

BIOTOOLS

BIOTOOLS B&M LABS.S.A.

Fabricado por:

BIOTOOLS B&M Labs, S.A.
Valle de Tobalina - 52 - Nave 39
28021 Madrid
España

Tel. (34) 91 710 00 74
Fax (34) 91 505 31 18
e-mail: info@biotools.eu
www.biotools.eu

BIOPAP Kit

***Kit para la detección de DNA de Papilomavirus
(HPV) en muestras clínicas***

Manual de Uso

Ref. 90.013

**ANTES DE USAR ESTE KIT LEA EN SU TOTALIDAD LAS INSTRUCCIONES DE USO
ESPECIALMENTE SI NO ESTÁ FAMILIARIZADO CON EL PROTOCOLO.**

BIOPAP Kit

**Uso exclusivo en investigación
No para procedimientos diagnósticos
Los resultados del test sólo pueden ser utilizados para análisis preliminar**

Algunas de las aplicaciones que pueden ser llevadas a cabo por este producto pueden estar cubiertas por patentes aplicables en determinados países. La compra de este producto no incluye o proporciona una licencia para llevar a cabo aplicaciones patentadas. Los usuarios podrían tener que obtener una licencia según el país y/o la aplicación. BIOTOOLS no apoya el uso sin licencia de aplicaciones patentadas.

POR FAVOR, COMPRUEBE LA INTEGRIDAD DEL KIT Y SUS COMPONENTES ANTES DE USARLO. EL USO DE KITS DETERIORADOS PUEDE CONLLEVAR LA FALTA DE RESULTADOS Y/O RESULTADOS INCORRECTOS.

USO PREVISTO

El BIOPAP Kit es una prueba de detección del virus papiloma humano (HPV) para uso exclusivo en investigación, de determinación cualitativa, que utiliza una técnica de amplificación del ADN (ácido desoxirribonucleico), para la detección directa del ADN de treinta y dos (32) genotipos de virus del papiloma humano (HPV tipos 6, 11, 13, 16, 18, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68 y 69) en muestras de cervix. El BIOPAP Kit puede diferenciar entre dos grupos: genotipos HPV genéricos (6, 11, 13, 16, 18, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68 y 69), y genotipos HPV oncogénicos (16, 18, 31, 33, 35, 52, 58 y 67).

Las muestras de cervix que pueden ser testadas con el BIOPAP Kit son las siguientes:

- Muestras tomadas con torundas de algodón estériles y homologadas. Para almacenamientos prolongados, utilizar solución de conservación que no contenga sustancias desnaturalizantes o que puedan interferir con la actividad de la ADN polimerasa¹.
- Muestras citológicas estándares o bien tras colposcopia, pero antes de añadir yodo o ácido acético. Para almacenamientos prolongados, utilizar solución de conservación que no contenga sustancias desnaturalizantes o que puedan interferir con la actividad de la ADN polimerasa.
- Muestras tomadas con dispositivos para toma de muestras en forma de cepillo, tales como Cervical Sampler™.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

El virus del papiloma humano (HPV) es un virus que afecta principalmente a tejidos cutáneos y anogenitales, con valores de prevalencia medios del 15 %, pero con grandes variaciones según la edad y otras variables demográficas². El HPV es un virus de ADN, con un genoma de aproximadamente 8.000 nucleótidos. Las enfermedades causadas por este virus van desde condilomas a neoplasias cervicales, vaginales y de vulva, y carcinoma. Algunos genotipos, de los más de 100 descritos hasta la fecha, están asociados a transformación neoplásica en cervix³. Esta transformación neoplásica está asociada a la expresión de los genes E6 y E7. Tradicionalmente, se asocia la presencia de genotipos 16 y 18 con alto riesgo de desarrollo neoplásico⁴. La asignación de riesgo del resto de los tipos de HPV se realiza en base a criterios filogenéticos y/o epidemiológicos. Así, los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 y 82, se clasifican de alto riesgo en base a ambos criterios de clasificación⁵. Con respecto al tipo HPV 67, que es clasificado por algunos autores de alto riesgo, desde el punto de vista filogenético⁶, se ha aislado una línea celular de cáncer cervical que presenta secuencias integradas de este tipo de HPV⁷. Asimismo, los tipos 26, 53 y 66, clasificados también de alto riesgo por criterios filogenéticos, son ahora considerados probablemente carcinogénicos en base a criterios epidemiológicos (ver Muñoz *et al.*). Finalmente, los tipos HPV 70 y 73 son de clasificación variable dependiendo de los criterios aplicados (ver Muñoz *et al.*).

Actualmente, el HPV no puede ser cultivado *In vitro*, ni existen técnicas inmunológicas para su detección. Las técnicas tradicionales para detección indirecta de HPV incluyen examen físico para observar cambios

¹ El uso de soluciones tipo PreservCyt® pueden causar caídas en el rendimiento de las reacciones de amplificación.

² Parkin *et al.*, 1999. CA Cancer J Clin, 49: 33-64.

³ Schwartz *et al.*, 2001. J Clin Oncol, 19: 1906-15.

⁴ Jacobs *et al.*, 1995. J Clin Microbiol, 33: 901-5.

⁵ Muñoz *et al.*, 2003. New Engl J Med, 348: 518-27.

⁶ Chan *et al.*, 1995. J Virol, 69: 3074-83.

⁷ Koopman *et al.*, 1999. Cancer Res, 59: 5615-24.

celulares asociados con la replicación viral, seguidos de tinción de Papanicolau. Alternativamente, se pueden llevar a cabo hibridaciones sobre biopsias para detectar la presencia del ADN viral.

El ADN viral, en contraste con los viriones completos, está presente en todas las capas epiteliales. El hecho de que la presencia de genotipos de HPV oncogénicos esté directamente relacionada con el cáncer de cervix hace que el diagnóstico temprano y fiable sea fundamental para una gestión correcta del paciente.

La prueba BIOPAP Kit es una prueba de amplificación de ácido nucleico *in vitro* para la detección cualitativa del ADN del HPV, así como la diferenciación entre genotipos oncogénicos y genotipos genéricos, el Kit ha sido desarrollado para examinar muestras de cervix.

PRINCIPIOS DEL ENSAYO

El BIOPAP Kit es una prueba para uso exclusivo en investigación, de determinación cualitativa, que utiliza una técnica de amplificación del ADN para la detección directa del ADN en tiempo final mediante tinción con bromuro de etidio y electroforesis en geles de agarosa. El ADN viral que está presente en muestras positivas es amplificado específicamente mediante el uso de *primers* específicos, que hibridan con zonas determinadas del genoma del virus.

El kit consiste en una reacción de amplificación múltiple, que utiliza dos parejas de *primers*. Una pareja de *primers* (Pareja 1 – GEN1 y GEN2) hibrida con secuencias genéricas a todos los genotipos de HPV testados (genes L1 y L2), y por tanto indica la presencia de HPV. La segunda pareja de *primers* (Pareja 2 – ONC1 y ONC2), hibrida con secuencias específicas de los genotipos oncogénicos de HPV (genes E6 y E7).

La primera pareja de *primers* rinde una banda de aproximadamente 450 bp, mientras que la Pareja 2 da un producto de aproximadamente 250 bp. Para su observación, ha de realizarse un paso de electroforesis en geles de agarosa, seguida de tinción con bromuro de etidio.

El proceso de detección utilizando el BIOPAP Kit consta de tres pasos principales: preparación de la muestra y amplificación del ADN viral, detección mediante electroforesis de agarosa y tinción con bromuro de etidio.

Preparación de la muestra

La prueba BIOPAP Kit se usa con ADN purificado a partir de muestras de cervix.

AVISO IMPORTANTE

Para la purificación del ADN viral, se recomienda el uso del SPEEDTOOLS TISSUE DNA EXTRACTION KIT (Ref. 21.135, 21.136, 21.137). La utilización de otros métodos es posible. Sin embargo, el usuario ha de confirmar que el ADN purificado mediante otros métodos es utilizable con el BIOPAP Kit (concentración 50-100 ng / µl, A_{260/280}=1.8 – 2.0, ausencia de inhibidores que puedan afectar al resultado de la reacción de amplificación, etc.). Se recomienda comprobar la calidad e idoneidad del ADN purificado para reacciones de amplificación, por ejemplo, realizando amplificaciones control en paralelo. Para más información, puede contactar con nuestro Dpto. Técnico (info@biotools.eu).

Amplificación y detección

Selección de secuencias objetivo

La selección de las secuencias de HPV objetivo se ha basado en el estudio de regiones altamente conservadas dentro de los genotipos de HPV testados, para la Pareja 1 (GEN1 y GEN2), y de regiones mínimamente variables dentro de los genotipos oncogénicos de HPV testados, para la Pareja 2 (ONC1 y ONC2). Las regiones seleccionadas han demostrado tener una conservación máxima entre los diferentes genotipos testados. La Pareja 1 (GEN1 y GEN2) define una secuencia de 400 pares de bases dentro de la secuencia de HPVs, mientras que la Pareja 2 (ONC1 y ONC2) define una secuencia de 250 pares de bases dentro de la secuencia de HPVs oncogénicos.

Amplificación

La reacción de amplificación de ADN se realiza con la enzima recombinante termoestable polimerasa de ADN de *Thermus*. En presencia de magnesio, y con las condiciones salinas y de fuerza iónica adecuadas, esta enzima exhibe actividad de polimerización de ADN a partir de un *primer*, usando como molde una molécula de ADN.

El ADN purificado de la muestra a analizar es añadido a la mezcla de reacción en el tubo de amplificación correspondiente, donde tiene lugar la amplificación. El tubo de amplificación contiene todos los reactivos necesarios para llevar a cabo esta reacción, y por tanto sólo es necesario añadir el ADN purificado, así como agua bidestilada estéril para llevar a cabo la reacción. La mezcla de reacción, que ya contiene el ADN, es incubada a diferentes temperaturas, para permitir la hibridación de las Pares de *primers* al ADN de la muestra. Una vez tiene lugar la hibridación de los *primers*, y en presencia de deoxinucleótidos trifosfato, la polimerasa extiende el *primer* formando una cadena complementaria al ADN objetivo. La repetición cíclica de este proceso da lugar a una amplificación exponencial de las secuencias específicas del ADN inicialmente presente en las muestras limitadas por cada Pareja.

Detección

La detección de los productos amplificados se realiza mediante electroforesis en agarosa y posterior tinción con bromuro de etidio.

AVISO IMPORTANTE

El bromuro de etidio es un agente intercalante altamente mutagénico. Recomendamos el uso de guantes y las máximas precauciones a la hora de manejarlo.

La presencia de HPV se determina mediante la aparición de una banda de aproximadamente 450 bp. Si hay genotipos oncogénicos de HPV en la muestra analizada, además de la banda de aproximadamente 450 bp, aparecerá una banda de aproximadamente 250 bp.

REACTIVOS

El BIOPAP Kit contiene los reactivos de amplificación en formato líquido en la cantidad necesaria para poder realizar 96 reacciones de amplificación (Ref. 90.013). Descongele y manipule los reactivos en hielo. Evite congelar y descongelar los reactivos repetidamente. Para uso frecuente distribuya el contenido de los viales en alícuotas.

Los reactivos se encuentran en formato líquido y deben **almacenarse a -15±8°C**.

- **HPV Mixture:** Dos viales: 2 x 1980 µl
Solución Tris-HCl, contiene: <10 % glicerol, KCl, <0,001 % dATP, dCTP, dGTP, dTTP y primers. HPV reaction mixture incluye todos los reactivos de amplificación para la detección de HPVs y diferenciación entre genotipos oncogénicos/genéricos, excepto MgCl₂ y DNA polimerasa, en las proporciones adecuadas.
- **50 mM MgCl₂ solution** Vial: 1.8 ml
Mezclar bien antes de su uso.
- **Biotoools DNA polymerase (1 U/µl):** Vial: 105 µl
Añadir a las mezclas de reacción justo antes de introducir las en el termociclador.
- **Positive Control:** Vial: 300 µl
El control positivo contiene secuencias genéricas (2x 10⁶ copias/µl) y oncogénicas (10⁶ copias/µl) de Papilomavirus en una solución Tris-HCl EDTA. El control positivo incluido en el kit no es infeccioso y puede ser utilizado como control intra-tubo.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS**AVISO IMPORTANTE**

Para todos los equipos, el mantenimiento y calibración regular es necesario. Siga las instrucciones del fabricante, y revise los parámetros de funcionamiento de forma regular, especialmente para termocicladores y pipetas. La revisión y calibración continuada de los equipos facilita su funcionamiento correcto, y ayuda a detectar problemas que podrían dar lugar a un resultado incorrecto del análisis.

Área de pre-amplificación

- Instrumentos, reactivos y material fungible requeridos por el método de purificación de ADN que vaya a ser utilizado (ver instrucciones del fabricante)
- Cronómetro
- Pipetas⁸ (capacidad 10, 20 y 200 µl) con puntas con filtro para aerosol o desplazamiento positivo, sin RNasa⁹
- Guantes de examen desechables, sin polvo
- Agua calidad bidestilada estéril
- Tubos de polipropileno con cierre de rosca, capacidad para 1,5 ml, no siliconizados, cónicos, estériles, libres de RNasa. Se recomienda el uso de tubos con cierre de rosca, para evitar la contaminación potencial de muestras y controles
- Gradillas para tubos de 1,5 ml
- Contenedores para material desechable potencialmente infeccioso
- Papel de filtro para superficie de trabajo desechable, papel de limpieza para derrames accidentales
- Termi-DNA-Tor¹⁰ o sustancia equivalente para eliminar ADN de superficies de trabajo

Área de amplificación

- Termociclador en tiempo final Eppendorf MasterCycler™ Personal, MJ Research MiniCycler™ o Applied Biosystems GeneAmp™ 2700. El uso de este kit en otros equipos no ha sido testado. Para más información, contacte con nuestro Dpto. Técnico (info@biotools.eu).
- Cabina de flujo laminar
- Gradillas para tubos de 0,2 ml
- Viales de 0,2 ml de pared fina
- Agua calidad bidestilada estéril
- Pipetas (capacidad 2, 10, 20 y 200 µl) con puntas con filtro para aerosol o desplazamiento positivo, sin RNasa
- Guantes de examen desechables, sin polvo
- Contenedores para material desechable potencialmente infeccioso
- Papel de filtro para superficie de trabajo desechable, papel de limpieza para derrames accidentales
- Termi-DNA-Tor (Ref. 22.001, 22.002) o equivalente

Área de post-amplificación

- Cubetas y fuentes de electroforesis
- Sistema de fotografía o fotodocumentación
- Transiluminador con luz UV
- Bromuro de etidio
- Agarosa de baja EEO (Ref. 20.011) o equivalente
- TAE o TBE
- Marcador de DNA de 150 a 700 bp mínimo (Ref. 31.006) o equivalente
- Buffer de carga de electroforesis
- Pipetas (capacidad 10 y 20 µl) con puntas con o sin filtro
- Guantes de examen desechables
- Mascarilla / gafas protectoras UV
- Microondas

⁸ La precisión de las pipetas debe estar dentro del 3 % del volumen indicado. Si es necesario, calibrar y revisar de forma regular, según las instrucciones del fabricante. Se recomienda el uso de puntas con filtro sin RNasa para aerosol y desplazamiento positivo, con el fin de evitar contaminaciones cruzadas de muestras y amplicones.

⁹ Se recomienda el uso de juegos de pipetas diferentes para cada paso de la reacción (pre-amplificación, amplificación, post-amplificación), con el fin de evitar contaminaciones que podrían dar lugar a falsos positivos.

¹⁰ Disponible en el catálogo de BIOTOOLS (Ref. 40.201).

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES DE USO

A continuación, se citan una serie de advertencias y precauciones de uso. Para una información más completa, recomendamos leer la Hoja de Seguridad (MSDS), disponible en nuestra página Web (www.biotoools.eu/msds.htm), o mediante petición a nuestro Dpto. Técnico (info@biotoools.eu).

- A. Producto para uso exclusivo en investigación. Este producto no puede ser utilizado para diagnóstico, terapia u otros usos no específicamente contemplados.
- B. Esta prueba debe usarse con muestras de cérvix recogidas y conservadas según indica el apartado correspondiente. La eficacia del método en otro tipo de muestras no ha sido testada.
- C. El kit detecta los siguientes genotipos: 6, 11, 13, 16, 18, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68 y 69. La detección de otros genotipos (incluso los que puedan ser considerados como oncogénicos ahora o en el futuro) no ha sido ensayada. El kit únicamente detecta los genotipos indicados, y clasifica como HPV genéricos (6, 11, 13, 16, 18, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68 y 69), y genotipos HPV oncogénicos (16, 18, 31, 33, 35, 52, 58 y 67). La clasificación se basa en el conocimiento actual de los genotipos de HPV, lo que no descarta que genotipos considerados como genéricos puedan considerarse como oncogénicos ahora o en el futuro, o según el caso clínico de que se trate. Los genotipos oncogénicos indicados son los detectados por el kit, lo que no descarta que otros genotipos no detectados por el kit sean o puedan ser oncogénicos.
- D. Maneje todas las muestras y materiales desechados como infecciosos o potencialmente infecciosos.
- E. Utilice guantes de examen desechables libres de polvo mientras maneje reactivos o muestras, así como bata de laboratorio. Lave sus manos concienzudamente después de haber llevado a cabo el test.
- F. Abrir y cerrar los tubos de los reactivos con cuidado. Respetar las condiciones de temperatura y exposición a la luz indicadas en el apartado correspondiente. Tras el uso, cerrar bien los materiales contenidos en el kit, cuando proceda, y almacenarlos a las temperaturas indicadas.
- G. Todos los materiales utilizados en este ensayo, incluyendo reactivos y muestras, han de ser desechados de forma que se inactiven los posibles agentes infecciosos
 - 1. **Sólidos:** autoclave
 - 2. **Líquidos:** añadir hipoclorito sódico¹¹ a una concentración final de 1 %, e incube 30 minutos a temperatura ambiente antes de desechar el material
- H. Derrames: lavar los posibles derrames accidentales con una solución de hipoclorito sódico al 5 %. Cubrir la superficie con material absorbente, saturado con una solución de hipoclorito sódico al 5 %. Dejar durante al menos 10 minutos. Para evitar exposición a humos, se puede utilizar una cubierta de plástico o cristal. Todos los materiales utilizados para limpiar derrames deben tratarse como material infeccioso o potencialmente infeccioso
- I. No utilizar el producto más allá de la fecha preferente de uso.
- J. Los componentes del kit han sido testados como una unidad. **No intercambie componentes** de otros kits, o componentes de diferentes lotes.
- K. Los ácidos nucleicos son muy sensibles a degradación por nucleasas. Las nucleasas están presentes en la piel humana o superficies que han estado en contacto con humanos. Lave con Termi-DNA-Tor y cubra las superficies de trabajo con papel adecuado. A lo largo de todo el proceso utilice guantes de examen libres de polvo y desechables.
- L. Debe extremarse el cuidado a la hora de alicuotear los diferentes volúmenes en cada paso de la reacción. Mezcle bien tras la adición de cada reactivo, salvo que se indique expresamente lo contrario. Lea las instrucciones de uso de las pipetas para un uso adecuado.
- M. No pipetear con la boca.
- N. El material de acondicionamiento del kit es resistente en las condiciones de almacenamiento indicadas. El almacenamiento en condiciones diferentes a las indicadas puede conllevar la rotura del material de acondicionamiento, y la posible contaminación del kit.
- O. El material de plástico incluido en el kit es resistente en las condiciones normales de uso. El uso del material plástico en condiciones extremas puede conllevar su rotura, y por tanto, la inutilización del kit.
- P. Los reactivos del kit, una vez utilizados, han de ser descartados. No se pueden reusar reactivos ya utilizados para el análisis de muestras clínicas, ya que ello podría conllevar resultados falsos positivos o falsos negativos.

¹¹ La lejía doméstica líquida comercial contiene, normalmente, hipoclorito sódico a una concentración aproximada del 5%. Puede utilizarse lejía doméstica, realizando los cálculos pertinentes para lograr la concentración indicada.

- Q. Las tareas de laboratorio deben realizarse de forma unidireccional, desde la zona de pre-amplificación hacia la zona de amplificación. Deben utilizarse equipos específicos para cada zona de trabajo, con el fin de evitar posibles contaminaciones cruzadas. Los equipos utilizados para amplificación deben permanecer en esta zona en todo momento.

INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

1. Tras la recepción, almacene los diferentes reactivos del kit a las temperaturas indicadas (a $-15\pm 8^{\circ}\text{C}$). Utilice congeladores no *frost-free*. Asimismo, para uso frecuente (superior a 1 vez por semana), alicuotee el contenido de los viales en diferentes tubos, con el fin de evitar ciclos de congelación / descongelación repetidos.

2. No utilice el kit después de su fecha preferente de uso. El kit cerrado es estable hasta la fecha indicada, si se siguen correctamente las instrucciones de almacenamiento. No mezcle reactivos de otros kits y/o de otros lotes. Si quedan cantidades residuales de reactivo, deben desecharse.

RECOLECCIÓN, TRANSPORTE, ALMACENAMIENTO Y COLECCIÓN DE MUESTRAS

Los tipos de muestras de cérvix recomendados para su uso con el BIOPAP Kit se indican al principio de este Manual de Uso. Las muestras tomadas con otros métodos o transportadas con otras especificaciones no han sido testadas para su uso con este kit. Las muestras de cérvix han de ser recogidas antes de aplicar ácido acético o yodo si se realiza examen colposcópico.

Cepillos cervicales y torundas

Las muestras pueden ser almacenadas hasta 3 días a temperatura ambiente (25°C máximo) y enviadas sin refrigeración al laboratorio de análisis. En caso de almacenamientos prolongados, recomendamos mantenerlas a $-15\pm 8^{\circ}\text{C}$. En el laboratorio, deben ser almacenadas a $2 - 8^{\circ}\text{C}$ si el análisis se va a realizar en un plazo máximo de 48 horas. Si el análisis va a realizarse en un periodo superior, almacene las muestras a $-15\pm 8^{\circ}\text{C}$. Las muestras han de mantenerse alejadas de fuentes de calor intenso y libres de humedad ambiental. Debe evitarse el crecimiento bacteriano y mantener la integridad del ADN.

Biopsias cervicales

Deben utilizarse biopsias frescas de hasta 5 mm. La biopsia ha de colocarse inmediatamente en un medio conservante y almacenada a $-15\pm 8^{\circ}\text{C}$. Las biopsias pueden ser transportadas mediante transporte urgente (24 horas máximo) a una temperatura máxima de 25°C , y almacenadas a temperaturas inferiores a -18°C en el laboratorio de análisis hasta la realización del test. No deben usarse biopsias de diámetro menor a 2 mm.

Para evitar accidentes o aperturas accidentales del contenedor de muestras, se recomienda sellar el tapón con Parafilm® o equivalente antes de congelar.

El transporte de muestras ha de cumplir las legislaciones y normativas locales, regionales, nacionales e internacionales para el transporte de agentes etiológicos.

PROTOCOLO DE USO

AMPLIFICACIÓN ADN

AVISO IMPORTANTE

Descongele todos los reactivos en hielo. Mantener en hielo mientras dure su manipulación.

La amplificación debe iniciarse dentro de los 10 minutos posteriores de añadir las muestras y controles a la mezcla de amplificación.

Compruebe el funcionamiento del termociclador de forma regular. La no calibración o calibración deficiente del instrumento puede conllevar la aparición de resultados inexactos.

1.- El volumen final de la reacción es de $50\ \mu\text{l}$. Determine el volumen adecuado de **HPV Mixture**, **MgCl₂**, **Biotoools DNA Polymerase** y **Positive Control** necesarios para el análisis de las muestras y los controles. Se recomienda incluir un (1) Control Positivo y un (1) Control Negativo en cada ronda de análisis (lo que habrá de ser tenido en cuenta a la hora de calcular el volumen total necesario para llevar a cabo todas las reacciones).

2.- Mezclar el volumen necesario de **HPV Mixture**, **MgCl₂** y **Biotools DNA Polymerase** según el número de reacciones a llevar a cabo en un tubo de 1.5 ml. **Llevar a cabo este proceso en la campana de flujo laminar.** Mantenga la mezcla de reacción (mezcla de reacción = HPV Mixture + MgCl₂ + Biotools DNA Polymerase) en hielo:

Reactivo	Para 3 reacciones	Para 10 reacciones	Para n reacciones
HPV Reaction Mixture	112,5 µl	375 µl	37,5 * n µl
50 mM MgCl ₂ Solution	4,5 µl	15 µl	1,5 * n µl
Biotools DNA Polymerase (1U/µl)	3 µl	10 µl	1 * n µl

3.- Alicuotear 40 µl de mezcla de reacción en cada tubo de reacción de amplificación, **en la campana de flujo laminar.**

4.- Sacar los tubos de la campana de flujo laminar. Añadir 50-100 ng de ADN procedente de las muestras purificadas y/o controles a cada tubo de reacción de amplificación. Completar hasta 50 µl de volumen final con agua bidestilada estéril.

AVISO IMPORTANTE

Para el control positivo utilice 5 µl del vial Positive Control. Para Controles Negativos utilice 5 µl de agua bidestilada estéril.

Las muestras clínicas, dependiendo de su naturaleza y niveles de viremia, pueden tener diferentes concentraciones de ADN, y por tanto la cantidad de molde a añadir a la reacción se expresa en ng, en lugar de indicar el volumen de muestra. La cantidad y pureza del molde debe ser calculada, p.ej. midiendo los valores de A_{260/280}.

5.- Cerrar los tubos de reacción de amplificación. Colocar los viales en el termociclador. Almacenar el remanente de todos los reactivos a -15±8°C.

Llevar a cabo la reacción de amplificación utilizando el siguiente programa:

94 °C	5 min	} 35 ciclos
94 °C	30 seg	
55 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

AVISO IMPORTANTE

Este protocolo ha sido adaptado para equipos de amplificación Eppendorf, MJ Research y Applied Biosystems GeneAmp™. Para otros termocicladores, puede ser necesario optimizar los parámetros de la reacción. Para cualquier duda en este aspecto, consulte con nuestro Dpto. Técnico (info@biotools.eu).

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El análisis de los productos de amplificación se lleva a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa de baja EEO (por ejemplo, MB Agarosa, Ref. 20.011). La visualización de las bandas de amplificación es mejor con geles al 1.5 – 2 % utilizando como buffer TAE 1X o TBE 0.5X. Se recomienda añadir el bromuro de etidio dentro de la agarosa para una mejor visualización y resolución.

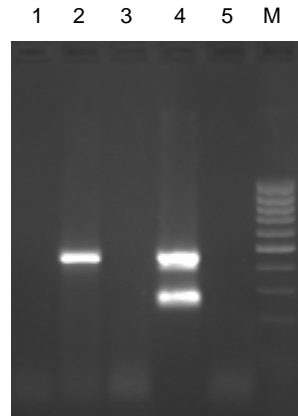
AVISO IMPORTANTE

El bromuro de etidio es un agente intercalante altamente mutagénico. Recomendamos el uso de guantes y las máximas precauciones a la hora de manejarlo.

Las muestras que contengan secuencias genéricas de HPV rendirán una banda de aproximadamente 450 bp, mientras que las muestras que contengan secuencias correspondientes a genotipos oncogénicos de HPV rinden además de la banda anterior una banda adicional de aproximadamente 250 bp (véase la

Figura 1). En algunos casos, puede aparecer únicamente la banda de 250 bp, sin que aparezca la banda de 450 bp. Esto no interfiere en la validez del resultado. En cualquier caso, si esto ocurre, bajar la temperatura de anillamiento a 47 °C para que aparezca la banda de 450 bp.

Figure 1: *Detección de HPV con BIOPAP Kit. Carril 1 y Carril 3: muestras de pacientes sanos; Carril 2: paciente infectado con un genotipo de HPV genérico; Carril 4: paciente infectado con un genotipo de HPV oncogénico; Carril 5: control negativo; M: 100 bp Ladder (Ref. 31.006)*



CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda que se lleve a cabo un (1) Control Positivo y un (1) Control Negativo cada vez que se realice un análisis. Al igual que con otras técnicas de laboratorio nuevas, los usuarios noveles deberían considerar llevar a cabo controles adicionales (tanto positivos como negativos) hasta lograr un grado de confiabilidad alto.

Los viales de amplificación que contengan el control positivo deben dar dos bandas de amplificación (450 bp y 250 bp). Los viales que contengan el control negativo (agua bidestilada estéril) deben dar ausencia de bandas. Cualquier análisis que no rinda cualquiera de estos resultados ha de ser completamente invalidado y descartado. Es necesario repetir el proceso desde su inicio, incluyendo la purificación de ADN, procesando otra alícuota de la muestra original. Un fallo del instrumento durante una prueba, indicado por mensajes de error, también constituye una prueba no válida. Repita todo el procedimiento para cada muestra, a partir de la amplificación.

En el caso de que el laboratorio requiera un control externo, éste debe contener un número definido de copias de la secuencia objetivo para el HPV, y el nivel de este control debe ser un múltiplo del valor límite del sistema de prueba.

PRECAUCIONES

1. Las tareas de laboratorio han de llevarse a cabo de modo unidireccional, desde la zona de pre-amplificación a la zona de amplificación. Las actividades de pre-amplificación deben iniciarse con la preparación del reactivo y proceder a la preparación de la muestra. Los materiales y equipos deben estar dedicados a cada actividad de pre-amplificación y no usarse para otras actividades ni transferirse de un área a otra. En cada área deben usarse guantes que deben cambiarse antes de dejar el área. El equipo y los materiales usados para la preparación de reactivos no deben usarse para actividades de preparación de la muestra ni para pipetear o procesar ADN amplificado u otras fuentes de ADN objetivo.
2. Como es el caso con cualquier procedimiento analítico, es indispensable utilizar una buena técnica de laboratorio para obtener un rendimiento apropiado de esta prueba. Debido a la gran sensibilidad analítica de esta prueba, se debe proceder con extrema cautela a fin de conservar la pureza de todos los reactivos del kit o de las mezclas de amplificación. Todos los reactivos deben ser vigilados estrechamente para verificar su pureza. Deseche todos los reactivos sospechosos.

LIMITACIONES

1. Producto para uso exclusivo en investigación.
2. Deben seguirse las instrucciones fielmente con el fin de obtener resultados correctos. En caso de duda, consulte con nuestro Dpto. Técnico (info@biotools.eu).
3. Esta prueba ha sido validada únicamente para usar con los reactivos incluidos en el kit. El uso de otros métodos de amplificación, o el uso de aparatos e instrumentos que no cumplan las especificaciones indicadas puede dar resultados incorrectos. El usuario es responsable de validar las modificaciones que se hagan a la prueba propuesta, en cualquiera de los parámetros indicados.
4. Esta prueba ha sido validada con muestras recogidas y transportadas según las indicaciones del apartado "Recogida de muestras". Cualquier modificación no ha sido validada, y por tanto, los resultados obtenidos pueden no ser correctos.
5. La detección del ADN de HPV depende del número de partículas virales presentes en la muestra y puede ser afectada por los métodos de recolección de la muestra, por factores asociados con el paciente (por ejemplo, edad, presencia de síntomas) o por la etapa de la infección y el tamaño de la muestra.
6. Pueden obtenerse resultados negativos falsos debido a inhibición de la polimerasa. Se recomienda llevar a cabo controles que discriminen entre inhibición y un resultado negativo.
7. La contaminación cruzada entre muestras y con ADN exógeno sólo puede ser evitada mediante las buenas prácticas de laboratorio. Deben seguirse las indicaciones de este folleto de forma fiel.
8. El uso de este producto está limitado únicamente a personal profesional cualificado en el manejo de técnicas de purificación de ADN y amplificación de ADN.
9. Es importante pipetear las cantidades exactas indicadas en las instrucciones de uso, y mezclar bien tras cada adición de reactivo. Compruebe de forma regular el funcionamiento de sus pipetas.

GARANTÍA

Los productos están garantizados para estar conformes con la cantidad y contenido indicado en el vial y etiquetas exteriores durante su periodo de vida media. La obligación de BIOTOOLS y los derechos del comprador bajo esta garantía están limitados bien al reemplazo por parte de BIOTOOLS de cualquier producto que sea deficiente en fabricación, y que deberá ser retornado a BIOTOOLS, portes pagados, o a opción de BIOTOOLS, devolución del precio de adquisición.

Las reclamaciones por mercancía dañada durante el transporte han de ser dirigidas al transportista.

Producto para uso exclusivo en investigación. Este producto debe ser utilizado únicamente por profesionales cualificados. Es la responsabilidad del usuario asegurarse que un producto determinado es adecuado para una aplicación determinada. Cualquier producto que no cumpla con las especificaciones indicadas en la hoja informativa de producto será reemplazado. Esta garantía limita nuestra responsabilidad al reemplazo del producto. Ninguna otra garantía, de ningún tipo, expresa o implícita, incluyendo, sin limitación, garantías implícitas de capacidad de comercialización o adecuación para un propósito determinado, son dadas por BIOTOOLS. BIOTOOLS no tendrá responsabilidad sobre ningún daño directo, indirecto, consecuencia o incidental resultante del uso, mal uso, los resultados del uso o la incapacidad de uso de ningún producto.

Fabricado por:

BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A. han sido evaluados y certificados en cuanto al cumplimiento de los requisitos de ISO 9001:2008 para las siguientes actividades: investigación y desarrollo de productos de biotecnología, fabricación de productos de biotecnología y fabricación de productos para diagnóstico in vitro (IVDs). Valle de Tobalina – 52 – Nave 39, 28021 Madrid – España

BIOTOOLS® es marca registrada de BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A.

BIOPAP™ es marca comercial de BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A.

Termi-DNA-Tor™ es marca comercial de BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A.

Bloodclean™ es marca comercial de BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A.

SPEEDTOOLS TISSUE DNA EXTRACTION KIT™ es marca comercial de BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A.

Cervical Sampler™ es marca comercial de Digene Corporation Inc.

PreservCyt® es marca registrada de Cytyc Corporation Inc.

Parafilm® es marca registrada de Pechiney Plastic Packaging, Inc.

MasterCycler™ es marca comercial de Eppendorf GmbH

MiniCycler™ es marca comercial de MJ Research Inc.

GeneAmp™ es marca comercial de Applied Biosystems Inc.