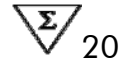


Manual de uso de la prueba *digene*[®] HPV Genotyping RH, kit de detección



Versión 1

IVD

Para la detección de 18 genotipos de alto riesgo del virus del papiloma humano (VPH) mediante hibridación inversa



REF

613413



QIAGEN GmbH, QIAGEN Straße 1
D-40724, Hilden

R2

MAT

1057455ES



QIAGEN: Tecnologías de tratamiento de muestras y ensayos de biología molecular

QIAGEN es el proveedor líder de tecnologías innovadoras para el tratamiento de muestras y ensayos de biología molecular, que permite el aislamiento y la detección del contenido de cualquier muestra biológica. Nuestros productos y servicios de vanguardia y máxima calidad garantizan el éxito, desde la muestra hasta el resultado.

QIAGEN sienta las bases de excelencia en los siguientes campos:






- Purificación de ADN, ARN y proteínas
- Ensayos con ácidos nucleicos y proteínas
- Investigación con microARN y ARNi
- Automatización de tecnologías de tratamiento de muestras y ensayos de biología molecular

Nuestra misión es ayudarlo a superar sus retos y a alcanzar el éxito. Para obtener más información, visite www.qiagen.com.

Contenido

Contenido del kit	4
Símbolos	5
Almacenamiento	6
Almacenamiento	6
Uso previsto	6
Limitaciones de uso del producto	6
Control de calidad	6
Asistencia técnica	6
Información sobre seguridad	7
Introducción	9
Principio	9
Características de rendimiento	12
Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario	19
Notas importantes	20
Preparación de los reactivos para el procedimiento manual	20
Preparación de los reactivos para el procedimiento automatizado	21
Protocolos	
■ 1: Detección del ADN del VPH amplificado utilizando un procedimiento manual: hibridación	24
■ 2: Detección del ADN del VPH amplificado utilizando un procedimiento manual: lavado riguroso	27
■ 3: Detección del ADN del VPH amplificado utilizando un procedimiento manual: revelado del color	29
■ 4: Detección del ADN del VPH amplificado utilizando un procedimiento automatizado	31
Guía de resolución de problemas	36
Apéndice A: Interpretación de los resultados	41
Apéndice B: Control de la contaminación en la PCR	43
Bibliografía	44
Información para pedidos	48

Contenido del kit

Prueba <i>digene</i> HPV Genotyping RH, kit de detección		(20)
Referencia		613413
Número de reacciones		20
	Tiras de VPH de alto riesgo	20
DS	Solución de desnaturalización  	250 µl
HS	Solución de hibridación	85 ml
SW	Solución de lavado riguroso	2 x 105 ml
C	Conjugado 100x  	550 µl
CD	Diluyente de conjugado	55 ml
S	Sustrato 100x	550 µl
SB	Tampón de sustrato	110 ml
RS	Solución de lavado 5x	75 ml
3B	Tampón 3B	220 µl
	Armazones de cubetas de incubación	3
	Hojas de registro de datos	2
	Manual de uso 	1

Símbolos

	Contenido suficiente para <N> ensayos
	Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Conformidad europea
	Referencia
	Fabricante
	Código de lote
	Número de material
	Nota importante
	Limitación de temperatura
	Fecha de caducidad
	Consultar instrucciones de uso

Almacenamiento

Todos los reactivos de la prueba *digene* HPV Genotyping RH, kit de detección deben almacenarse a 2–8 °C inmediatamente tras su recepción. Asegúrese de almacenar el kit lejos de cualquier fuente de ADN contaminante, especialmente los productos de ADN amplificado. Todos los reactivos son estables hasta su fecha de caducidad bajo estas condiciones. Las tiras de VPH de alto riesgo son estables hasta su fecha de caducidad cuando se almacenan desecadas a 2–8 °C.

Uso previsto

La prueba *digene* HPV Genotyping RH, kit de detección es un ensayo de hibridación inversa *in vitro* que utiliza amplímeros GP5+/6+ para la identificación cualitativa de los tipos de VPH de alto riesgo siguientes: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82. La utilización de esta prueba está indicada como prueba refleja para mujeres en las que la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA haya dado un resultado positivo.

Limitaciones de uso del producto

Esta prueba ha sido validada para el uso con muestras recogidas en la solución Specimen Transport Media (STM) y en la solución PreservCyt[®]. El análisis de otros tipos de muestras puede dar resultados falsos negativos o falsos positivos. Este producto debe ser utilizado por personal con formación en técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR). Deben seguirse las recomendaciones relativas al diseño del laboratorio y a los procedimientos con el fin de evitar resultados falsos y la contaminación del ADN. Las incubaciones de la hibridación y del lavado riguroso del procedimiento manual de la prueba deben realizarse a una temperatura exacta de 50 °C para evitar generar resultados falsos positivos o falsos negativos. La temperatura del baño María debe verificarse con un termómetro calibrado.

Control de calidad

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote de la prueba *digene* HPV Genotyping RH, kit de detección se analiza en relación con especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad de los productos.

Asistencia técnica

En QIAGEN nos enorgullecemos de la calidad y disponibilidad de nuestra asistencia técnica. En nuestros departamentos de Servicio Técnico trabajan científicos expertos con amplia experiencia en los aspectos prácticos y teóricos de las tecnologías de preparación de muestras y ensayos de biología molecular

y en el uso de los productos de QIAGEN. Si desea formular cualquier pregunta o si tiene dificultades con el kit *digene* HPV Genotyping RH Test, kit de detección, o con los productos de QIAGEN en general, no dude en ponerse en contacto con nosotros.

Los clientes de QIAGEN son una importante fuente de información sobre los usos avanzados o especializados de nuestros productos. Esta información es de utilidad para otros científicos además de para los investigadores de QIAGEN. Por este motivo, lo animamos a ponerse en contacto con nosotros si tiene cualquier sugerencia sobre el rendimiento de nuestros productos o sobre nuevas aplicaciones y técnicas.

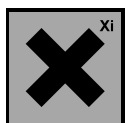
Para recibir asistencia técnica y solicitar más información, visítenos en nuestro Centro de Servicio Técnico (Technical Support Center) en www.qiagen.com/Support o póngase en contacto telefónico con uno de los departamentos de Servicio Técnico de QIAGEN o con los distribuidores locales (consulte la contraportada o visite www.qiagen.com).

Información sobre seguridad

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más información, consulte las fichas de datos de seguridad de los materiales (*material safety data sheets*, MSDS) correspondientes. Dichas fichas están disponibles online en un formato PDF cómodo y compacto en www.qiagen.com/support/MSDS.aspx, donde podrá encontrar, visualizar e imprimir la ficha de datos sobre seguridad correspondiente a cada kit y a cada componente del kit de QIAGEN.

Las siguientes frases sobre los riesgos y la seguridad se aplican a los componentes de la prueba *digene* HPV Genotyping RH, kit de detección.

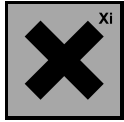
Solución de desnaturalización (DS)



Contiene hidróxido sódico: irritante. Frases de riesgos y de seguridad:* R36/38, S26-36/37/39-45.

Conjugado, 100x (C)

* R36/38: Irrita los ojos y la piel; R43: Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel; S24: Evítese el contacto con la piel; S26: En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico; S36/37/39: Úsenle indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos/la cara; S45: En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstrele la etiqueta).



Contiene ProClin® 300 (5-cloro-2-metil-4-isotiazolina-3-ona, 2-metil-4-isotiazolina-3-ona): irritante. Frases de riesgos y de seguridad:* R43, S24-36/37/39-45.

Información para emergencias disponible las 24 horas

Puede obtenerse información médica de emergencia en inglés, francés y alemán las 24 horas del día en:

Centro de información toxicológica de Maguncia, Alemania

Tel.: +49-6131-19240

Introducción

La prueba *digene* HPV Genotyping RH consta de 2 kits: la prueba *digene* HPV Genotyping RH, kit de amplificación, y la prueba *digene* HPV Genotyping RH, kit de detección. La prueba *digene* HPV Genotyping RH, kit de detección permite realizar una identificación sencilla y fiable de los genotipos de alto riesgo del virus del papiloma humano (VPH) mediante hibridación inversa. Los productos de PCR utilizados en el procedimiento de hibridación inversa se generan a partir de un ADN plantilla mediante amplificación de la secuencia L1 muy conservada utilizando la prueba *digene* HPV Genotyping RH, kit de amplificación.

Principio

La identificación de los genotipos del VPH se basa en un procedimiento de hibridación inversa. Los amplicones biotinilados desnaturalizados que han sido generados mediante la amplificación de parte de la región L1 con el conjunto de cebadores GP5+/6+ se hibridan con sondas oligonucleotídicas específicas, que se inmovilizan en forma de bandas paralelas en tiras de membrana (figura 1). Tras la hibridación y el lavado riguroso, se añade fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina, que se une a cualquier híbrido biotinilado que esté presente. La incubación con el sistema cromógeno BCIP/NBT genera un precipitado morado que permite realizar una interpretación visual de los resultados. Como control interno para detectar la presencia de ADN amplificable tras el aislamiento, se coamplifica con el ADN del VPH en forma de PCR múltiplex un fragmento del gen de la betaglobina humana. La última banda de sonda de la tira contiene una sonda capaz de detectar el amplímero de betaglobina.

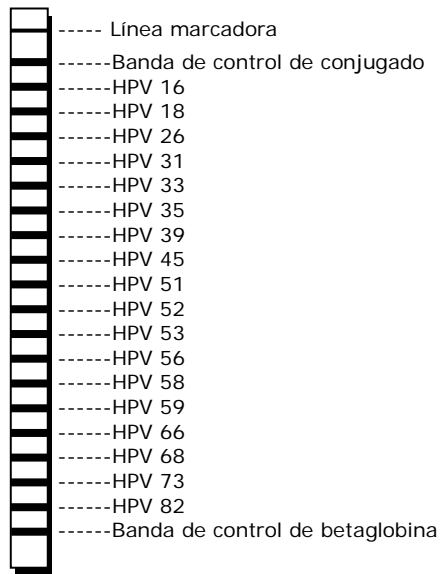
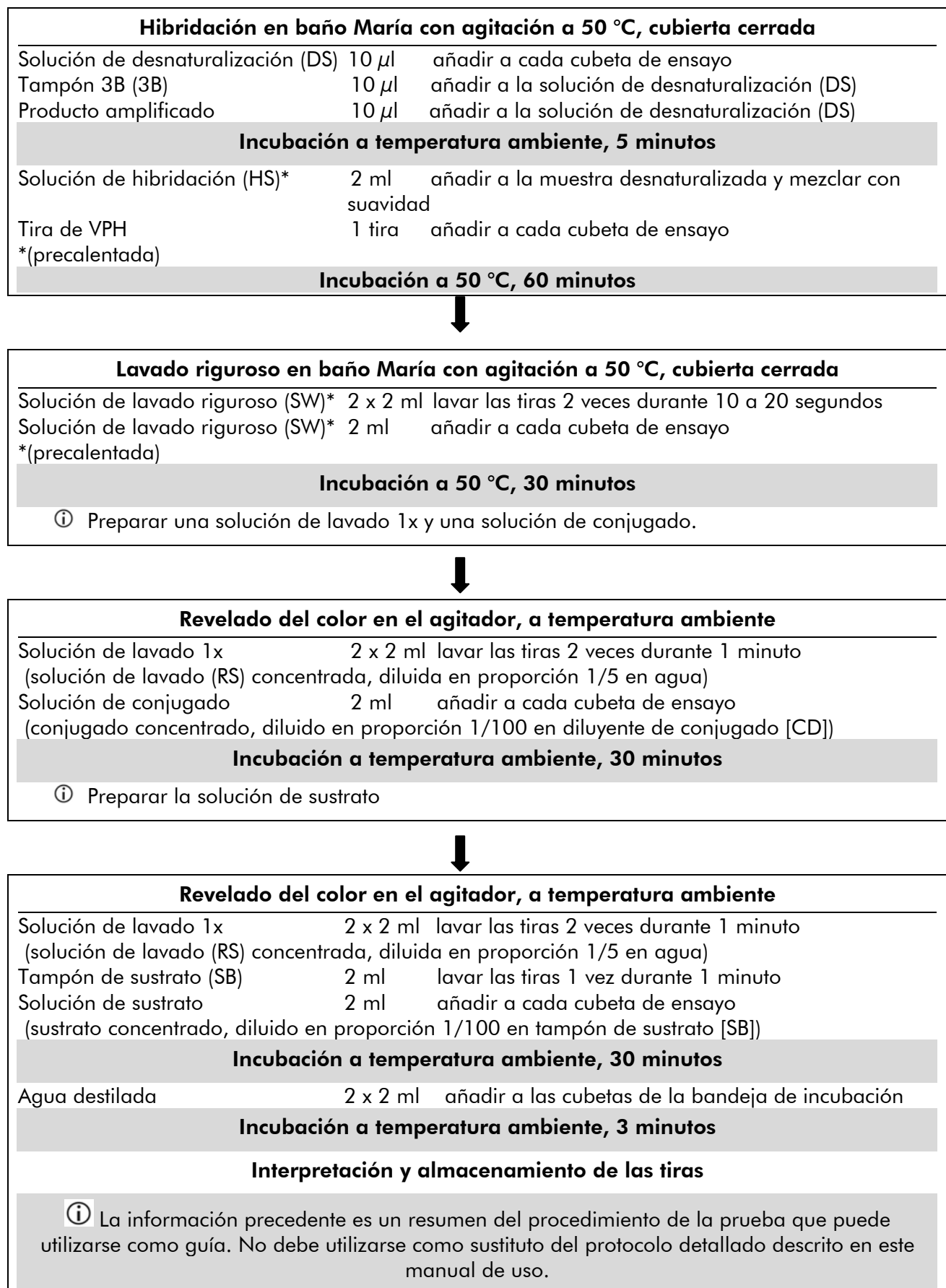


Figura 1. Esquema de la tira de genotipado. Una línea de referencia (**línea marcadora**) situada en la parte superior de la tira proporciona orientación. Se incluyen dos bandas de control (**banda de control de conjugado y banda de control de betaglobina**).

Figura 2. Flujo de trabajo de la prueba *digene* HPV Genotyping RH, kit de detección (manual).



Características de rendimiento

Sensibilidad analítica

Se han llevado a cabo determinaciones formales del límite de detección (*limit of detection*, LOD) para los genotipos VPH 16, VPH 18 y VPH 45. En la tabla 1 se muestra el límite de detección.

Tabla 1. Sensibilidad analítica: LOD (límite de detección) para los genotipos VPH 16, 18 y 45

Genotipo	Concentración LOD (copias/PCR)
VPH 16	4
VPH 18	8
VPH 45	23

Para los 15 tipos restantes, se analizaron los pasos de dilución y se determinó la concentración con la que se obtenía un 100% de resultados positivos. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Sensibilidad: concentración LOD (límite de detección) en función del genotipo

Genotipo	Concentración LOD (copias/PCR)
VPH 26	1000
VPH 31	10
VPH 33	10
VPH 35	10
VPH 39	1000
VPH 51	1000
VPH 52	1000
VPH 53	100 000
VPH 56	10

La tabla continúa en la página siguiente.

Tabla 2. Continuación

Genotipo	Concentración LOD (copias/PCR)
VPH 58	100
VPH 59	100
VPH 66	100
VPH 68a	10 000
VPH 68	100 000
VPH 73	10 000
VPH 82MM4	100 000
VPH 82IS39	10 000

Especificidad analítica práctica

Los amplímeros de los 18 genotipos del VPH y de los 2 subtipos objeto del ensayo (es decir, VPH 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68 (68a), 73, 82MM4 (82IS39)) mostraron un patrón de reacción correcto en la tira, confirmando así la identificación del tipo de VPH correcto. Para determinar si hubo alguna reactividad cruzada se utilizaron cantidades elevadas de amplímero (obtenidas de 10 000 000 de copias de VPH por PCR de los (sub)tipos del VPH 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 61, 66, 67, 68 (y 68a), 69, 71, 72, 73, 81, 82 (MM4 e IS39)). Ninguna de las sondas mostró reacción alguna con un amplímero de un tipo de VPH no objeto del ensayo.

La especificidad de la prueba *digene* HPV Genotyping RH, kit de detección está garantizada por la selección de las sondas, así como por la selección de condiciones de reacción rigurosas. Las sondas se evaluaron para detectar posibles homologías respecto a todas las secuencias publicadas en bancos de genes mediante análisis de comparación de secuencias. Por consiguiente, queda garantizada la detectabilidad de todas las cepas relevantes. Además, se han analizado los microorganismos presentes habitualmente en el área anogenital de la mujer. Ninguno de los patógenos analizados fue reactivo (véase la tabla 3). La presencia de estos microorganismos no reduce la sensibilidad de detección de los genotipos de alto riesgo del VPH.

Tabla 3. Patógenos potencialmente causantes de reactividad cruzada

Patógeno
Acinetobacter anitratus
Acinetobacter lwoffii
Bacteroides fragilis
Escherichia coli (HB101)
Escherichia coli
Klebsiella pneumoniae
Lactobacillus acidophilus
Mobiluncus curtisii
Mobiluncus mulieris

Precisión

Inicialmente se analizó un panel de diez muestras diferentes que contenían plásmidos de los 20 genotipos y subtipos del VPH cubiertos por el ensayo, con una concentración 10 veces por encima del límite de detección estimado, por triplicado, en 3 días diferentes y por 2 técnicos, y una vez con otros 2 números de lote de kit, para un total de 24 puntos de datos por muestra. Todos los resultados de genotipado fueron idénticos.

A continuación, dos técnicos analizaron el ADN purificado de un total de 92 muestras utilizando tres lotes de kits. Los resultados se clasificaron como idénticos (coincidencia genotípica del 100%), compatibles (al menos un genotipo en común) o discordantes (sin coincidencias genotípicas). Entre los dos técnicos, el porcentaje de concordancia en los resultados idénticos/compatibles se situó entre el 98% y el 100%. Al comparar los diferentes lotes de kits que utilizaron ambos técnicos (es decir, al comparar los 6 resultados), el porcentaje de concordancia de los resultados idénticos/compatibles fue del 93%.

Finalmente, dos técnicos (análisis entre técnicos) llevaron a cabo un análisis por duplicado en un segundo centro de análisis (análisis interlaboratorio en una selección de 25 muestras procedentes del panel anteriormente mencionado. De nuevo, los resultados se clasificaron como idénticos (coincidencia genotípica del 100%), compatibles (al menos un genotipo en común) o discordantes (sin coincidencias genotípicas). El técnico 1 mostró una concordancia en los resultados idénticos del 100% en los análisis por duplicado de las 25 muestras.

El técnico 2 obtuvo una concordancia en los resultados idénticos del 93% (23/25 muestras) en las muestras por duplicado, y 2 muestras presentaron resultados de genotipado compatibles.

Entre los dos técnicos, el porcentaje de concordancia en los resultados idénticos fue del 88%, y el porcentaje de concordancia en los resultados compatibles fue del 12%. No se observaron resultados discordantes. Al comparar los diez resultados de genotipado de cada una de las 25 muestras en el panel de análisis interlaboratorio (primer y segundo centro), el porcentaje de concordancia en los resultados idénticos/compatibles fue del 100%, con un 72% de resultados idénticos y un 28% de resultados compatibles. No se observaron resultados discordantes.

En resumen, para evaluar el grado de concordancia entre las mediciones, se analizó mediante muestreo múltiple una serie de muestras artificiales que contenían todos los tipos de VPH cubiertos por el ensayo y 92 muestras clínicas. Cada muestra se analizó en réplicas en días diferentes y el análisis fue realizado por técnicos diferentes. También se analizaron lotes diferentes. Los resultados mostraron un 100% de resultados genotípicos idénticos en las muestras artificiales y más del 95% de resultados idénticos y compatibles para las muestras clínicas.

Exactitud

Se analizaron alícuotas de ADN purificado de un total de 108 muestras consistentes en 50 muestras HC2-positivas recogidas en STM, 50 muestras HC2-positivas recogidas en PC y 8 muestras HC2-negativas recogidas en STM utilizando la prueba *digene* HPV Genotyping RH, kit de detección y el sistema Free University RLB (1).

Los resultados se clasificaron como idénticos (coincidencia genotípica del 100%), compatibles (al menos un genotipo en común) o discordantes (sin coincidencias genotípicas). Las discrepancias (resultados genotípicos discordantes) se resolvieron repitiendo ambos ensayos y, en caso de persistencia de discrepancias, mediante un análisis subsiguiente con un tercer ensayo sensible de genotipado y detección del VPH [SPF10-LiPA₂₅ (versión 1)].

La comparación mostró un 80% de resultados genotípicos idénticos, un 11% de resultados genotípicos compatibles y un 9% de resultados genotípicos discordantes. La repetición de ambos ensayos resolvió 5 de las 10 muestras discrepantes. El análisis subsiguiente con el sistema SPF10-LiPA₂₅ (versión 1) resolvió otras 3 muestras discrepantes, dejando solo dos muestras discrepantes. En la primera de estas muestras discrepantes, se detectó el genotipo VPH 45 mediante la prueba *digene* HPV Genotyping RH, kit de detección, mientras que la transferencia de línea inversa (*reverse line blot*, RLB) fue negativa. En la segunda muestra, se detectó el genotipo VPH 58 con el sistema de RLB, y el

resultado de la prueba *digene* HPV Genotyping RH, kit de detección fue negativo.

En resumen, para evaluar el grado de concordancia, se comparó la prueba *digene* HPV Genotyping RH, kit de detección con el ensayo HPV RLB, que ofrece un valor de referencia aceptado. Se llevó a cabo un análisis paralelo de 108 muestras clínicas, y los resultados se clasificaron como idénticos, compatibles o discordantes. Las muestras discordantes se resolvieron mediante su análisis con el sistema SPF10-LiPA₂₅ (versión 1). Los resultados mostraron un nivel muy bajo de muestras discrepantes (2%) después de la resolución de las muestras discrepantes iniciales. Véase la tabla 4.

Tabla 4. Comparación de la prueba de genotipado del VPH con el ensayo HPV RLB

Análisis de la exactitud	% de muestras clínicas
Idénticas	80
Compatibles	18
Discrepantes	2

Solidez

La capacidad del ensayo para no verse afectado por variaciones deliberadas en parámetros metodológicos relevantes se evaluó de la forma siguiente. Se amplificaron muestras por duplicado de los genotipos del VPH 16, 18, 45, y 52 con concentraciones 10 veces el límite de detección de la PCR con condiciones de PCR de 1,0 °C por encima o de un 1,0 °C por debajo. La detección del VPH mediante la prueba RH no se vio influida en comparación con las condiciones normales de ciclado.

Se evaluaron amplímeros con una concentración próxima al límite de detección del kit de detección de la prueba RH a temperaturas de hibridación más altas para investigar una posible pérdida de las señales. El análisis a la temperatura máxima especificada de 50,5 °C no influyó en el resultado, y el análisis a 51,0 °C (que supera las especificaciones de la prueba) generó unas bandas de sondas reactivas ligeramente más tenues, pero sin pérdida de la señal. Se evaluaron concentraciones elevadas de amplímeros a temperaturas de hibridación más bajas para investigar posibles reacciones cruzadas. El análisis se realizó a 49,5 °C (que es el límite inferior de temperatura indicado para la hibridación) y a 49,0 °C (que está por debajo de las especificaciones); no se observaron reacciones cruzadas. La reducción de todos los tiempos de incubación del procedimiento de RHA en cinco minutos generó unas bandas de sondas reactivas ligeramente más tenues, pero sin pérdida de la señal,

mientras que la prolongación de todos los tiempos de incubación en cinco minutos no tuvo ningún efecto visible.

Sustancias causantes de interferencias

Se evaluó el efecto de la sangre y de otras posibles sustancias causantes de interferencias en la prueba *digene* HPV Genotyping RH, kit de detección. La presencia de las sustancias (recogidas en la tabla 5) no causó resultados falsos positivos.

Además, la presencia de las sustancias no provocó una disminución de la sensibilidad de los virus VPH.

Tabla 5. Sustancias causantes de interferencias

Sustancia
Sangre
Crema hidratante
Anestésico hemorroidal
Polvos de talco
Crema antifúngica
Lubricante vaginal

Evaluación diagnóstica

La prueba *digene* HPV Genotyping RH se comparó con el sistema Free University RLB establecido (1) en un estudio multicéntrico.

A tal fin, se seleccionaron 267 muestras de raspado cervical que habían dado un resultado positivo con la prueba *digene* HC2 High Risk HPV DNA. Las muestras se recogieron en la solución STM y en la solución PreservCyt. El ADN de estas muestras se aisló manualmente con el kit QIAamp® MinElute® Virus Spin o de forma automatizada en el instrumento EZ1 Advanced con el kit EZ1® DSP Virus.

De las 267 muestras, 254 de las muestras positivas con la prueba HC2 también fueron positivas para uno de los 18 tipos de alto riesgo del HPV mediante la prueba *digene* HPV Genotyping RH.

Se compararon los genotipos comunes de los ensayos y se clasificaron los resultados como idénticos (coincidencia genotípica del 100%), compatibles (al menos un genotipo en común) o discordantes (sin coincidencias genotípicas).

El porcentaje de concordancia en los resultados idénticos/compatibles fue del 95,5 % (255 de 267 muestras) con un 82,0 % de resultados idénticos y un 13,5 % de resultados compatibles (véase la tabla 6). El 4,5 % (12 de 267 muestras) de los resultados de genotipado fue discordante.

Tabla 6. Comparación de los hallazgos genotípicos entre la prueba *digene* HPV Genotyping RH y el sistema Free University RLB establecido en 267 frotis cervicales positivos con la prueba HC2.

Concordancia	N = 267 (%)
Resultado genotípico idéntico	219 (82,0)
Resultado genotípico compatible	36 (13,5)
Resultado genotípico discordante	12 (4,5)

Equipo y reactivos que debe suministrar el usuario

Siempre que trabaje con productos químicos utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más información, consulte las fichas de datos de seguridad de los materiales (*material safety data sheets*, MSDS) correspondientes, disponibles en el proveedor del producto.

Para todos los protocolos

- Agua destilada o agua desionizada
- Pipetas* y puntas de pipeta estériles desechables con filtros (1–20 μ l, 20–200 μ l y 200–1000 μ l)
- Pinzas para la manipulación de las tiras
- Probetas graduadas (10 ml, 25 ml, 50 ml y 100 ml)

Protocolo manual

- Baño María* con cubierta inclinada y plataforma de agitación (80 rpm); capaz de alcanzar $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Dispositivo de aspiración
- Termómetro calibrado*
- Agitador orbital o plataforma de balanceo
- Temporizador de laboratorio, 2 horas (± 1 minuto)
- Opcional: Multidispensador (por ejemplo, Finnpiptette® Stepper de Thermo Electron, véase www.thermo.com)*†

Protocolo automatizado

- Analizador ProfiBlot™ 48 T (Tecan Trading, AG; véase www.tecan.com)*†
- Tubos cónicos de 50 ml

* Asegúrese de que los instrumentos hayan sido verificados y calibrados siguiendo las recomendaciones del fabricante.

† Esta no es una lista completa de proveedores y no incluye numerosos proveedores importantes de suministros biológicos.

Notas importantes

Preparación de los reactivos para el procedimiento manual

Solución de lavado 1x

Prepare una dilución 1/5 de solución de lavado 5x (RS) añadiendo una parte de solución de lavado 5x (RS) a 4 partes de agua destilada o desionizada. Prepare 8 ml de solución de lavado diluida (1x) para cada cubeta de ensayo más 10 ml adicionales (véase la tabla 7).

Tabla 7. Preparación de la solución de lavado 1x (para el proceso manual)

N.º de tiras	Volumen de solución de lavado 5x (RS) (ml)	Volumen de agua (ml)	Volumen total (ml)
1	3,6	14,4	18
5	10	40	50
10	18	72	90
15	26	104	130
20	34	136	170

Tampón de sustrato (SB)

Utilice 2 ml de tampón de sustrato (SB) para cada tira, más 5 ml adicionales para cada serie analítica. Para reducir el exceso de tampón de sustrato (SB) necesario para cada serie analítica, utilice un tubo cónico de 50 ml y colóquelo en el frasco suministrado con el analizador ProfiBlot 48 T.

Solución de conjugado y solución de sustrato

Para obtener soluciones de trabajo de conjugado y de sustrato, diluya el conjugado 100x (C) o el sustrato 100x (S) en proporción 1/100 en diluyente de conjugado (CD) o en tampón de sustrato (SB), respectivamente. Prepare 2 ml de solución de conjugado o de solución de sustrato para cada cubeta de ensayo más 2 ml adicionales (véanse las tablas 8 y 9). Para la preparación de las soluciones de conjugado y de sustrato utilice exclusivamente recipientes limpios que hayan sido lavados con agua destilada.

Tabla 8. Preparación de la solución de conjugado (para el proceso manual)

N.º de tiras	Volumen de diluyente de conjugado (CD) (ml)	Volumen de conjugado 100x (C) (µl)
1	4	40
5	12	120
10	22	220
15	32	320
20	42	420

Tabla 9. Preparación de la solución de sustrato (para el proceso manual)

N.º de tiras	Volumen de tampón de sustrato (SB) (ml)	Volumen de sustrato 100x (S) (µl)
1	4	40
5	12	120
10	22	220
15	32	320
20	42	420

Preparación de los reactivos para el procedimiento automatizado

Solución de lavado 1x

Prepare una dilución 1/5 de solución de lavado 5x (RS) añadiendo una parte de solución de lavado 5x (RS) a 4 partes de agua destilada o desionizada. Prepare 10 ml de solución de lavado diluida (1x) para cada tira más 55 ml adicionales (véase la tabla 10, página 22).

Tabla 10. Preparación de solución de lavado 1x (para el proceso automatizado)

N.º de tiras	Volumen de solución de lavado 5x (RS) (ml)	Volumen de agua (ml)	Volumen total (ml)
1	13	52	65
5	21	84	105
10	31	124	155
15	41	164	205
20	51	204	255

Tampón de sustrato (SB)

Utilice 2 ml de tampón de sustrato (SB) para cada tira, más 5 ml adicionales para cada serie analítica. Para reducir el exceso de tampón de sustrato (SB) necesario para cada serie analítica, utilice un tubo cónico de 50 ml y colóquelo en el frasco suministrado con el analizador ProfiBlot 48 T.

Solución de conjugado y solución de sustrato

Para obtener soluciones de trabajo de conjugado y de sustrato, diluya el conjugado 100x (C) o el sustrato 100x (S) en proporción 1/100 en diluyente de conjugado (CD) o en tampón de sustrato (SB), respectivamente. Prepare 2 ml de solución de conjugado o de solución de sustrato para cada tira más 5 ml adicionales (véanse las tablas 11 y 12, página siguiente). Para reducir el exceso de tampón necesario para cada serie analítica, utilice un tubo cónico de 50 ml y colóquelo en el frasco suministrado con el analizador ProfiBlot 48 T. Para la preparación de las soluciones de conjugado y de sustrato utilice exclusivamente recipientes limpios que hayan sido lavados con agua destilada.

Tabla 11. Preparación de la solución de conjugado (para el proceso automatizado)

N.º de tiras	Volumen de diluyente de conjugado (CD) (ml)	Volumen de conjugado 100x (C) (μl)
1	7	70
5	15	150
10	25	250
15	35	350
20	45	450

Tabla 12. Preparación de la solución de sustrato (para el proceso automatizado)

N.º de tiras	Volumen de tampón de sustrato (SB) (ml)	Volumen de sustrato 100x (S) (μl)
1	7	70
5	15	150
10	25	250
15	35	350
20	45	450

Protocolo 1: Detección del ADN del VPH amplificado utilizando un procedimiento manual: hibridación

Puntos importantes antes de comenzar

- No utilice reactivos que hayan superado su fecha de caducidad.
- No mezcle reactivos de diferentes números de lote.
- El vial que contiene la solución de desnaturalización (DS) debe cerrarse de inmediato tras el uso; la exposición prolongada al aire ocasiona un deterioro rápido del producto.
- Coloque todos los reactivos y los tubos de plástico que contienen las tiras de ensayo a 2–8 °C inmediatamente después del uso.
- Durante la totalidad de los diferentes pasos de incubación, las tiras de ensayo deben permanecer en la misma cubeta.

Pasos a seguir antes de comenzar

- Permita que todos los reactivos y los tubos de plástico que contienen las tiras de ensayo alcancen la temperatura ambiente (15–25 °C).
- Caliente la solución de hibridación (HS) y la solución de lavado riguroso (SW) hasta 37 °C como mínimo en un baño María. Asegúrese de que la temperatura no supere la temperatura de hibridación de 50 °C. Todos los cristales deben disolverse antes del uso.
- Ajuste un baño María con cubierta inclinada y plataforma de agitación a 50 °C. Asegúrese de que la temperatura del agua sea de 50 ± 0,5 °C. Compruebe la temperatura utilizando un termómetro calibrado.
- Durante las incubaciones, seleccione la máxima velocidad posible del baño María de agitación que permita el movimiento sin provocar el vertido del líquido.
- Ajuste el nivel de agua del baño María de forma que corresponda a un tercio o a la mitad de la altura de la cubeta de ensayo.

Procedimiento

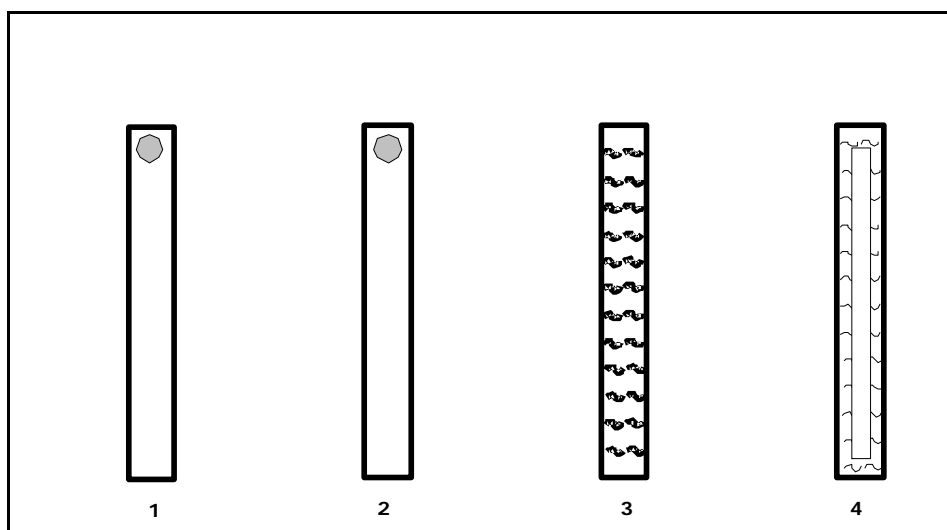


Figura 3. Instrucciones para el pipeteo. 1: Añada a la cubeta 10 μ l de solución de desnaturalización (DS) +10 μ l de tampón 3B (3B); 2: Mezcle mediante pipeteo, y añada 10 μ l de producto de ADN amplificado; 3: Añada solución de hibridación (HS); 4: Coloque la tira en la cubeta.

1. **Dispense 10 μ l de solución de desnaturalización (DS) en la esquina superior del número requerido de cubetas de ensayo (1 cubeta por tira) (véase la figura 3, 1).**
2. **Cierre el vial de la solución de desnaturalización (DS) inmediatamente después del uso.**
3. **Añada 10 μ l de tampón 3B (3B) a la solución de desnaturalización (DS) (véase la figura 3, 1).**
4. **Añada 10 μ l de producto biotinilado amplificado a la cubeta que contiene la solución de desnaturalización (DS) y el tampón 3B (3B).**
5. **Mezcle cuidadosamente los componentes pipeteando arriba y abajo unas cuantas veces (véase la figura 3, 2).** ⓘ Tenga cuidado de no contaminar las cubetas vecinas durante el pipeteo. Utilice una punta de pipeta con filtro nueva para cada muestra.
6. **Incube a temperatura ambiente (15–25 °C) durante 5 minutos.**
7. **Por medio de unas pinzas, extraiga del tubo el número de tiras de ensayo necesario (1 tira por muestra). Añada con un lápiz un número de identificación encima de la línea marcadora de la tira.**
 ⓘ No utilice ningún otro tipo de medio de escritura. Manipule las tiras exclusivamente por encima de la línea marcadora utilizando las pinzas. Asegúrese de utilizar guantes. Manipule siempre las tiras sobre papel.
8. **Agite la solución de hibridación (HS) precalentada.**
9. **Añada con suavidad 2 ml de solución de hibridación al producto amplificado desnaturalizado en cada cubeta (véase la figura 3, 3).**

- ① Mezcle mediante agitación suave. Tenga cuidado de no contaminar las cubetas vecinas durante el pipeteo.

10. Coloque de inmediato la tira en la cubeta (véase la figura 3, 4).

- ① La tira debe quedar completamente sumergida en la solución.
- ① Utilice guantes desechables sin polvo y pinzas.

11. Coloque el armazón de cubetas en el baño María de agitación, cierre la cubierta del baño María e incube a 50 °C durante 60 minutos.

- ① No cubra el armazón de cubetas. La condensación puede provocar contaminación cruzada entre las cubetas.
- ① No utilice un agitador de aire caliente para la incubación. La transferencia de calor no es óptima y puede generar resultados aberrantes.
- ① A mitad del proceso de incubación, asegúrese de que la temperatura del agua sea de $50 \pm 0,5$ °C. Compruebe la temperatura utilizando un termómetro calibrado.

12. Pase al Protocolo 2: Detección del ADN del VPH amplificado utilizando un procedimiento manual: lavado riguroso.

Protocolo 2: Detección del ADN del VPH amplificado utilizando un procedimiento manual: lavado riguroso

Puntos importantes antes de comenzar

- Si ha finalizado el “Protocolo 1: Detección del ADN del VPH amplificado utilizando un procedimiento manual: hibridación”, realice a continuación este protocolo.
- Si está utilizando este protocolo, deberá realizar el “Protocolo 3: Detección del ADN del VPH amplificado utilizando un procedimiento manual: revelado del color” a continuación.

Procedimiento

- 1. Después de la hibridación, retire el armazón de cubetas del baño María.**
- 2. Sostenga en ángulo el armazón de cubetas y aspire el líquido de la cubeta utilizando una pipeta, preferiblemente conectada a un aspirador de vacío.**
 - ① Tenga cuidado de no dañar la superficie de la tira por debajo de la línea marcadora al aspirar la solución.
- 3. Añada 2 ml de solución de lavado riguroso (SW) precalentada a cada cubeta, y aclare agitando el armazón de cubetas a temperatura ambiente (15–25 °C) durante 20–30 segundos. Asegúrese de que la totalidad de la tira se haya lavado totalmente mediante inmersión completa en la solución.**
- 4. Aspire la solución de cada cubeta.**
- 5. Repita el paso de lavado una vez siguiendo las instrucciones de los pasos 3 y 4 de esta sección. No permita que las tiras se sequen entre los dos pasos de lavado. Proceda al paso 6 después de repetir los pasos 3 y 4.**
- 6. Aspire la solución.**
- 7. Añada 2 ml de solución de lavado riguroso (SW) precalentada a cada tira.**
- 8. Incube a 50 °C en el baño María de agitación durante 30 minutos.**
 - ① Asegúrese de que la cubierta del baño María permanezca cerrada durante la incubación.
 - ① No cubra el armazón de cubetas. La condensación puede provocar contaminación cruzada entre las cubetas.

① No utilice un agitador de aire caliente para la incubación. La transferencia de calor no es óptima y puede generar resultados aberrantes.

9. **Durante la incubación en el paso 4 del “Protocolo 1: Detección del ADN del VPH amplificado utilizando un procedimiento manual: hibridación”, prepare la solución de lavado 1x y la solución de conjugado según las instrucciones descritas en “Preparación de los reactivos para el procedimiento manual”, a partir de la página 20.**
10. **Al final de la incubación, aspire la solución de lavado riguroso (SW).**
11. **Pase al “Protocolo 3: Detección del ADN del VPH amplificado utilizando un procedimiento manual: revelado del color”.**

Protocolo 3: Detección del ADN del VPH amplificado utilizando un procedimiento manual: revelado del color

Puntos importantes antes de comenzar

- Si ha finalizado el “Protocolo 2: Detección del ADN del VPH amplificado utilizando un procedimiento manual: lavado riguroso”, realice a continuación este protocolo.
- En este protocolo, todos los pasos de incubación se realizan a temperatura ambiente (15–25 °C).

Procedimiento

- 1. Añada 2 ml de solución de lavado 1x a cada cubeta e incube en una plataforma de balanceo durante 1 minuto.**
- 2. Aspire la solución.**
- 3. Añada 2 ml de solución de lavado 1x a cada cubeta e incube en una plataforma de balanceo durante 1 minuto.**
- 4. Aspire la solución.**
- 5. Añada 2 ml de solución de conjugado a cada cubeta e incube en una plataforma de balanceo durante 30 minutos.**
- 6. Durante la incubación, prepare la solución de sustrato (véase la página 20).**
 - ① Proteja de la luz la solución de sustrato.
- 7. Al final de la incubación, aspire la solución.**
- 8. Añada 2 ml de solución de lavado 1x a cada cubeta e incube en una plataforma de balanceo durante 1 minuto.**
- 9. Aspire la solución. Repita el paso 8 de nuevo para un total de dos lavados con 2 ml de solución de lavado 1x.**
- 10. Añada 2 ml de tampón de sustrato (SB) a cada cubeta e incube en una plataforma de balanceo durante 1 minuto.**
- 11. Aspire la solución.**
- 12. Añada 2 ml de solución de sustrato a cada cubeta, cubra la cubeta con papel de aluminio e incube en una plataforma de balanceo durante 30 minutos.**
- 13. Al final de la incubación, aspire la solución.**
- 14. Para detener el revelado del color, añada 2 ml de agua destilada a cada cubeta e incube en una plataforma de balanceo durante al menos 3 minutos.**

- 15. Aspire la solución.**
- 16. Añada 2 ml de agua destilada a cada cubeta e incube en una plataforma de balanceo durante al menos 3 minutos.**
- 17. Utilizando las pinzas, retire las tiras de las cubetas y coloque las tiras sobre papel absorbente.**
- 18. Deje que las tiras se sequen por completo. Alinee la banda de control de conjugado con la banda correspondiente de la hoja de interpretación, y adhiera la tira a la hoja.**
 - ① Deje que las tiras se sequen por completo antes de proceder a realizar la interpretación visual.
- 19. Almacene las tiras secas y reveladas a temperatura ambiente y a oscuras.**
- 20. No es necesario realizar el protocolo 4: Detección del ADN del HPV amplificado utilizando un procedimiento automatizado. Pase directamente a la Guía de resolución de problemas de este manual.**

Protocolo 4: Detección del ADN del VPH amplificado utilizando un procedimiento automatizado

Puntos importantes antes de comenzar

- Si se va a realizar el protocolo automatizado, no es necesario pasar por los protocolos manuales indicados en los protocolos 1–3.
- No utilice reactivos que hayan superado su fecha de caducidad.
- No mezcle reactivos de diferentes números de lote.

Pasos a seguir antes de comenzar

- Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (15–25 °C) antes del uso.
- Caliente la solución de hibridación (HS) hasta 37 °C como mínimo en un baño María. Asegúrese de que la temperatura no supere la temperatura de hibridación de 50 °C. Todos los cristales deben disolverse antes del uso. Utilice 2 ml de solución de hibridación (HS) más 15 ml adicionales para cada serie analítica.
- Caliente la solución de lavado riguroso (SW) hasta 37 °C como mínimo en un baño María. Asegúrese de que la temperatura no supere la temperatura de hibridación de 50 °C. Todos los cristales deben disolverse antes del uso. Utilice 6 ml de solución de lavado riguroso (SW) más 30 ml adicionales para cada serie analítica.
- Prepare 10 ml de solución de lavado 1x para cada tira más 55 ml adicionales (para más información, consulte la tabla 9, página 21).
- Prepare 2 ml de solución de conjugado y de solución de sustrato para cada tira más 5 ml adicionales (para más información, consulte las tablas 10 y 11, páginas 22 y 23). Para la preparación de las soluciones de conjugado y de sustrato utilice exclusivamente recipientes limpios que hayan sido lavados con agua destilada.
- Utilice la información de la tabla 13 (página siguiente) para conectar los tubos de los canales correspondientes del analizador ProfiBlot a los tampones.

Tabla 13. Colocación de los tampones en el analizador ProfiBlot 48T

Canal	Solución
1	Solución de hibridación
2	Solución de lavado riguroso
3	Solución de lavado
4	Diluyente de conjugado
5	Tampón de sustrato
6	Tampón de sustrato

Procedimiento

- 1. Programe el analizador ProfiBlot 48 T calibrado utilizando los parámetros de la tabla 14, en las dos páginas siguientes.**

Tabla 14. El programa ProfiBlot 48 T

Parámetros					
1	INC	5 min	Shake Speed: 3		
2	TEMP	49 °C[§]			
3	DISP	Channel 1	2000 µl	Start Pos. 1	No. of Strips End
4	INC	60 min	Shake Speed: 3		
5	WASH	Channel 2	2000 µl	Start Pos. 1	No. of Strips End
6	INC	3 min	Shake Speed: 3		
7	WASH	Channel 2	2000 µl	Start Pos. 1	No. of Strips End
8	INC	3 min	Shake Speed: 3		
9	WASH	Channel 2	2000 µl	Start Pos. 1	No. of Strips End
10	INC	30 min	Shake Speed: 3		
11	WASH	Channel 3	2000 µl	Start Pos. 1	No. of Strips End
12	COOL				
13	WASH	Channel 3	2000 µl	Start Pos. 1	No. of Strips End
14	WASH	Channel 4	2000 µl	Start Pos. 1	No. of Strips End
15	INC	30 min	Shake Speed: 3		
16	WASH	Channel 3	2000 µl	Start Pos. 1	No. of Strips End
17	INC	3 min	Shake Speed: 3		
18	WASH	Channel 3	2000 µl	Start Pos. 1	No. of Strips End
19	INC	3 min	Shake Speed: 3		
20	WASH	Channel 5	2000 µl	Start Pos. 1	No. of Strips End
21	INC	3 min	Shake Speed: 3		
22	WASH	Channel 6	2000 µl	Start Pos. 1	No. of Strips End
23	INC	30 min	Shake Speed: 3		

La tabla continúa en la página siguiente.

[§] La temperatura de incubación para la hibridación está establecida en 49 °C. En el procedimiento manual la hibridación se realiza a 50 °C para obtener un resultado de hibridación similar.

Tabla 14. Continuación

Parámetros					
24	WASH	Channel 3	2000 μ l	Start Pos. 1	No. of Strips End
25	INC	3 min	Shake Speed: 3		
26	WASH	Channel 3	2000 μ l	Start Pos. 1	No. of Strips End
27	INC	10 min	Shake Speed: 3		
28	ASP				
29	END				

2. Encienda el analizador ProfiBlot 48 T e inicie el programa.

El instrumento se calentará hasta alcanzar la temperatura necesaria.

3. Prepare los reactivos para la serie analítica; consulte “Preparación de los reactivos para el procedimiento automatizado”, página 21, si desea más información.

4. Coloque los reactivos en el analizador ProfiBlot 48 T e inserte los tubos del instrumento en los tampones. Asegúrese de insertar los tubos en los tampones correctos (véase la tabla 13, página 32).

5. Por medio de unas pinzas, extraiga del tubo el número de tiras de ensayo necesario (1 tira por muestra). Añada con un lápiz un número de identificación encima de la línea marcadora de la tira.

① No utilice ningún otro tipo de medio de escritura. Manipule las tiras exclusivamente por encima de la línea marcadora utilizando las pinzas. Asegúrese de utilizar guantes.

6. Introduzca una tira marcada en la esquina superior de cada cubeta.

7. Pipetee 10 μ l de solución de desnaturalización (DS) en la esquina inferior de cada cubeta que contenga una tira.

① Cierre el vial inmediatamente después del uso. Puede utilizarse un multidispensador para la distribución de la solución de desnaturalización (DS).

8. Añada 10 μ l de tampón 3B (3B) a la solución de desnaturalización (DS).

9. Añada 10 μ l de producto biotinilado amplificado a la solución de desnaturalización (DS) en la cubeta. Mezcle cuidadosamente los componentes pipeteando arriba y abajo unas cuantas veces.

ⓘ Tenga cuidado de no contaminar las cubetas vecinas durante el pipeteo. Utilice una punta de pipeta nueva estéril con filtro para cada muestra.

10. Coloque con cuidado la bandeja en el analizador ProfiBlot 48 T cuando el instrumento se haya calentado e inicie la serie analítica.

11. Cuando haya finalizado la serie analítica, lave las tiras de la bandeja con agua destilada durante 5 minutos.

12. Utilizando las pinzas, retire las tiras de las cubetas y coloque las tiras sobre papel absorbente.

13. Deje que las tiras se sequen por completo.

14. Alinee la banda de control de conjugado con la banda correspondiente de la hoja de interpretación, y adhiera la tira a la hoja.

ⓘ Deje que las tiras se sequen por completo antes de proceder a realizar la interpretación visual.

15. Almacene las tiras secas y reveladas a temperatura ambiente y a oscuras.

Guía de resolución de problemas

Esta guía de resolución de problemas le será de utilidad para resolver los problemas que puedan surgir. Para obtener más información, consulte también la página de preguntas frecuentes (*Frequently Asked Questions, FAQ*) de nuestro centro de asistencia técnica: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Los científicos del Servicio Técnico de QIAGEN se encargarán de responder a cualquier pregunta que tenga sobre la información y los protocolos de este manual, así como sobre las tecnologías de preparación de muestras y ensayos de biología molecular (encontrará la información de contacto en la contraportada o en www.qiagen.com).

Comentarios y sugerencias

Señales débiles o ausentes en todas las tiras, incluida la banda de control de conjugado

- a) **Procedimiento manual:** Se ha utilizado una cantidad incorrecta de conjugado o de sustrato. ① Repita el protocolo de revelado del color utilizando las mismas tiras.
Prepare solución de lavado 1x, solución de conjugado y solución de sustrato recién diluidas.
- b) **Procedimiento automatizado:** Se ha utilizado una cantidad incorrecta de conjugado o de sustrato. ① Repita la prueba con tiras y tampones nuevos utilizando el mismo material amplificado.

Señales falsas negativas o excesivamente débiles en las bandas de sonda, excepto por la banda de control de conjugado

- a) Se ha añadido para la hibridación una cantidad inadecuada de material amplificado. ① La concentración de material amplificado es demasiado baja debido a una amplificación ineficiente. Compruebe la cantidad de producto amplificado analizando una parte de 10 μ l en gel de agarosa al 2%. La longitud del producto del VPH amplificado varía entre 139 y 148 pb, dependiendo del tipo de VPH. Consulte "Amplificación ineficiente" (página 37) para obtener más información. El amplímero de betaglobina tiene un tamaño de 258 pb, pero probablemente no será visible en el gel.

Comentarios y sugerencias

- b) No se calentado o mezclado correctamente la solución de hibridación (HS) o la solución de lavado riguroso (SW).
- ① Antes del uso, caliente la solución de hibridación (HS) y la solución de lavado riguroso (SW) hasta 37 °C como mínimo en un baño María. Asegúrese de que la temperatura no supere 50 °C. Todos los cristales deben disolverse antes del uso.

- c) **Procedimiento manual:** La temperatura ha superado los 50 °C durante la hibridación y el lavado riguroso.
- ① Asegúrese de preparar el baño María con la temperatura correcta.

Amplificación ineficiente

- a) Se ha utilizado demasiado ADN.
- ① Compruebe la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa. Si se ha añadido demasiado ADN, a menudo es visible una mancha de ADN en el gel. Debido a la baja temperatura de renaturalización de la PCR, es normal observar algunas bandas de fondo en el gel. Diluya el ADN y repita la amplificación añadiendo 10 veces menos ADN.
- b) Se ha utilizado una cantidad insuficiente de ADN.
- ① Repita la reacción de amplificación y añada más ADN.
- c) Problemas con el ADN.
- ① En caso necesario, repita la purificación del ADN. Repita la reacción de amplificación.
- d) Se ha programado incorrectamente el termociclador.
- ① Verifique si se utilizaron las condiciones correctas de ciclado. En caso necesario, calibre el termociclador.

Señales falsas positivas

- a) La temperatura durante la hibridación y el lavado riguroso era demasiado baja.
- ① Pueden generarse señales inespecíficas si la temperatura para la hibridación y para el lavado riguroso es demasiado baja. La temperatura debe ser de 50 ± 0,5 °C. Asegúrese de preparar correctamente el baño María. Cierre siempre la cubierta del baño María durante la incubación.

Comentarios y sugerencias

- b) Se ha utilizado demasiado ADN. ① Compruebe la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa. Si se ha añadido demasiado ADN, a menudo es visible una mancha de ADN en el gel. Debido a la baja temperatura de renaturalización de la PCR, es normal observar algunas bandas de fondo en el gel. Diluya el ADN y repita la amplificación añadiendo 10 veces menos ADN.
- c) Contaminación ① Si se observa un patrón inespecífico similar en la mayoría de las tiras, puede existir contaminación. La contaminación puede haber ocurrido durante la manipulación de las muestras clínicas, la purificación del ADN o la preparación de PCR. Por consiguiente, repita la reacción de amplificación utilizando soluciones recién preparadas y/o repita el procedimiento de purificación del ADN. Si el resultado del control de ADN negativo es negativo, pero las muestras siguen siendo positivas, lo más probable es que la contaminación se produjera durante la manipulación de las muestras clínicas.
- d) **Procedimiento manual:** No se calentado o mezclado correctamente la solución de hibridación (HS) o la solución de lavado riguroso (SW). ① Antes del uso, caliente la solución de hibridación (HS) y la solución de lavado riguroso (SW) hasta 37 °C como mínimo en un baño María. Asegúrese de que la temperatura no supere 50 °C. Todos los cristales deben disolverse antes del uso.

Descoloración o mancha blanca en el centro de la tira o tinción no uniforme

- a) **Procedimiento manual:** El conjugado se ha diluido mal o el exceso de conjugado no se ha eliminado mediante lavado correctamente. ① Repita el procedimiento de revelado del color utilizando las mismas tiras.
Aumente la velocidad y asegúrese de que las tiras queden completamente sumergidas en el reactivo.

Comentarios y sugerencias

Color de fondo alto

- a) **Procedimiento manual:** El conjugado se ha diluido mal o el exceso de conjugado no se ha eliminado mediante lavado correctamente.
- ① Repita la prueba con tiras nuevas comenzando en el paso de desnaturalización (paso 7 en el protocolo 4: Detección del ADN del VPH amplificado utilizando un procedimiento automatizado, o el paso 1 del Protocolo 1: Detección del ADN del VPH amplificado utilizando un procedimiento manual: hibridación). Utilice el mismo material amplificado. Asegúrese de que las tiras se desplacen adelante y atrás en las cubetas durante los pasos de lavado con solución de lavado 1x en el procedimiento de revelado del color. Lave las tiras durante al menos 1 minuto.
- b) **Procedimiento manual:** Las tiras se han incubado en solución de sustrato durante demasiado tiempo.
- ① Repita la prueba con tiras nuevas, comenzando en el paso de desnaturalización (paso 7 en el protocolo automatizado o paso 1 en el Protocolo 1: Detección del ADN del VPH amplificado utilizando un procedimiento manual: hibridación). Utilice el mismo material amplificado. Asegúrese de que las tiras se desplacen adelante y atrás en las cubetas durante los pasos de lavado con solución de lavado 1x en el procedimiento de revelado del color. Lave las tiras durante al menos 1 minuto.
- c) **Procedimiento automatizado:** Se ha preparado una cantidad insuficiente de tampón.
- ① Asegúrese de preparar suficiente cantidad de tampón. Consulte "Preparación de los reactivos para el procedimiento automatizado", página 21, si desea más información.
- d) **Procedimiento automatizado:** Los tubos que dispersan los tampones no se han colocado correctamente en los recipientes que contienen los tampones.
- ① Asegúrese de colocar los tubos correctamente en los recipientes que contienen los tampones.

e) **Procedimiento automatizado:** Las tiras se han dejado demasiado tiempo en la solución de lavado 1x.

ⓘ Las tiras solo pueden permanecer en el instrumento hasta el día siguiente. Repita la prueba con tiras nuevas. Utilice el mismo material amplificado.

Señales débiles para la banda de sonda de betaglobina

La PCR se ha diseñado para detectar óptimamente el ADN del VPH.

ⓘ Es posible que en el caso de ciertos procedimientos de preparación del ADN o de ciertos tipos de muestras, la señal de la betaglobina sea siempre débil o ausente, y las muestras no necesariamente serán válidas. Póngase en contacto con el Servicio Técnico.

Apéndice A: Interpretación de los resultados

Resultado positivo

La presencia de una banda visible se considera una reacción positiva. La interpretación del resultado de la prueba está vinculado directamente con el nombre de la sonda del tipo de VPH (por ejemplo, un color morado en la banda de la sonda VPH 16 indica la presencia del VPH de tipo 16). En una sola muestra pueden existir varios tipos de VPH.

Control de calidad

La primera banda positiva es la banda de control de conjugado (inmediatamente debajo de la línea marcadora). Esta banda proporciona un control para la adición de conjugado reactivo y de solución de sustrato durante el procedimiento de detección. Siempre tiene que ser positiva, y debe tener aproximadamente la misma intensidad en cada tira de la misma serie analítica. Si la banda de control no es visible, la serie analítica no es válida. La última banda de sonda se utiliza como control interno. Reacciona con el ADN genómico humano coamplificado presente en la muestra clínica. Se utiliza como control interno para comprobar si existe inhibición de la PCR y si la obtención de la muestra y el aislamiento del ADN han sido adecuados. Si existe VPH en la muestra, la banda de sonda de la betaglobina puede ser negativa por competición por la PCR, ya que el ADN del VPH se amplifica preferentemente.

Tabla 15. Análisis del resultado

Control de conjugado	Resultado de VPH	Beta-globina	Resultado	Comentario
+	+	+	válido	
+	+	-	válido	El ADN del VPH se amplifica preferentemente, lo que tiene como consecuencia la ausencia de la señal de betaglobina (competición por la PCR).
+	-	+	válido	
-	+/-	+/-	no válido	Repita el ensayo de detección con el mismo amplímero.

La tabla continúa en la página siguiente.

Tabla 15. Continuación

Control de conjugado	Resultado de VPH	Beta-globina	Resultado	Comentario
+	-	-	no válido	Ha fallado la purificación del ADN o la PCR. Repita la totalidad del ensayo comenzando con la purificación del ADN y continuando con la PCR y la hibridación inversa, utilizando la muestra original. Si se obtiene el mismo resultado, póngase en contacto con el Servicio Técnico.

Apéndice B: Control de la contaminación en la PCR

Es de extrema importancia incluir al menos un control negativo que carezca del ácido nucleico plantilla en cada preparación de PCR, con el fin de detectar una posible contaminación. Para el control negativo, sólo la banda de control de conjugado debe ser positiva.

Recomendaciones para el diseño y los procedimientos del laboratorio

Se recomienda realizar la siguiente secuencia de operaciones:

1. Preparación y distribución en partes iguales de las mezclas de PCR
2. Preparación de las muestras (aislamiento de ADN)
3. Amplificación
4. Análisis de los productos de PCR biotinilados mediante hibridación inversa

El personal implicado en los pasos 3 y 4 no debe participar en trabajos subsiguientes para los pasos 1 y 2 en el mismo día. De igual forma, después de haber participado en el paso 2, el personal no debe realizar trabajos subsiguientes para el paso 1 en el mismo día.

Con el fin de prevenir la contaminación (por ejemplo, con productos de amplificación) de las muestras y para evitar resultados falsos positivos, el procedimiento debe realizarse en tres salas físicamente independientes, cada una equipada con su propio conjunto de suministros y pipetas. Se utilizará una sala para la preparación de los reactivos, otra para la preparación de las muestras y la tercera para la amplificación y la detección de los productos de PCR. Todo el equipo debe mantenerse en la sala en la que se utilice, y no debe pasarse de una sala a otra. Deben utilizarse puntas de pipeta para el pipeteo con el fin de reducir al mínimo la contaminación cruzada entre muestras. Además, se usarán guantes desechables, que deberán ser sustituidos por otros nuevos con frecuencia.

Sala 1: Esta sala debe utilizarse exclusivamente para el almacenamiento y la preparación de los reactivos de PCR. Esta sala y su equipo deben mantenerse libres de productos de amplificación. El personal de laboratorio debe llevar una bata de laboratorio limpia, que no debe utilizarse fuera de esta sala. Deben utilizarse guantes desechables en todo momento.

Sala 2: Esta sala se utiliza para la preparación de las muestras, y debe mantenerse libre de productos de amplificación. El personal de laboratorio debe llevar una bata de laboratorio limpia, que no debe utilizarse fuera de esta sala. Durante la preparación de las muestras, los guantes desechables deben sustituirse por otros nuevos con frecuencia. Para evitar la contaminación cruzada, quite con cuidado la tapa de los viales que contengan muestras procesadas. Evite abrir al mismo tiempo más de un vial de reacción que contenga una muestra.

Sala 3: Esta sala se utiliza para la amplificación y la detección de productos de PCR. El personal de laboratorio debe llevar una bata de laboratorio limpia, que no debe utilizarse fuera de esta sala y que debe cambiarse a diario. Cuando se trabaje con productos de amplificación deben utilizarse guantes desechables.

La prueba *digene* HC2 High-Risk HPV y la prueba *digene* HPV Genotyping RH, kit de detección pueden realizarse en la misma sala. Al realizarlas, lleve a cabo el procesamiento de muestras, la desnaturalización y la transferencia a la placa de hibridación para la prueba de HC2 antes de entrar en el laboratorio de pruebas para el ensayo de HC2 y para la prueba Genotyping RH de detección (sala 3). De esta forma se evita que la muestra original, que debe procesarse en la sala 2, quede expuesta a los productos de amplificación utilizados en la sala 3.

En caso de contaminación, los bancos de laboratorio, los aparatos y las pipetas pueden descontaminarse limpiándolos con DNA AWAY y con RNase AWAY (Molecular BioProducts, Inc.) o con una solución de lejía comercial diluida en una proporción de 1/10.*† A continuación, los bancos y las pipetas deben ser lavados con agua libre de RNase.

Precauciones químicas generales

Recomendamos almacenar las soluciones para PCR en pequeñas fracciones y utilizar fracciones nuevas para cada PCR.

Bibliografía

QIAGEN mantiene online una base de datos extensa y actualizada de publicaciones científicas en las que se utilizan los productos de QIAGEN. Las opciones integrales de búsqueda permiten al usuario encontrar los artículos que necesita, ya sea mediante una búsqueda sencilla de una palabra clave o especificando la aplicación, el área de investigación, el título, etc.

Para obtener una lista bibliográfica completa, visite la base de datos bibliográfica online de QIAGEN en www.qiagen.com/RefDB/search.asp o póngase en contacto con el Servicio Técnico de QIAGEN o con su distribuidor local.

* La mayoría de las soluciones de lejía comerciales contiene hipoclorito sódico al 5,25%. El hipoclorito sódico es un irritante y debe manipularse con precaución.

† Siempre que trabaje con productos químicos utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más información, consulte las fichas de datos de seguridad de los materiales (*material safety data sheets, MSDS*) correspondientes, disponibles en el proveedor del producto.

Bibliografía citada

1. van den Brule, A. J., Pol R., Fransen-Daalmeije, N., Schouls, L. M., Meijer, C. J., and Snijders, P. J. (2002) GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol* **40**, 779.

Esta página se ha dejado en blanco intencionadamente.

Esta página se ha dejado en blanco intencionadamente.

Información para pedidos

Producto	Contenido	Referencia
<i>digene</i> HPV Genotyping RH Test (20)	Prueba <i>digene</i> HPV Genotyping RH, kit de amplificación, prueba <i>digene</i> HPV Genotyping RH, kit de detección	613413
Productos relacionados		
QIAamp MinElute Virus Spin Kit (50)	Para 50 minipreparaciones: 50 columnas QIAamp MinElute, proteasa QIAGEN, ARN transportador, tampones, tubos de recogida (2 ml)	57704
EZ1 [®] DSP Virus Kit (48)	Para 48 preparaciones de ácido nucleico vírico: cartuchos de reactivo precargados, puntas con filtro desechables, portapuntas desechables, tubos de muestra, tubos de elución, tampones, ARN transportador.	62724

Para obtener información actualizada sobre licencias y sobre exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual de usuario o el manual de uso del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales y las guías del usuario de los kits de QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com o pueden solicitarse a los servicios técnicos de QIAGEN o a su distribuidor local.

Marcas comerciales: QIAGEN®, QIAamp®, *digene*®, EZ1®, MinElute® (Grupo QIAGEN); Finnpipette® (Thermo Electron OY); ThinPrep®, PreservCyt® (Hologic); ProClin® (Rohm and Haas Company).

Acuerdo de licencia limitada

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario de la prueba *digene* HPV Genotyping RH, kit de detección la aceptación de los siguientes términos:

1. La prueba *digene* HPV Genotyping RH, kit de detección puede ser utilizada exclusivamente de acuerdo con las especificaciones del "Manual de uso de la prueba *digene* HPV Genotyping RH, kit de detección", y empleando únicamente los componentes contenidos en el kit. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes contenidos en el kit con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en el "Manual de uso de la prueba *digene* HPV Genotyping RH, kit de detección" y en protocolos adicionales disponibles en www.qiagen.com.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que este kit ni su(s) uso(s) no infrinjan los derechos de terceros.
3. Este kit y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no pueden ser reutilizados, reacondicionados ni revendidos.
4. QIAGEN específicamente renuncia a cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del kit aceptan no realizar ni permitir a otros realizar ningún paso que pueda conducir a acciones que hayan sido prohibidas en las especificaciones anteriores o que pueda facilitarlas. QIAGEN se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada, y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los costes del juicio, incluidos los honorarios de abogacía, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de garantía limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este kit y con sus componentes.

Para obtener los términos actualizados de la licencia, visite www.qiagen.com.

© 2010 QIAGEN, reservados todos los derechos.

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 03-9840-9800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

Austria ■ Orders 0800/28-10-10 ■ Fax 0800/28-10-19 ■ Technical 0800/28-10-11

Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

Brazil ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

China ■ Orders 021-3865-3865 ■ Fax 021-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

Italy ■ Orders 02-33430-420 ■ Fax 02-33430-426 ■ Technical 800-787980

Japan ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

Korea (South) ■ Orders 1544 7145 ■ Fax 1544 7146 ■ Technical 1544 7145

Luxembourg ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-639

The Netherlands ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

Norway ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

Singapore ■ Orders 65-67775366 ■ Fax 65-67785177 ■ Technical 65-67775366

Spain ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050

Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

