciones. Particularmente sirve para la caracterización de infecciones de HPV. De esta manera pueden ser tipificados HPV. Con ventaja pueden ser diferenciados HPV de alto riesgo y HPV de bajo riesgo. El procedimiento según la invención comprende un control de calidad de citología de Pap, que proveen por ejemplo material inicial para la realización del procedimiento. Para poder proveer resultados significativos y con ello evitar los diagnósticos falso negativos, es oportuno, tomar suficiente material con el frotis. Si por un frotis insuficiente no se consigue ningún o demasiado poco material celular humano, particularmente células o fragmentos celulares, para otro análisis, no pueden ser probados agentes patógenos correspondientes, y esto conduce a diagnósticos falso negativos. Para excluir este riesgo, es prevista con una forma de ejecución preferida, que un paso de control correspondiente esté contenido en el procedimiento de prueba, de modo que solo es adoptado entonces una declaración sobre la infección HPV o los agentes patógenos correspondientes, cuando haya estado presente material celular suficiente.

25 [0032] Además el procedimiento según de la presente invención comprende convenientemente pasos de prueba para patógenos de HPV del tipo de bajo riesgo y pasos de prueba para patógenos de HPV del tipo de alto riesgo. Con ayuda de las pruebas para los patógenos de HPV de ambos tipos se pueden adoptar por un lado declaraciones sobre si acaso existe una infección HPV. Por otro lado se pueden hacer declaraciones sobre si con el presente tipo del patógeno es de esperar con una probabilidad más alta o más baja, que se desarrolle o que ya existe un carcinoma, particularmente un carcinoma de cérvix.

30 [0033] En el procedimiento divulgado los iniciadores se utilizan en grupos, preferiblemente en grupos para áreas comunes y para áreas adyacentes del ADN, particularmente del ADN del HPV.

35 [0034] Los iniciadores se utilizan en grupos con iniciadores hacia adelante y hacia atrás, donde los iniciadores hacia adelante y hacia atrás comprenden unidades de nucleótido degeneradas.

40 [0035] Sorprendentemente se muestra, que la aplicación de grupos de iniciadores hacia adelante y atrás compensa ventajosamente la degeneración en segmentos de ADN, particularmente en segmentos ADN del HPV, y/o favorece una amplificación exitosa de material de ADN, particularmente de material de ADN del HPV. Además es enfatizable, que con una repartición de los iniciadores, particularmente con una repartición de varias, preferiblemente integradas entre sí, parejas de iniciadores hacia adelante y hacia atrás a través de un área de ADN mayor, particularmente un área ADN del HPV, con varias secuencias de objetivo, aumenta la seguridad de la detección. Por consiguiente la probabilidad de resultados de prueba falsos negativos se reduce a un mínimo.

45 [0036] Está divulgado que se utilice al menos un cebador. Ventajosamente se utiliza una mezcla de un cebador hacia adelante y hacia atrás, preferiblemente una mezcla de un grupo de cebadores hacia adelante y de un grupo de cebadores hacia atrás. Los iniciadores hacia adelante y atrás ligan convenientemente así en el ADN del HPV y se alargan de tal manera ventajosamente durante la amplificación, que los amplicones resultantes muestran un área de ADN del HPV común, particularmente que los amplicones resultantes se completan complementariamente. Convenientemente se utiliza adicionalmente al menos otro cebador, ventajosamente una mezcla de al menos un cebador hacia adelante y hacia atrás, de modo que al área ADN del HPV se amplifica al menos otro área contigua.

50 [0037] Como ya descrito, es preferible, emplear métodos PCR o similar a PCR como procedimientos de amplificación. Los métodos PCR o similares a PCR realizan in vitro y son muy sensibles, de modo que cantidades muy pequeñas de material inicial pueden amplificarse.

55 [0038] En otra forma de ejecución preferida del procedimiento las sondas de oligonucleótido se utilizan en una hibridación inversa.

60 [0039] La hibridación inversa tiene la ventaja de que se puede examinar una prueba simultáneamente con una multitud de sondas con gasto de trabajo y tiempo razonable. Esto permite un examen simultáneo de varias secuencias de objetivo y concede con ello el examen simultáneo de varios tipos de HPV. La hibridación inversa se basa sobre una inmovilización de las sondas de oligonucleótido sobre un soporte e hibridación sucesiva del ADN amplificado y marcado de la prueba a examinar. Híbridos con emparejamientos defectuosos se eliminan convenientemente en un paso de

lavado posterior riguroso. A las sondas de oligonucleótido se ligan por consiguiente ventajosamente secuencias de nucleótido complementarias, que estaban contenidas en la prueba. A través de la marcación se pueden reconocer los híbridos formados de los amplicones y las sondas. Por consiguiente se pueden extraer conclusiones sobre los tipos de HPV contenidos en la prueba. Como materiales de soporte vienen en consideración por ejemplo nylon, nitrocelulosa o Polifluoruro de vinilideno (PVDF). Los soportes, se pueden utilizar en forma de membranas, particularmente como tiras de prueba, placas de microtítulo o portaobjetos (Chips de ADN). Como marcación pueden servir por ejemplo colorantes fluorescentes o haptenos y/o nucleótidos radioactivamente marcados. Una detección sucesiva puede ocurrir con encimas ligadas a anticuerpos, llamados conjugados, en cooperación con un sustrato cromogénico o luminogénico. Una sucesiva reacción generadora de luz, particularmente una reacción de color, quimioluminiscencia o fluorescencia, indica un enlace de amplicones marcados y por consiguiente la presencia de agentes patógenos de infección determinados en el material examinado, particularmente la presencia de tipos de HPV determinados.

[0040] En otra forma de ejecución preferida el ADN del HPV proviene de materiales de muestras de biopsias o frotis, particularmente frotis de Pap. Preferiblemente el ADN del HPV se aísla de los materiales de muestra y se añade PCR. Sin embargo también son posibles amplificaciones de ADN de materiales de prueba no preparados. También con tales materiales iniciales es realizable dentro del marco de PCR la amplificación del ADN del HPV.

[0041] En otra forma de realización el procedimiento según la invención presenta un control de calidad de la detección a través de al menos una etapa de procedimiento para el control de la calidad de los materiales de muestras. El control de calidad de los materiales de muestras es realizado usualmente por la detección de ADN humano, preferiblemente de Gliceraldehído -3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH)-ADN.

[0042] Condición para resultados de prueba significativos generalmente es, que en el material de muestras estén contenidas células humanas o fragmentos celulares. Según la invención es preferiblemente probado por lo tanto, si ADN humano está presente en el material de citología. De esta manera se evitan falsos diagnósticos negativos. Para detecciones de este tipo puede tomarse en consideración el PCR con iniciadores idóneos. Productos de PCR resultantes se pueden probar ventajosamente con ayuda de sondas de gen idóneas. Especialmente ventajoso es el certificado del ADN de enzimas humanas, particularmente de enzimas sintetizadas constitutivamente. Según la invención está particularmente previsto, probar sobre gliceraldehído fosfato-deshidrogenasa (GAPDH)-ADN. Naturalmente pueden ser elegidos también otros segmentos de ADN humanos para la detección. Condición para esto es que el ADN pueda ser específicamente reconocido, particularmente amplificado. Otras posibilidades para el control del material de muestras son por ejemplo la detección de determinadas proteínas humanas o la detección de determinadas actividades enzimáticas.

[0043] En otra forma de realización del procedimiento están contenidos medios, que se adecúan para la detección de virus del herpes simple (HSV). Aquí el patógeno de HSV II es de particular interés. Se conoce por ejemplo, que el certificado de HSV II y tipos HPV de alto riesgo, representan un aviso sobre un riesgo aumentado de desarrollar un carcinoma, particularmente carcinoma de cérvix. Según la invención por lo tanto está previsto preferiblemente, junto al control de calidad de los materiales de muestras y la tipificación de los patógenos de HPV, probar adicionalmente si están presentes patógenos de HSV II. Por ello el grupo de riesgo de las pacientes, que van a desarrollar con probabilidad mayor carcinomas, particularmente carcinomas de cérvix, puede ser delimitado considerablemente. A través de la detección combinada de HSV II y tipos de HPV de alto riesgo se pueden hacer por lo tanto pronósticos esencialmente más fiables.

[0044] Además puede ser ventajoso, que igualmente sea probado, si existen patógenos de HSV I. El virus de herpes simple es un virus muy difundido, en el cual aquí son relevantes particularmente dos tipos. Únicamente en el segundo tipo, HSV II, existe en combinación con tipos de HPV de alto riesgo un riesgo aumentado de desarrollar cáncer, particularmente cáncer de cérvix. HSV I en relación con cáncer de cérvix o su desarrollo, es considerado como no problemático. La detección de HSV I se realiza por lo tanto preferiblemente como control negativo. Particularmente se trata de un criterio de exclusión importante, cuando se sabe que existe una infección de herpes y únicamente puede ser probado HSV I. Si no se puede probar HSV II, se puede excluir con seguridad a causa del control negativo, que existe este tipo de HSV especialmente problemático. Por consecuencia el riesgo en caso de una infección con tipos de HPV de alto riesgo para el desarrollo de carcinomas, particularmente de carcinomas de cérvix, es clasificable como más bajo.

[0045] En una forma de realización del procedimiento son previstos adicionalmente medios de detección para agentes patógenos de *clamidia trachomatis*. El índice de infección con clamidia en mujeres jóvenes es muy alto. Una infección por clamidia sin embargo se cura nuevamente a menudo sin otros síntomas. Sin embargo clamidias pueden causar esterilidad tanto en mujeres como también en hombres. Son denominados junto a HPV y herpes como enfermedades de transmisión sexual (ETS) (sexual transmitted diseases - STD). Estas tres enfermedades representan en los países industriales juntas sobre el 90 % de todas las ETS. Por lo tanto es de particular interés, efectuar una detección de clamidias en combinación con herpes y HPV. Con la detección de los diferentes agentes patógenos puede ser puesta a disposición una prueba apropiada para un screening de ETS. El screening puede efectuarse con los materiales de muestras, por ejemplo de frotis, particularmente citologías cervicales, y con un control o dos controles sin gran gasto.

[0046] Como otros módulos para detecciones adicionales vienen en consideración sobre todo la detección de *Treponema pallidum* como agente patógeno de la sífilis y de *Neisseria gonorrhoe* como agente patógeno de *Gonorrhoe*

(Tripper). Estas diferentes detecciones adicionales pueden ocurrir en la manera arriba descrita con iniciadores y sondas de gen idóneos. Sin embargo también se comprenden por la invención otros métodos de detección, por ejemplo sobre anticuerpos o equivalentes.

5 [0047] En otra forma de realización del procedimiento según la invención son previstos medios de detección, que muestran otro factor de riesgo para el desarrollo de un cáncer de cérvix. Con este examen de infecciones de HPV se prueba sobre p16^{INK4a}. El ADN para p16^{INK4a} existe en el cariotipo de las células humanas también bajo condiciones normales. Codificada una proteína supresora de tumores, que inhibe quinasas dependientes de ciclina (CDK), particularmente las quinasas dependientes de ciclina (CDK)-4 y (CDK)-6. CDK-4 son y CDK-6 en la posición son capaces de inactivar proteínas que actúan reguladamente, por ejemplo para la proteína del Retinoblastoma ((pRB)) que actúa reguladamente, a través de fosforilación. pRB no fosforilada inhibe la expresión de p16^{INK4a}. Por consiguiente pRB y p16^{INK4a} están entre si en una relación correlativa. p16^{INK4a} protege pRB contra la fosforilación y con esto contra la inactivación a través de la CDK y pRB inhibe la expresión de p16^{INK4a}. Una integración del HPV en el genoma de la célula humana se asocia comúnmente con una destrucción del gen supresor E2 viral. El gen supresor E2 controla la expresión de los genes virales E6 y E7. La formación de productos de gen E6- y E7 se induce por consiguiente. Los productos de gen E6- y E7 son oncogenes y representan factores esenciales para una carcinogénesis, puesto que ligan proteínas reguladoras como la proteína supresora de tumores p53 y/o el pRB de células huésped y por ello inactivan. La inactivación de pRB a través de E7 viral conduce por lo tanto a una sobreexpresión de p16^{INK4a}. Puesto que las CDK-4 y CDK-6 siguen regulando el "punto de control" G1 en el ciclo celular, la expresión aumentada de p16^{INK4a} conduce a una desregulación de la CDK y por consiguiente a una desregulación del ciclo celular. La existencia del p16^{INK4a}-mRNA o de la proteína traducida justifica la integración del virus en el genoma de células humanas y la desregulación del ciclo celular. Un tal estadio es de contemplar como fase preliminar inmediata de carcinomas. En un tal caso existe por lo tanto un riesgo agudo absoluto para el desarrollo de carcinomas de cérvix o ya se puede haber desarrollado uno.

25 [0048] El certificado de p16^{INK4a} puede efectuarse a través de una detección de proteína correspondiente. Esto puede suceder por ejemplo mediante anticuerpos apropiados. Sin embargo es preferible, cuando el mRNA es probado para p16^{INK4a}. Es una medida directa para la formada proteína p16^{INK4a}. Preferiblemente la detección del mRNA se realiza sobre iniciadores de PCR adecuados. Aquí es ventajosamente aprovechado, que el mRNA sea procesado con su formación. Por ejemplos a través del llamado empalme se corten presentes intrones (Splicing). Preferiblemente se elige por lo tanto para la detección de p16^{INK4a} una secuencia, que existe sólo en su forma empalmada. De esta manera es garantizado, que el ADN no-transcrito presente en el genoma no sea amplificado para p16^{INK4a}. Preferiblemente por un intrón se amplifica bajo aplicación de iniciadores apropiados una secuencia de dos exones.

35 [0049] Para la detección de p16^{INK4a}, particularmente para la detección del mRNA, es hecho preferiblemente un control, que asegura, que el resultado de esta detección sea significativo. Como control es idóneo para esto de manera particular la detección mRNA humano producido constitutivamente. Una secuencia de control adecuada debería por lo tanto siempre producirse en una determinada cantidad, de modo que se garantice, que esté presente material celular en la prueba, en el que transcurren procedimientos de transcripción de manera regular. Si este no es el caso, el resultado, de que no está presente ningún p16^{INK4a}-mRNA en la prueba, no tiene fuerza expresiva. Un control adecuado garantiza por lo tanto, que declaraciones falsas negativas de este tipo sean evitadas. Un ejemplo preferido para un control adecuado es la detección de mRNA para β2-microglobulina, que siempre es transcrita correspondientemente empalmada y constitutiva. Según la invención una aplicación de secuencias de iniciador superpuestas de intrón impide una coamplificación de ADN genómico.

45 [0050] La presente invención resuelve el problema técnico de base también a través de la puesta a disposición de un kit para el diagnóstico de infecciones, especialmente para la realización de un procedimiento según la presente invención, que comprende al menos un envase, que presenta al menos una sonda de oligonucleótidos de las secuencias SEC de ID NO: 25-48 y un sistema PCR según una de las reivindicaciones presentes 1-4, como medio de detección para HPV de bajo riesgo y/o medios de detección para HPV de alto riesgo.

50 [0051] El kit se construye preferiblemente de tal manera, que se utilizan para las diferentes detecciones descritas y controles, cebadores adecuados, que se adecúan para una amplificación de las secuencias de ácido nucleico deseadas por las reacciones PCR. A través de la selección de los iniciadores se puede determinar, qué detecciones y controles deben ser hechos. Ventajosamente los cebadores existen aquí en forma de mezclas de iniciadores diferentes, de modo que se puede decidir por la selección de una mezcla determinada, qué detecciones se realizan.

55 [0052] En otra forma divulgada del kit las mezclas comprenden grupos de cebadores con al menos una de las secuencias de nucleótido de SEC ID N°. 49 hasta 56 y/o SEC ID N°. 57 hasta las 64 del protocolo de secuencias adjunto.

60 [0053] Esta medida tiene la ventaja de proveer y por tanto detectar iniciadores para todos tipos de HPV de alto riesgo en un lote. En el caso de resultados no claros, por ejemplo en el caso de reacciones de color débiles, varias mezclas de iniciadores para diferentes áreas ADN del HPV permiten un control integrador de resultados y aumentan por consiguiente la seguridad de la detección.

65 [0054] En otra forma de realización del lote las sondas de oligonucleótido están inmovilizadas sobre un soporte,

particularmente sobre materiales de soporte. Como materiales de soporte vienen particularmente en consideración celulosa de nitro, nylon o PVDF. La caracterización de los amplicones se realiza a través de la hibridación con las sondas de oligonucleótido fijadas. Seguidamente a la hibridación pasos rigurosos de lavado garantizan que el enlace de los amplicones con las sondas de oligonucleótido se mantenga sólo entonces, cuando la secuencia de la sonda en gran parte (cada vez según secuencia a aprox. 80 %), preferiblemente a 100%, sea complementaria a la secuencia del amplicón. Las sondas de oligonucleótido fijadas admiten también condiciones duras para los pasos de lavado. Por consiguiente es garantizado que solo sean probados amplicones ligados específicamente. Materiales ligados no-específicamente, que pueden falsificar las pruebas, son por ello excluidos.

5

[0055] En otra forma divulgada del lote las sondas de oligonucleótido están comprendidas en grupos, particularmente en grupos con las secuencias de nucleótido SEC ID N°. 1 hasta 28 y/o SEC ID N°. 29 hasta 48.

10

[0056] Esta medida, como ya descrito para los iniciadores, tiene la ventaja de poder proveer y por tanto probar sondas de oligonucleótido para todos tipos de HPV de alto riesgo en un kit. En el caso de resultados no claros, por ejemplo en el caso de reacciones de color débiles, los grupos de sondas de oligonucleótido para áreas ADN del HPV diferentes permiten un control integrador de resultados y aumenta por consiguiente la seguridad de las detecciones.

15

[0057] En otra forma del kit es hecho adicionalmente una detección para el agente patógeno clamidia trachomati.

20

[0058] En otra forma adicionalmente o alternativamente a ello se puede probar sobre los agentes patógenos Treponema pallidum y/o Neisseria gonorrhoe.

[0059] Es además preferible que como medio de detección y/o medios de control estén contenidos en el lote sondas de gen según la invención, que pueden alternarse específicamente con las secuencias a probar. De manera especialmente ventajosa estas sondas de gen son previstas para la detección de productos PCR, que se pueden utilizar con una amplificación mediante iniciadores apropiados de la manera descrita. En una forma de ejecución preferida estas sondas de gen están fijadas sobre al menos un soporte, de modo que las diferentes detecciones se pueden realizar sin gran gasto. Por ejemplo el soporte puede estar configurado de tal manera, que con ello se trata de una tira de prueba con las sondas de gen correspondientemente fijadas. Esta tira de prueba se puede mojar por ejemplo con la mezcla reactiva de PCR, de modo que los productos PCR contenidos en ella se repartan sobre la tira de prueba, por ejemplo por fuerzas capilares, y así alcancen las diferentes sondas de gen y aquí interactúen con resultados positivos. Estas interacciones son hechas visibles preferiblemente a través de métodos adecuados. Esto puede suceder por ejemplo con una marcación de los productos PCR durante la reacción de PCR, de modo que con interacción se presenta una reacción de color u otra reacción demostrable en punto correspondiente del soporte, particularmente de la tira de prueba.

25

30

[0060] Como otra posibilidad para la detección de agentes patógenos determinados pueden ser utilizados cebadores de PCR en combinación con una secuenciación de los productos PCR.

35

[0061] En otra forma de realización de la invención los materiales de muestras provienen de biopsias o citologías, particularmente citologías cervicales.

40

[0062] En una forma de ejecución preferida del kit según la invención además están presentes reactivos para el aislamiento de ADN y/o mRNA. Aquí se trata por ejemplo de tampones adecuados, soluciones madre y/o enzimas. Los reactivos pueden ser puestos a disposición naturalmente también por el usuario.

45

[0063] En otra forma de ejecución preferida en el lote según la invención están contenidos reactivos para la realización de reacciones de PCR. Aquí se puede tratar a su vez de tampones adecuados, soluciones madre y/o enzimas. Además pueden también estar contenidos vasos de muestras adecuados y similares en el lote según la invención.

50

[0064] Una gran ventaja del lote divulgado para el diagnóstico de infecciones de HPV es que el lote puede estar construido modularmente y así es posible un diagnóstico gradual de las infecciones. Así puede ser realizada por ejemplo una tipificación del patógeno HPV y la detección para HSV II, sin que se realice una detección de p16^{INK4a}. La estructura modular puede ser realizada particularmente de tal manera, que son ofrecidas diferentes mezclas de iniciadores para la detección de diferentes combinaciones de agentes patógenos o de control, con lo cual por lo tanto respectivamente se puede seleccionar una mezcla determinada. Las sondas de gen mismas pueden ventajosamente estar disponibles siempre en su totalidad sobre un soporte, por ejemplo sobre una tira de prueba. Sólo con selección de iniciadores apropiado determinados puede entonces aparecer una reacción de color o una reacción demostrable. Esto tiene la ventaja, que se puede utilizar siempre el mismo soporte. La estructura modular es entonces realizada a través de las diferentes mezclas de iniciador. Por otra parte pueden ser utilizados también soportes diversos con borde de sondas de gen diferentes como componentes modulares con siempre la misma composición de iniciador. Aquí son posibles todas las combinaciones.

55

60

[0065] En otra forma presenta el kit presenta soportes en forma de tiras de prueba, sondas de oligonucleótido, particularmente sondas de oligonucleótido aplicadas sobre los soportes, y cebadores, particularmente cebadores hacia delante y/o cebadores hacia atrás, en un conjunto, particularmente en un conjunto, que se sintoniza sobre las secuencias objetivo a probar. Preferiblemente el kit divulgado comprende todas las secuencias de nucleótido SEC ID n°.

65

1 hasta las 64 del protocolo de secuencias adjunto.

[0066] Los diferentes iniciadores pueden ser puestos a disposición respectivamente en un vaso de reacción, de modo que también las reacciones PCR transcurren en la mezcla. Ventajosamente los iniciadores se deben separar el uno del otro para reacciones con mRNA y para reacciones con ADN. Sin embargo puede ser también preferible, que todas las reacciones transcurren en un vaso o que las reacciones diferentes sean hechas separadas una de la otra.

[0067] La divulgación presente se refiere además también a tiras de prueba, que comprenden sondas de oligonucleótido con al menos una de las secuencias de nucleótido según la solicitud presente, y también la utilización de al menos una sonda de oligonucleótido según la solicitud presente para la fabricación de tiras de prueba.

[0068] Además la divulgación presente también se refiere a la utilización de al menos una de las secuencias de nucleótido divulgadas, para la detección de virus del papiloma humanos (HPV), especialmente para la discriminación entre HPV de alto riesgo y HPV de bajo riesgo, y también la utilización de al menos una de las secuencias de nucleótido según de presente invención, para el diagnóstico precoz de enfermedades de carcinomas, particularmente precancerosas (fases previas cancerígenas), preferiblemente de cáncer de cérvix.

[0069] Por consiguiente las secuencias de cebadores divulgadas y de sondas de oligonucleótido sirven con ventaja particular para la prevención de enfermedades cancerígenas.

[0070] Otras características y ventajas de la invención resultan de la descripción sucesiva de formas de realización preferidas por medio de ejemplos en cooperación con reivindicaciones secundarias. Aquí las características individuales pueden ser realizadas respectivamente por sí solas o varias en combinación.

[0071] La presente invención es detalladamente descrita y explicada a través de los ejemplos siguientes de formas de realización preferidas en relación con las figuras siguientes y por el protocolo de secuencia adjunto.

Se muestra:

Fig. 1: Representación de una tira de prueba con diferentes sondas de gen, y

Fig. 2: Representación de diferentes resultados para la tira de prueba según la Fig. 1.

Ejemplo:

[0072] El ejemplo ilustra la detección de virus del papiloma humanos (HPV). En una primera fase es hecha una PCR con secuencias objetivo en el área de gen E1. A continuación se realiza una caracterización de productos PCR obtenidos preferiblemente mediante una hibridación inversa. Particularmente amplicones se ligan y se prueban a sondas de oligonucleótidos fijadas sobre un soporte. Preferiblemente el soporte consiste de una membrana, particularmente una membrana de nitrocelulosa, preferiblemente en forma de una tira de prueba. Una diferenciación en tipos de alto riesgo y tipos de bajo riesgo se puede efectuar tanto mediante detecciones de grupos como también mediante detecciones individuales.

Material y métodos:

[0073] Se usan dos sistemas PCR. El sistema de PCR 1 comprende 4 conjuntos de cebadores de PCR A, B, C y D. Secuencias de los conjuntos de cebadores están todos en el área de gen E1 delantera de nt 850 hasta 1750 en el genoma de HPV (posición referida a HPV16). El sistema de PCR 2 comprende los 4 conjuntos de cebadores de PCR E, F, G y H, cuyas secuencias están todas en el área de gen E1 intermedia de nt 1750 - 2000. Un conjunto de cebador presenta según la invención un conjunto de cebadores hacia delante y un conjunto de cebadores hacia atrás. Sin embargo detecciones también se pueden realizar con cebadores individuales. Los conjuntos de cebadores A y D o E y si cubren respectivamente una zona común, los conjuntos B y C o F y G una zona colindante directa. Las secuencias A-for, A-rev, B-for, B-rev, C-for, C-rev, D-for y D-rev corresponden las SEC ID N°. 49 hasta 56 de acta de secuencia adjunta. Las secuencias E-for, E-rev, F-for, F-rev, G-for, G-rev, H-for y H-rev corresponden las SEC ID N°. 57 hasta 64 de acta de secuencia adjunta. Otras combinaciones de sondas de oligonucleótido y/o iniciadores son posibles.

Sistema de PCR 1:

[0074]

Secuencias de cebador:

A-for: TAVAKGCWGTRYVKGYHSTAAAACGAAAGTWT
especialmente:

A-for1a: AGAKGCWGTRCAGGTYCTAAAACGAAAGTAT

A-for1b: TAAATGCTGTGTGTGCACTAAAACGAAAGTTT

A-for1c: TACATGCTGTGTCTGCAGTAAAACGAAAGTTT

A-rev: TTCCAATTTCASWATTGCCATANCCGCTGTC
especialmente:

A-rev1a: TTCCACTTCAGAATTGCCATAACCGCTGTC
 A-rev1b: TTCCACTTCAGTATTGCCATAYCCGCTGTC
 A-rev1c: TTCCACTTCACTATTGCCATAGCCGCTGTC

5 B-for: CCAGAAGGTACMGAYGGGGADGGGWCGGG
 especialmente:
 B-for1a: CCAGAAGGTACMGACGGGGAGGG
 B-for1b: GAAGGTACAGAYGGGGAWGGGWCGGG
 B-rev: TGTGCTGTCTCDHGCTCTGCCTGTWCACAA
 10 especialmente
 B-rev1a: TGTGCTGTCTCTWGCTCTGCCTGTTCACAA
 B-rev1b: TGTGCTGTCTCRGCTCTGCCTGTACACAA

15 C-for: MYSTGAAGGTACAGAKGRKGAGGGG
 especialmente:
 C-for1a: ACCTGAAGGTACAGAKGGGGAGGGG
 C-for1b: CTGTGAAGGTACAGAKGATGAGGGG

20 C-rev: TMRBGRCTRVTADAWACTTTCGTTTTA
 especialmente:
 C-rev1a: CGCGGRCTGMCTAGAACTTTCGTTTTA
 C-rev1b: TAAKGGACTRSCTAWATACTTTCGTTTTA

25 D-for: GMKRHHSTRYRSGMVYAAAACGAAAGYWHWTAGG
 especialmente
 D-for1a: GAGGCAGTACAGGCACTAAAACGAAAGCTATTAGG
 D-for1b: CTGTGCAGGACCTAAAACGAAAGTATTTAGG
 D-for1c: CTGACCTGTGCGAGTTAAAACGAAAGTACAT
 D-for1d: CTATAGTGCAGGAGTTAAAACGAAAGTACAT
 30 D-rev: TTCCACTTCAGWATWGCCATWKSYACTRTC
 especialmente
 D-rev1a: CCACTTCAGTATTGCCATAKCCACTGTC
 D-rev1b: CCACTTCAGAATAGCCATAKCCACTGTC
 D-rev1c: TTCCACTTCAGTATTGCCATTGGTACTAT
 35

Sondas:

[0075] Sucesivamente para la detección individual y/o detección de grupos se describen sondas de oligonucleótido adecuadas.

40 Oligo 1 hasta 24 corresponden las SEC ID Nº. 1 hasta 24 de acta de secuencia adjunta.
 Oligo 1 hasta 3 sirven para la detección individual para HPV 16, 18, y 45:

45 Oligo 1: TGATATTAGTGGATGTGTAGACAAT
 Oligo 2: TTTTATTGATACACAAGGAACATTT
 Oligo 3: TTTTATTGACACACAATTATCCATT

[0076] Oligo 4 hasta 7 sirven para la detección de grupos para HPV 31, 33, 35, y 39:

50 Oligo 4: AAGTGATATTAGTAGTTGTGTGGAT
 Oligo 5: AAGTGCTGCGGAGGACGTTGTTGAT
 Oligo 6: TAGCAGCGTGAGCTTATGTGTTAAT
 Oligo 7: CTTTATTGATGATTCCACAGATATT

[0077] Oligo 8 hasta 13 sirven para la detección de grupos para HPV 51, 52, 53, 56, 58 y 59:

55 Oligo 8: CTTTATAGATAGTGAACACTAGTATT
 Oligo 9: AAGTGCTGGGCAAGATGGTGTAGAA
 Oligo 10: GTTTATAGACAATAGTAATATAATA
 Oligo 11: GATTTATAGACGATTCATATATAACA
 60 Oligo 12: AAGTGCTGTAGAGGACTGTGTGGAC
 Oligo 13: TTTTATTGATGATACCACAACAATT

[0078] Oligo 14 hasta 17 sirven para la detección de grupos para HPV 66, 68, 73, y 82:

65 Oligo 14: ATTTATAGACAATACACTTATAAAC
 Oligo 15: TTTTATTGATGATTCTACACATATTT

Oligo 16: TGAAAAGAGATGAATTCATAGACA
 Oligo 17: TTTTATAGATACAAGTAATAGTATT

Oligo 18 hasta 24 sirven para la detección de grupos para HPV 6, 11, 40, 41, 42, 43 y 44:

5
 Oligo 18: AAACACTATAGCCGAGGCAGTGGAA
 Oligo 19: AAGCAATGTAGCTAATGCAGTAGAA
 Oligo 20: ACAATACTCAGAACCGTCTATAGAC
 Oligo 21: CAGTGGCATAGACAGCACCACAGTG
 10 Oligo 22: CAGTGATTCACAGCACAGCATAGAC
 Oligo 23: ACACTGTTTACAGGAATCTGTAGAC
 Oligo 24: AAGTAATATTGAGCAGGCAGTGGAG

Sistema de PCR 2:

Secuencias de cebador:

[0079]

20 E-for: RAYWAACWGTDTTACARCATAGYTTT
 especialmente:
 E-for1: ACAAACAGTITTACARCATAGYTTT

E-rev: CATAWTWATAKGCWATDTCACTATC
 especialmente:
 E-rev1: CATATTTATATGCWATITCACTATC
 E-rev2: CATAATAATATGCAATGTCACTATC
 F-for: MGMACAGGWATRTCMAATATTAGTG
 especialmente:
 30 F-for1: GAACAGGWATRTCMAATATTAGTG

F-rev: AWTBAWATGCHATRTCRCCTTTCATCWGT
 especialmente:
 F-rev1: AATTAAATGCTATGTCACTTTCATCAGT
 35 F-rev2: TTCAAATGCMATATRCCTTTCATCTGT

G-for: RTATGGVRRNACACCWGAATGGAT
 especialmente:
 G-for1: TATGGAGASACACCWGAATGGAT
 40 G-for2: TATGGSGAAACACCWGAATGGAT
 G-for3: TATGGGAGTACACCWGAATGGAT

G-rev: WGCATTRCTRTCTRYRTCWGCYARYTGTGCATADW
 especialmente
 45 G-rev1: GCATTGCTATCTATGTCTGCTAGTTGTGC
 G-rev2: GCATTGCTATCTGTATCAGCCAATTGTGC
 G-rev3: GCATTAATCTAYATCTGCTAAYTGTGC

H-for: GGVDWCMWRYRVRTGGGGHATGGTV
 especialmente:
 H-for1: GGCTTACAAATGCATGGGGAATGGTC
 H-for2: GGGTGACCTGTAGATGGGGAATGGTA
 H-for3: GGACGTCATGCAAATGGGGTATGGT
 H-for4: GGCTAACCTGTACGTGGGGCATGGT
 55 H-rev: YKHDBWATYMWYTCYGGYRYBKYBCC
 especialmente:
 H-rev1: CGTGTTATCCATTCTGGTGCTTCCCC
 H-rev2: CGCGTTATCCATTCCGGCGCCTCCCC
 H-rev3: TTTACAATTATTTCTGGCATTGCGCC
 60 H-rev4: TTAGCTATCCATTCTGGTGTTGTGCC
 H-rev5: CTTGTTATCCATTCCGGTGTCTCTCC
 H-rev6: CTTTGAATCCACTCTGGTGTGTCTCC

Sondas:

[0080] Sucesivamente para la detección individual y/o detección de grupos son descritas sondas de oligonucleótido

adecuadas.

[0081] Oligo 25 hasta 48 corresponden las SEC ID nº. 25 hasta 48 de acta de secuencia adjunta. Oligo 25 hasta 27 sirven para la detección individual para HPV 16, 18, y 45:

Oligo 25: AATGATTGTACATTTGAATTATCACAG
 Oligo 26: AGTAATGGGAGACACACCTGAGTGGA
 Oligo 27: AGTAAGTGGAGACACACCTGAGTGGA

[0082] Oligo 28 hasta 31 sirven para la detección de grupos para HPV 31, 33, 35, y 39:

Oligo 28: AATGACACAACATTTGATTTGTCCCAA
 Oligo 29: AATGATAATATATTTGATTTAAGTGAA
 Oligo 30: AATGATGCAATATTTGACCTATCTGAA
 Oligo 31: GGTAACAGGGGATACGCCAGAATGGA

[0083] Oligo 32 hasta 37 sirven para la detección de grupos para HPV 51, 52, 53, 56, 58 y 59:

Oligo 32: ACAACATAGTTTTGAGGATAGTACCT
 Oligo 33: GACAATAGCATATTCGATTTTGGAGAA
 Oligo 34: ACAACATAGCTTTGAGGACTGTCAAT
 Oligo 35: GCAACACAGTTTACAGGATAGTCAAT
 Oligo 36: AATGATGATATATTTGATTTAAGTGAA
 Oligo 37: AGTTATAGGGAAACGCCGAATGGA

[0084] Oligo 38 hasta 41 sirven para la detección de grupos para HPV 66, 68, 73, y 82:

Oligo 38: GCAACACAGTTTACAAGACAATCAAT
 Oligo 39: GGTGTGTGGCGACACGCCGGAATGGA
 Oligo 40: GATGATAGTCAATTTGACCTATCTCAA
 Oligo 41: ACAGCACAGTTTGTATGATAGCACGT

[0085] Oligo 42 hasta 48 sirven para la detección de grupos para HPV 6, 11, 40, 41, 42, 43 y 44:

Oligo 42: CGTTGCACGTACACTTGCAACGCTAT
 Oligo 43: CGTGGCACGTACATTAGGTACGTTAT
 Oligo 44: AGTTGTTAGACAGCTATCCAAAATGT
 Oligo 45: AGTGTACAATTGGTTCACAGCCAATT
 Oligo 46: AGTGTCCAAAGGCCTTAGTAAATTAT
 Oligo 47: AATAGTAAGACAGCTAGCACAATGT
 Oligo 48: AGTGGCACGTATGATGGCAACCCGTT

[0086] La PCR se realiza en salientes multiplex con el conjunto de iniciador A hasta H en combinaciones adecuadas. Preferiblemente A y D o E y H se utilizan juntos en una mezcla y los conjuntos de iniciador B y C o F y G juntos en una mezcla. La PCR se realiza según un programa de temperatura adecuado, preferiblemente con

- 5 minutos de desnaturalización a 95°C, 1 ciclo
- 45 segundos de desnaturalización a 95°C, 30 ciclos
- 45 segundos de recocido a 40°C,
- 30 segundos de elongación a 72°C,
- 8 minutos de elongación a 72°C. 1 ciclo

Elaboración de muestras:

[0087] Material de citología o de biopsia es provisto en un medio de transporte adecuado disponible comercialmente, en el que ADN y ARN permanecen intactos. El ADN o extracción de ARN (para p16^{INK4a}) se realiza sobre procedimientos de depuración de columnas generalmente habituales. El ADN o ARN ganado se puede utilizar en la PCR con las mezclas respectivas de los diferentes cebadores a modo de módulo.

Realización de prueba:

[0088]

1. El tampón de hibridación y el tampón de lavado estricto se precalientan a 47°C, todas las demás soluciones se calientan sobre temperatura ambiente. Se preparan bañeras de incubación correspondientes al número de las muestras y de los controles. Cavidades, que deben ser usadas, se marcan en el borde. Cavidades ya usadas no se emplean otra vez.

2. En las cavidades marcadas son pipetados en cada una 40 µl reactivo de desnaturalización.

5 3. Cada amplicón de 20 µl de cada uno de los salientes de PCR a examinar son pipetados a las gotas de reactivo de desnaturalización, se mezclan bien y se incuban 5 minutos a temperatura ambiente.

4. Se añaden respectivamente con cuidado 1 ml de tampón de hibridación precalentado y mezclado.

10 5. Las tiras individuales se retiran con unas pinzas del tubo y se colocan en la bañera de incubación. Las tiras deben ser cubiertas completamente con líquido y el lado cubierto debe indicar hacia arriba. Esto también vale para todos los sucesivos pasos de incubación y de lavado. Las tiras, que se giran p. ej. a través de adición de tampones de lavado, se recogen con unas pinzas en un extremo y se giran de nuevo.

15 6. La bañera se incuba por 30 min. a 47°C en el baño de agua de agitación (tener en cuenta la frecuencia).

7. El tampón de hibridación se vierte completamente y las tiras se lavan a continuación dos veces 1 minuto cada vez con 1 ml de solución de lavado estricto mezclado a temperatura ambiente sobre el agitador horizontal (frecuencia!).

20 8. Se añade respectivamente 1 ml de solución de lavado estricto precalentado e incuba a 15 minutos a 47°C en el baño de agua bajo agitación.

9. Desde este paso se trabaja a temperatura ambiente. La solución es golpeada y las tiras son lavadas dos veces cada vez con 1 ml de solución de lavado cada vez 1 minuto (agitador).

25 10. 1 ml de conjugado preparado (concentrado de conjugado en la proporción 1:100 con tampón de conjugado diluido) se da a cada tira y se incuba 30 minutos sobre el agitador horizontal.

30 11. El conjugado se retira y se lava tres veces cada vez 1 minuto con cada vez 1 ml solución de lavado (agitador horizontal).

12. 1 ml substrato calentado sobre temperatura ambiente es pipetado en las cavidades y, según como de rapido se desenvuelve la reacción de color, se incuba entre 10 y 20 minutos sobre el agitador horizontal.

35 13. La reacción se para con agua destilada a través de doble lavado. Las tiras se retiran con unas pinzas de las cavidades y se dejan sobre papel de filtro para el secado.

[0089] Las tiras secadas son evaluadas a continuación y conservadas protegidas de la luz.

40 Asignación de los iniciadores HPV:

[0090] Mediante los iniciadores aún no se realiza ninguna diferenciación de tipos de HPV. Los iniciadores sin embargo garantizan, que posiblemente todos los genotipos HPV relevantes se amplifiquen. A través de la hibridación inversa se realiza la diferenciación en tipos de HPV de alto riesgo ("high risk") y de bajo riesgo ("low risk").

45 [0091] Figura 1 muestra un ejemplo para una posible estructura de una tira de prueba según de la presente invención con sondas de gen correspondientes, sobre las que se pueden aplicar las muestras reelaboradas, de modo que estas interactúan con secuencias de las sondas de gen. Sin ser delimitado al respecto, pueden ser utilizados tanto el sistema de PCR 1 descrito como también el sistema de PCR 2. Además es descrito a modo de ejemplo el sistema de PCR 1. Para el sistema de PCR 2 las aclaraciones se transfieren sobre sus sondas de oligonucleótido.

50 [0092] En la figura 1 en total 9 áreas de prueba, también denominadas como zonas de reacción, son definidas y capaces de desarrollarse. Un control de conjugado documenta la eficiencia del enlace de conjugado. Este debe ser desarrollado convenientemente siempre. Un control de amplificación igualmente debe siempre ser desarrollado. Este presenta una sonda para un llamado gen constitutivo, que se puede encontrar cada prueba de ADN humana. En el presente caso el gen constitutivo se trata de Gliceraldehído fosfato-deshidrogenasa (GAPDH). Por consiguiente la zona de reacción sirve como control de aislamiento de ADN, amplificación de ADN e hibridación. Si estas zonas de reacción no están desarrolladas, existe una reacción negativa falsa. En este caso la prueba debe ser repetida.

60 [0093] Además en la zona de reacción HPV-poli están montados todos los Oligo 1 hasta 24 para todos los HPV a detectar del sistema PCR 1. Esta zona de reacción está desarrollada, cuando el ADN de uno o varios de los genotipos HPV mencionados están contenidos en el material de muestras. HPV de alto riesgo contiene todos los Oligo 1 hasta 17. Por consiguiente, una reacción positiva significa, que el material de muestras examinado contiene uno o varios tipos de HPV de alto riesgo HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82. HPV 16 contiene Oligo 1, HPV 18 contiene Oligo 2, HPV 45 contiene Oligo 3. Estas tres zonas de reacción permiten adicionalmente detecciones individuales de estos tres tipos de genotipos de alto riesgo frecuentemente existentes. HPV 30er contiene todos los Oligo 4 hasta 7 y permite la detección de cepas de los tipos de alto riesgo HPV31, 33, 35 y 39. HPV 50er contiene todos

Oligo 8 hasta 13. Esta zona de reacción puede indicar, si están presentes los tipos de alto riesgo 51, 52, 53, 56 58 o 59. HPV de bajo riesgo contiene todos los Oligo 18 hasta 24 y representa los tipos de bajo riesgo HPV6, 11, 40, 42, 43 y 44. Este modelo se puede usar en combinación con otros ligamentos sobre la tira de prueba, para poder detectar facultativamente otros agentes patógenos. Eventualmente puede también ser razonable la aplicación de tiras de prueba reducidas, sobre las que faltan zonas de reacción determinadas.

[0094] Fig. 2 muestra posibles resultados de prueba para tiras de prueba de la Fig. 1. En la figura 2a) se muestra un posible resultado, donde existe una infección con tipos de HPV de alto riesgo. HPV18 se detectó. Fig. 2b) muestra un posible resultado de prueba positivo en la zona de reacción HPV-poli con una reacción positiva simultánea con tipos de HPV de bajo riesgo. Un resultado de prueba de este tipo se deduciría sobre un riesgo pequeño para un carcinoma de cérvix o su desarrollo. Fig. 2c) muestra un resultado de prueba negativo. Ninguno de los genotipos HPV demostrables está presente. Fig. 2d) muestra un posible resultado de prueba con una infección simultánea de HPV de alto riesgo y HPV de bajo riesgo. Fig. 2e) indica, que están presentes tipos de HPV de alto riesgo, junto a ellos fueron detectados HPV18 y HPV45. En todos los resultados de prueba se dedujo solo un control GAPDH ligeramente desarrollado sobre ADN demasiado poco en el material de muestras. Un resultado de prueba de este tipo no se evaluaría, puesto que el material de muestras contenía por lo visto demasiadas pocas células y/o demasiado poco inhibidor PCR.

Acta de secuencia

[0095]

<110> A.I.D. Autoimmun Diagnostika GmbH

<120> Detección de virus de Papiloma

<130> P 46 349 DE

<160> 64

<170> Versión de patentIn 3.3

<210> 1

<211> 25

<212> ADN

<213> Virus de papiloma humano

<400> 1

tgatattagt ggatgtgtag acaat

<210> 2

<211> 25

<212> ADN

<213> virus de papiloma humano

<400> 2

ttttattgat acacaaggaa cattt

<210> 3

<211> 25

<212> ADN

<213> virus de papiloma humano

<400> 3

ttttattgac acacaattat ccatt

<210> 4

<211> 25

<212> ADN

<213> virus de papiloma humano

<400> 4

aagtgtatt agtagttgtg tggat

<210> 5

<211> 25

<212> ADN

<213> virus de papiloma humano
 <400> 5
 aagtgctgcg gaggacgtg ttgat
 5
 <210> 6
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano
 10
 <400> 6
 tagcagcgtg agcttatgtg ttaat
 <210> 7
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano
 15
 <400> 7
 ctttattgat gattccacag atatt
 20
 <210> 8
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano
 25
 <400> 8
 ctttatagat agtgaaacta gtatt
 30
 <210> 9
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano
 35
 <400> 9
 aagtgctggg caagatggtg tagaa
 <210> 10
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano
 40
 <400> 10
 gtttatagac aatagtaata taata
 45
 <210> 11
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano
 50
 <400> 11
 gatttataga cgattcatat ataca
 <210> 12
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano
 55
 <400> 12
 aagtgctgta gaggactgtg tggac
 60
 <210> 13
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano
 65

<400> 13
 ttttattgat gataccacaa caatt

 5 <210> 14
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano

 10 <400> 14
 atttatagac aatacactta taaac

 <210> 15
 <211> 26
 <212> ADN
 15 <213> virus de papiloma humano

 <400> 15
 ttttattgat gattctacac atattt

 20 <210> 16
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano

 25 <400> 16
 tgaaaagaga tgaattcata gaca

 <210> 17
 <211> 25
 30 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano

 <400> 17
 ttttatagat acaagtaata gtatt
 35
 <210> 18
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano
 40
 <400> 18
 aaacactata gccgaggcag tggaa

 <210> 19
 45 <211> 25
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano

 <400> 19
 50 aagcaatgta gctaatgcag tagaa

 <210> 20
 <211> 25
 <212> ADN
 55 <213> virus de papiloma humano

 <400> 20
 acaatactca gaaccgtcta tagac

 60 <210> 21
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano

 65 <400> 21
 cagtggcata gacagcacca cagtg

<210> 22
 <211> 25
 <212> ADN
 5 <213> virus de papiloma humano

 <400> 22
 cagtgattca cagcacagca tagac

 10 <210> 23
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano

 15 <400> 23
 acactgttta caggaatctg tagac

 <210> 24
 <211> 25
 20 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano

 <400> 24
 aagtaatatt gagcaggcag tggag
 25
 <210> 25
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano
 30
 <400> 25
 aatgattgta catttgaatt atcacag

 <210> 26
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano
 35
 <400> 26
 40 agtaatggga gacacacctg agtgga

 <210> 27
 <211> 26
 <212> ADN
 45 <213> virus de papiloma humano

 <400> 27
 agtaagtgga gacacacctg agtgga

 50 <210> 28
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano

 55 <400> 28
 aatgacacaa catttgattt gtcccaa

 <210> 29
 <211> 27
 60 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano

 <400> 29
 aatgataata tatttgattt aagtgaa
 65
 <210> 30

<211> 27
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano
 5 <400> 30
 aatgatgcaa tatttgacct atctgaa
 <210> 31
 <211> 26
 10 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano
 <400> 31
 ggtaacaggg gatacgccag aatgga
 15 <210> 32
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano
 20 <400> 32
 acaacatagt ttgaggata gtacct
 <210> 33
 <211> 27
 25 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano
 <400> 33
 30 gacaatagca tattcgattt tggagaa
 <210> 34
 <211> 26
 <212> ADN
 35 <213> virus de papiloma humano
 <400> 34
 acaacatagc ttgaggact gtcaat
 40 <210> 35
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano
 45 <400> 35
 gcaacacagt ttacaggata gtcaat
 <210> 36
 <211> 27
 50 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano
 <400> 36
 aatgatgata tatttgattt aagtgaa
 55 <210> 37
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano
 60 <400> 37
 agttataggg gaaacgcccg aatgga
 <210> 38
 <211> 26
 65 <212> ADN

<213> virus de papiloma humano
 <400> 38
 gcaacacagt ttacaagaca atcaat
 5
 <210> 39
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano
 10
 <400> 39
 ggtgtgtggc gacacgccgg aatgga
 <210> 40
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano
 15
 <400> 40
 gatgatagtc aattgacct atctcaa
 20
 <210> 41
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano
 25
 <400> 41
 acagcacagt ttgatgata gcacgt
 30
 <210> 42
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano
 35
 <400> 42
 cgttgacagt acactgcaa cgctat
 <210> 43
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano
 40
 <400> 43
 cgtggcacgt acattagta cgttat
 45
 <210> 44
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano
 50
 <400> 44
 agttgttaga cagctatcca aaatgt
 <210> 45
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano
 55
 <400> 45
 agtgtacaat tggttcacag ccaatt
 60
 <210> 46
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano
 65

<400> 46
 agtgtccaaa ggccttagta aattat

 5 <210> 47
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano

 10 <400> 47
 aatagtaaga cagctagcac aatgt

 <210> 48
 <211> 26
 <212> ADN
 15 <213> virus de papiloma humano

 <400> 48
 agtggcacgt atgatggcaa cccggt

 20 <210> 49
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano

 25 <400> 49
 tavakgcwgt ryvkgyhsta aaacgaaagt wt

 <210> 50
 <211> 30
 30 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano

 <220>
 <221> característica-misc
 35 <222> (22)..(22)
 <223> n e s g o a o t o c

 <400> 50
 ttccactca swattgcat anccgctgtc
 40
 <210> 51
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano
 45
 <400> 51
 ccagaaggta cmgaygggga dgggwcggg

 <210> 52
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano

 <400> 52
 55 tgtgctgtct cdhgctctgc ctgtwcacaa

 <210> 53
 <211> 25
 <212> ADN
 60 <213> virus de papiloma humano

 <400> 53
 mystgaaggt acagakgrkg agggg

 65 <210> 54
 <211> 29

<212> ADN
 <213> virus de papiloma humano

 <400> 54
 5 tmrbggrctr vctadawact ttcgttta

 <210> 55
 <211> 35
 <212> ADN
 10 <213> virus de papiloma humano

 <400> 55
 gmkrhstry rsgmvytaa acgaaagywh wtagg

 15 <210> 56
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano

 20 <400> 56
 ttccactca gwatwgccat wksyactrtc

 <210> 57
 <211> 26
 25 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano

 <400> 57
 raywaacwgt dtacarcacat agyttt
 30
 <210> 58
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano
 35
 <400> 58
 catawtwata kgcwatdtca ctatc

 <210> 59
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano
 40
 <400> 59
 45 mgmacaggwa trtcmaat tagtg

 <210> 60
 <211> 28
 <212> ADN
 50 <213> virus de papiloma humano

 <400> 60
 awtbawatgc hatrcrcctt tcatcwtg

 55 <210> 61
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> virus de papiloma humano

 60 <220>
 <221> característica misc
 <222> (10)..(10)
 <223> n e s g o a o t o c

 65 <400> 61
 rtatggvrrm acaccwgaat ggat

<210> 62
<211> 35
<212> ADN
5 <213> virus de papiloma humano

<400> 62
wgcatrctr tctryrtcwg cyarytgtc atadw

10 <210> 63
<211> 26
<212> ADN
<213> virus de papiloma humano

15 <400> 63
ggvydwcmwr yrvrtggggh atggtv

<210> 64
<211> 26
20 <212> ADN
<213> virus de papiloma humano

<400> 64
25 ykhdbwatym wytcygyry bkybcc

REIVINDICACIONES

- 5 1. Sistema PCR comprendiendo un juego de cebadores consistente en un cebador hacia adelante con la secuencia de nucleótidos SEC ID n°. 57 y un cebador hacia atrás con la secuencia de nucleótidos SEC ID n°. 58, un juego de cebadores de un cebador hacia adelante con la secuencia de nucleótidos SEC ID n°. 59 y un cebador hacia atrás con la secuencia de nucleótidos SEC ID n°. 60, consistiendo un juego de cebadores en un cebador hacia adelante con la secuencia de nucleótidos SEC ID n°. 61 y un cebador hacia atrás con la secuencia de nucleótidos SEC ID n°. 62 y un juego de cebadores consistiendo en un cebador hacia adelante con la secuencia de nucleótidos SEC ID n°. 63 y un cebador hacia atrás con la secuencia de nucleótidos SEC ID n°. 64.
- 10 2. Sistema PCR según la reivindicación 1, **caracterizado por el hecho de que** los cebadores están marcados, particularmente con biotina.
- 15 3. Sistema de PCR según la reivindicación 1 o 2 para la aplicación en la detección de virus del papiloma humanos (HPV), especialmente para la discriminación entre tipos de alto riesgo y tipos de bajo riesgo de virus del papiloma humanos (HPV).
- 20 4. Sistema de PCR según la reivindicación 1 o 2 para la aplicación en la detección precoz de enfermedades de carcinomas, particularmente de precancerosas, de estas últimas preferiblemente de cáncer de cérvix.
- 25 5. Procedimiento para el diagnóstico de infecciones con virus del papiloma humanos (HPV), comprendiendo los siguientes pasos de proceso,
- detección de ADN con
a) control de la calidad de muestras
b) prueba sobre HPV de bajo riesgo
c) prueba sobre HPV de alto riesgo
- 30 **caracterizado por el hecho de que** la detección de ADN se efectúa sobre áreas específicas del ADN del HPV bajo aplicación de sondas de oligonucleótido con al menos una de las secuencias de nucleótido SEC ID n°. 25 hasta 48 y un sistema PCR según una de las reivindicaciones 1 hasta 4.
- 35 6. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado por el hecho de que** los cebadores se utilizan en grupos, preferiblemente en grupos para áreas comunes y/o para áreas adyacentes del ADN, particularmente del ADN del HPV.
- 40 7. Procedimiento según la reivindicación 5 o 6, **caracterizado por el hecho de que** los métodos PCR o análogos a métodos PCR se usan como procedimientos de amplificación.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 5 hasta 7, **caracterizado por el hecho de que** las sondas de oligonucleótidos se utilizan en una hibridación inversa.
- 45 9. Kit para el diagnóstico de infecciones con HPV, especialmente para la realización de un procedimiento según una de las reivindicaciones 5 hasta 8, que comprende al menos un envase, que presenta al menos una sonda de oligonucleótidos con al menos una de las secuencias de nucleótidos de SEC ID n°. 25 hasta 48, y un sistema PCR según una de las reivindicaciones 1 hasta 4 como medio de detección de HPV de bajo riesgo y/o medio de detección de HPV de alto riesgo.
10. Kit según la reivindicación 9, **caracterizado por el hecho de que** la al menos una sonda de oligonucleótidos se inmoviliza sobre un soporte, particularmente sobre una tira de prueba.

Fig. 1:

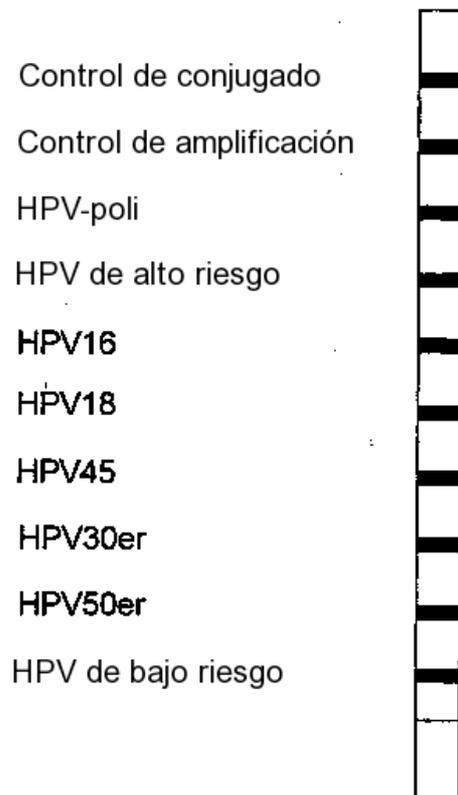


Fig. 2:

