

A. FINALIDAD PREVISTA

Hybridot – HPV es un sistema basado en la técnica de blot reverso que permite la detección en muestras de ADN procedentes de frotis vaginiales y biopsias cervicouterinas de los siguientes virus del papiloma humano (HPV): HPV 6 y 11, HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV53, HPV56 y 66, HPV58, HPV59, HPV68.

Ensayo para 50 reacciones.

B. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

El sistema se basa en la amplificación y marcado de fragmentos de ADN de entre 190 y 280 pares de bases, específicos de cada uno de los virus. Los fragmentos son marcados durante la amplificación mediante la sustitución parcial de dTTP por dUTP-digoxigenin.

La detección de los fragmentos amplificados se lleva a cabo mediante el uso de membranas de nylon cargadas positivamente que tienen fijados fragmentos de ADN de entre 130 y 240 pares de bases, que permiten su unión específica a los fragmentos de DNA amplificado de cada uno de los virus.

Los fragmentos amplificados y marcados de cada virus hibridan con el ADN fijado en la membrana. A continuación se incuban con anticuerpos antidigoxin que se unen a los fragmentos marcados. La señal es amplificada mediante el uso de polímeros conjugados con peroxidasa que reconocen el anticuerpo antidigoxin. El sistema es revelado mediante el uso de una solución que forma precipitados insolubles en la celdilla donde se ha producido la hibridación entre el ADN amplificado y el ADN fijado en la membrana.

El sistema tiene controles internos que permiten comprobar si la amplificación, la extracción del DNA y la hibridación han sido correctos (fig. 1)

16	18	31	33	35	Hybridot HPV
39	45	51	52	53	
56/66	58	59	68	6/11	
C1	C2	C3	IC1	IC2	

Fig.1: Membrana Hybridot HPV. C1, C2, C3- Control PCR. Amplificación control de un gen reporter del DNA del paciente correspondiente a cada una de las PCR. Control de la extracción de DNA. **IC1, IC2- Control Hibridación.** Deben aparecer siempre en los resultados. Permiten verificar que la hibridación se ha hecho correctamente o que no hay un deterioro de las soluciones de hibridación. IC1-control de señal intensa.IC2-control de señal débil. **16-HPV16, 18-HPV18, 31-HPV31, 33-HPV33, 35-HPV35, 39-HPV39, 45-HPV45, 51-HPV51, 52-HPV52, 53-HPV53, 56/66-HPV56 y HPV66, 59-HPV59, 68-HPV68, 6/11-HPV6 y HPV11.**

COMPONENTES Y CONDICIONES DE CONSERVACIÓN

El kit Hybridot-HPV es un ensayo **para 50 reacciones** y está compuesto por el Hybridot-HPV Amplification kit (ref. HD-HPV-AK) y el Hybridot-HPV Incubation kit (ref. HD-HPV-IK). Requiere de material accesorio para el revelado, el Hybridot Revealing kit (ref. HD-RK), no suministrado junto con el Hybridot-HPV kit.

HYBRIDOT-HPV AMPLIFICATION KIT

Se debe conservar entre -24°C y -14°C.

Contiene:

Hybridot-HPV Premix A, Hybridot-HPV Premix B, Hybridot-HPV Premix C, Taq Hybridot Polymerase, Hybridot-HPV membranes
Hybridot-HPV Premix.

Contiene todos los reactivos necesarios para la amplificación del ADN menos la *Taq Hybridot Polymerase*, que se incluye en un vial aparte. Una vez descongelados los reactivos para su uso mantener en frío.

Hybridot-HPV membranes.

Contiene 5 hojas con las membranas impresas listas para ser usadas, cada membrana debe ser recortada para su uso.

HYBRIDOT-HPV INCUBATION KIT

Se debe conservar entre 3°C y 7°C. Contiene material accesorio que a su recepción debe conservarse a temperatura ambiente entre 15°C y 30°C.

Contiene:

- PCR Tubes 0,2ml:* conservar a temperatura ambiente 15°C/30°C
- Hybridot tubes:* conservar a temperatura ambiente 15°C/30°C
- Hybridot tube Caps:* conservar a temperatura ambiente 15°C/30°C
- Hybridot Buffer:* conservar a 3°C/7°C
- Anti-digoxin Antibody:* conservar a 3°C/7°C
- HRP Polymer:* conservar a 3°C/7°C
- Washing Buffer 10X (2 X 125ml):* conservar a 3°C/7°C.

HYBRIDOT-HPV KIT PARA 50 REACCIONES (REF. HD-HPV-50R)

	Componente	Código	Tª Conservación	Cantidad para 50 reacciones
Hybridot-HPV Amplification kit (ref. HD-HPV-AK)	<i>Hybridot-HPV membranes</i>	CBM000089	-24°C/-14°C.	50 unidades
	<i>Taq Hybridot polimerase</i>	CBM000087	-24°C/-14°C.	3 X 12,5µl
	<i>Hybridot-HPV Premix A</i>	CBM000086A	-24°C/-14°C.	2X 570 µl
	<i>Hybridot-HPV Premix B</i>	CBM000086B	-24°C/-14°C.	2X 570 µl
	<i>Hybridot-HPV Premix C</i>	CBM000086C	-24°C/-14°C.	2X 570 µl
Hybridot-HPV Incubation kit (ref. HD-HPV-IK)	<i>PCR Tubes 0,2ml</i>		15°C/30°C	150 unidades
	<i>Hybridot tubes</i>		15°C/30°C	50 unidades
	<i>Hybridot tube Caps</i>		15°C/30°C	50 unidades
	<i>Hybridot Buffer</i>	CBM000067	3°C/7°C	50ml
	<i>Anti-digoxin Antibody</i>	CBM-A-DIG	3°C/7°C	50ml
	<i>HRP Polymer</i>	CBM000090	3°C/7°C	2X5ml
	<i>Washing Buffer 10X</i>	CBM000021	3°C/7°C	2 X 250ml

Equipamiento, Reactivos y Material no suministrado y requerido.

Equipamiento no suministrado y requerido.

- Horno de hibridación El producto se ha testado en el horno de hibridación PROBLOT Hybridization Oven (LABNET).
- Termociclador el producto ha sido testado en termocicladores eppendorf Mastercycler pros.
- Vortex (opcional)
- Centrifuga para tubos de 0,2ml
- Micropipetas de volumen variable

Reactivos y Material no suministrado y requerido

- Kit de extracción de DNA. El producto ha sido testado usando el kit de extracción QIAamp DNA mini Kit (Qiagen).
- Hybridot Revealing kit (ref. HD-RK, de Cenbimo)
- Agua para la preparación de reactivos.
- Guantes
- Puntas de pipeta

PRECAUCIONES Y RECOMENDACIONES DURANTE LA MANIPULACIÓN

¡ADVERTENCIA! Antes de utilizar el kit lea detenidamente las instrucciones para asegurarse de que manipula los componentes y reactivos correctamente.

La extracción del DNA problema y la amplificación deben ser llevadas a cabo con el equipamiento necesario para minimizar las posibles contaminaciones derivadas de los procesos descritos. Se recomienda el uso de controles negativos para descartar contaminaciones y falsos positivos.

Debido a las condiciones de conservación se pueden formar precipitados en la solución de lavado *Washing Buffer 10X*. Antes de su uso deben ser eliminados. Para ello calentar la solución en una estufa o baño termostatzado hasta su disolución.

Se recomienda agitar suavemente la solución Hybridot Buffer previamente a su uso.

Todos los reactivos deben ser manipulados con guantes para minimizar las contaminaciones. Las membranas deben ser manipuladas con guantes y deben ser conservadas con su hoja de protección para evitar roces en su superficie.

Durante los procesos de hibridación las membranas no deben ser tocadas con puntas o utensilios con aristas que puedan dañarlas.

Una vez reveladas deben conservarse protegidas de los roces y de la luz utilizando un film adhesivo.

PROTOCOLO

Muestras.

El test ha sido diseñado para su uso en muestras de ADN procedentes de frotis vaginales y biopsias cervicouterinas. El resultado final del test depende de una correcta recogida de la muestra, puesto que la calidad y cantidad de la misma son imprescindibles para el funcionamiento sistema.

Extracción de DNA.

Reactivos no incluidos en el kit. Utilizar un kit comercial de extracción de DNA y seguir las instrucciones del fabricante. El producto ha sido testado con el kit comercial de extracción de DNA QIAamp DNA mini Kit (Qiagen).

Amplificación de ácidos nucleicos (USO DEL HYBRIDOT-HPV AMPLIFICATION KIT)

1. Para cada muestra se dispondrán 3 tubos de PCR de 0,2ml (*PCR Tubes 0,2ml*). A cada uno de los tubos se añaden 22,75µl del *Premix Hybridot* (a un tubo 22,75µl del *Premix Hybridot A*, a otro tubo 22,75µl del *Premix Hybridot B* y al último tubo 22,75µl del *Premix Hybridot C*, 0,25µl de *Taq Hybridot polimerase* y 2µl de DNA extraído anteriormente de la muestra. Se agita con vortex durante 5s para mezclar el contenido (opcional) y se centrifuga (spin) para arrastrar las posibles gotas que hayan quedado en las paredes del tubo.
2. Los tubos que contengan las mezclas anteriores se introducen en el termociclador y se someten al siguiente ciclo:

95°C	7min	20 ciclos
95°C	30s	
62°C-52°C con una reducción de 0,5°C por ciclo	1min	
72°C	1min 15s	40 ciclos
95°C	30s	
52°C	1min	
72°C	1min 15s	
72°C	2min	
4°C	∞	

El producto ha sido testado en termocicladores eppendorf Mastercycler proS. Es necesario el uso de termocicladores que puedan hacer Touchdown PCR.

Se recomienda conservar el producto de la amplificación entre 3°C y 7°C no más de 24 horas.

Hibridación (USO DEL HYBRIDOT-STD INCUBATION KIT)

1. Se precalienta el horno de hibridación¹ a 66°C. Comprobar mediante un termómetro interior que la temperatura es la correcta.
2. Se recorta una membrana (*Hybridot membranes*) para realizar el ensayo para cada muestra y se identifica con un lápiz en la superficie libre de la membrana.
3. Se introduce la membrana en un tubo de incubación (*Hybridot tubes*) quedando apoyada sobre las paredes del tubo.
4. Se añade 1ml de *Hybridot Buffer* y a continuación se añaden los 25µl de PCR de cada uno de los tubos de PCR de 0,2ml (A,B,C) procedentes de la amplificación de la muestra. Se cierra bien el tubo con una rosca (*Hybridot tubes Caps*) para evitar la evaporación durante la incubación.
5. Introducir los tubos en el horno de hibridación (encajarlos en el rotor para tubos de hibridación) e Incubar a 66°C² durante 70min con rotación aproximadamente entre 8-12 giros/min³.
6. Decantar o aspirar los líquidos del tubo y lavar con *Washing Buffer*⁴. Añadir volumen suficiente para cubrir la membrana. Se deberán añadir entre 4ml y 5ml. Agitar suavemente y decantar, repetir el proceso 2 veces más. Después hacer un último lavado dejando incubar durante 10min con *Washing Buffer* y decantar.
7. Añadir 1ml de *Anti-digoxin Antibody* e incubar a temperatura ambiente en el horno de hibridación durante 30min con rotación aproximadamente entre 8-12 giros/min.
8. Decantar o aspirar los líquidos del tubo y realizar los lavados con *Washing Buffer* igual que en el paso 6.
9. Añadir 200µl de *HRP Polymer* y 200µl de *Washing Buffer*. Incubar a temperatura ambiente en el horno de hibridación durante 30min con rotación aproximadamente entre 8-12 giros/min.
10. Decantar o aspirar los líquidos del tubo y realizar los lavados con *Washing Buffer* igual que en el paso 6.

Revelado (USO DEL HYBRIDOT REVEALING KIT (ref. HD-RK)

1. Añadir a cada tubo con membrana 2ml de solución de revelado y agitar inmediatamente. Incubar durante 1min-2min. La solución de revelado se prepara añadiendo proporcionalmente 25µl de *HD-Chromogen* por 1ml de *Chromogen Buffer*. Una vez preparado usar inmediatamente.
2. Tras la incubación con el Revealing Kit, decantar la solución de revelado y lavar con abundante agua. Dejar secar. El secado de las membranas a 50°C-60°C acelera el proceso y minimiza la tinción de fondo.
3. Interpretar los resultados. Se recomienda conservar las membranas protegidas de roces y de la luz.

NOTAS

- 1 El horno de hibridación utilizado es un PROBLLOT Hybridization Oven (LABNET).
- 2 El producto debe ser hibridado a 66°C, seleccionar la temperatura deseada en el horno de hibridación. Se recomienda comprobar la temperatura mediante un termómetro debido a que temperaturas superiores a 70°C producen floculación del buffer de hibridación formando agregados e inhibiendo la hibridación.
- 3 La rotación permite mantener la membrana continuamente humedecida y en contacto con las soluciones de incubación. El número de giros 8-12 giros/min corresponde a la posición 2 de velocidad de rotación del horno de hibridación PROBLLOT Hybridization Oven (LABNET).
- 4 *Washing Buffer* es la solución de lavado diluida. Esta solución se proporciona concentrada, *Washing Buffer 10X*. Para obtener la concentración de trabajo es necesario diluirla 10 veces en agua. Poner 100ml de *Washing Buffer 10X* en una probeta y enrasar hasta 1L con agua.

Hybridot-HPV Premix (A,B,C).

Hybridot-HPV Premix A Amplifica **HPV16, HPV18, HPV31, HPV35, HPV59, C1.**

Hybridot-HPV Premix B Amplifica **HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV53, C2.**

Hybridot-HPV Premix C Amplifica **HPV 6 y 11, HPV33, HPV56 y 66, HPV58, HPV68, C3.**

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Como resultado del revelado se producirá un precipitado de color marrón, apareciendo una señal en la celdilla correspondiente al microorganismo presente en la muestra como consecuencia de la amplificación y el marcado del ADN extraído.

Esquema de la composición de las Hybridot-HPV membranes

16	18	31	33	35	Hybridot HPV
39	45	51	52	53	
56/66	58	59	68	6/11	
C1	C2	C3	IC1	IC2	
CONTROL PCR			CONTROLES HIBRIDACIÓN		

C1, C2, C3- Control PCR. Amplifica un gen *reporter* del ADN extraído de la muestra. Permite comprobar que la amplificación y la extracción han sido correctas. Su señal debe ser similar a IC1

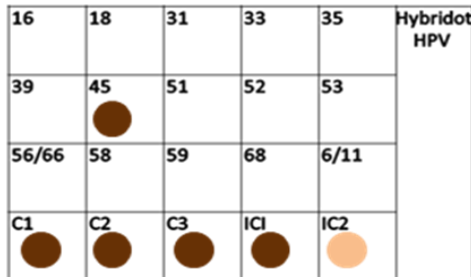
IC1 – IC2. Controles de hibridación. Deben aparecer siempre en los resultados, Permiten verificar que la hibridación se ha hecho correctamente o que no hay un deterioro de las soluciones de hibridación. IC1-control de señal intensa e IC2-control de señal débil.

16-HPV16, 18-HPV18, 31-HPV31, 33-HPV33, 35-HPV35, 39-HPV39, 45-HPV45, 51-HPV51, 52-HPV52, 53-HPV53, 56/66-HPV56 y HPV66, 59-HPV59, 68-HPV68, 6/11-HPV6 y HPV11.

EJEMPLOS DE RESULTADOS VÁLIDOS

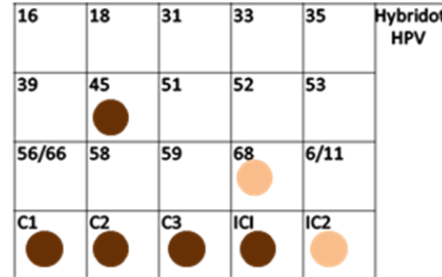
Muestra de paciente positiva para HPV45.

16	18	31	33	35	Hybridot HPV
39	45	51	52	53	
56/66	58	59	68	6/11	
C1	C2	C3	IC1	IC2	



Muestra de paciente positiva para HPV45 y HPV68.

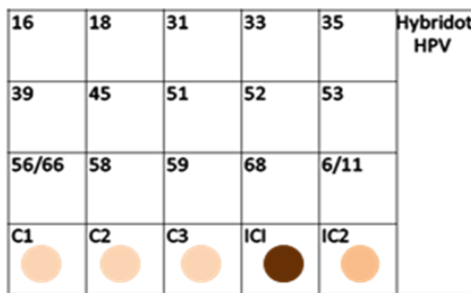
16	18	31	33	35	Hybridot HPV
39	45	51	52	53	
56/66	58	59	68	6/11	
C1	C2	C3	IC1	IC2	



RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

EJEMPLO DE RESULTADO NO VÁLIDO

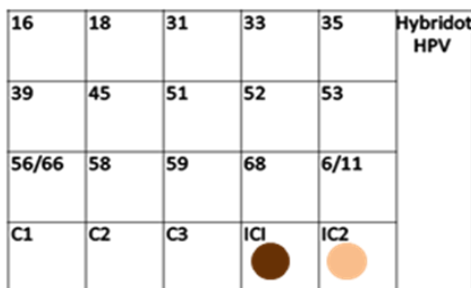
16	18	31	33	35	Hybridot HPV
39	45	51	52	53	
56/66	58	59	68	6/11	
C1	C2	C3	IC1	IC2	



Si obtiene un resultado similar al de la imagen significa que la muestra del paciente tiene baja concentración de DNA o problemas en la amplificación. Se recomienda repetir la extracción con mayor cantidad de muestra del paciente o repetir la extracción y amplificar de nuevo.

EJEMPLO DE RESULTADO NO VÁLIDO

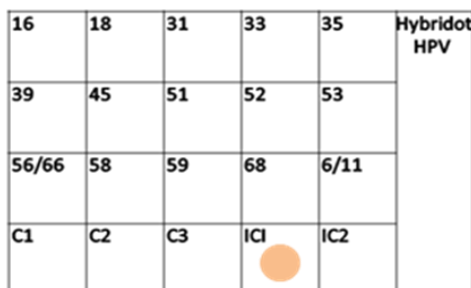
16	18	31	33	35	Hybridot HPV
39	45	51	52	53	
56/66	58	59	68	6/11	
C1	C2	C3	IC1	IC2	



Si obtiene un resultado similar al de la imagen significa problemas en la amplificación o en la extracción de DNA. La ausencia de control C1, C2, C3 indica que no se ha extraído DNA o que en la amplificación ha habido un problema. Se recomienda repetir la extracción y amplificar de nuevo.

EJEMPLO DE RESULTADO NO VÁLIDO

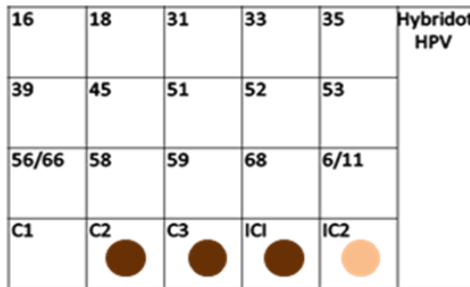
16	18	31	33	35	Hybridot HPV
39	45	51	52	53	
56/66	58	59	68	6/11	
C1	C2	C3	IC1	IC2	



Si obtiene un resultado similar al de la imagen significa problemas en la amplificación, extracción DNA e hibridación. La ausencia de control C indica que no se ha extraído DNA o que en la amplificación ha habido un problema. La ausencia de control IC2 y la tinción débil de IC1 indica que ha habido un problema en la hibridación o deterioro de los reactivos. Se recomienda repetir la extracción, amplificar e hibridar de nuevo.

EJEMPLO DE RESULTADO NO VÁLIDO

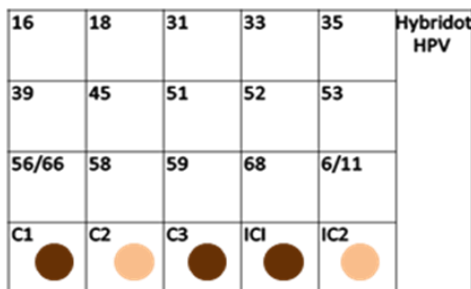
16	18	31	33	35	Hybridot HPV
39	45	51	52	53	
56/66	58	59	68	6/11	
C1	C2	C3	ICI	IC2	



Si obtiene un resultado similar al de la imagen significa problemas en la amplificación. La ausencia de control C1 indica que ha habido un problema en la amplificación de la PCR del *Hybridot-HPV Premix A*. Se recomienda amplificar *Hybridot-HPV Premix A, B y C* e hibridar de nuevo.

EJEMPLO DE RESULTADO NO CONCLUYENTE

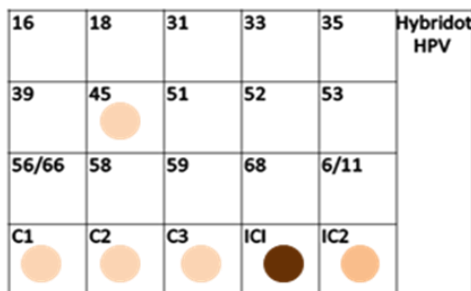
16	18	31	33	35	Hybridot HPV
39	45	51	52	53	
56/66	58	59	68	6/11	
C1	C2	C3	ICI	IC2	



Muestra de paciente Negativa. Problemas en la amplificación. La baja señal del control C2 indica que ha habido un problema en la amplificación de la PCR del *Hybridot-HPV Premix B*. Se recomienda amplificar *Hybridot-HPV Premix A, B y C* e hibridar de nuevo.

EJEMPLO DE RESULTADO NO CONCLUYENTE

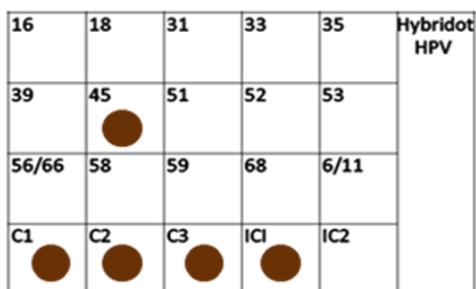
16	18	31	33	35	Hybridot HPV
39	45	51	52	53	
56/66	58	59	68	6/11	
C1	C2	C3	ICI	IC2	



Muestra de paciente positiva para HPV45. Baja concentración de DNA o problemas en la amplificación. Se recomienda repetir la extracción con *mayor cantidad de muestra del paciente* o repetir la extracción y amplificar de nuevo, para descartar la presencia de otros HPV.

EJEMPLO DE RESULTADO NO CONCLUYENTE

16	18	31	33	35	Hybridot HPV
39	45	51	52	53	
56/66	58	59	68	6/11	
C1	C2	C3	ICI	IC2	



Ausencia de control IC2. La ausencia de control IC2 es indicativa de problemas durante la hibridación. Puede deberse al deterioro de alguno de los reactivos (que suele ser el *Revealing kit*). También puede deberse a problemas durante la hibridación, lavados incorrectos, preparación errónea de reactivos o tiempos de incubación demasiado cortos. Muestra de paciente positiva para HPV45.



HYBRIDOT-HPV KIT PARA 50 REACCIONES (REF. HD-HPV-50R)

PROBLEMAS DE TINCIÓN

Abundante señal de fondo. No se han realizado correctamente los lavados indicados en los puntos 6,8 y 10 del apartado hibridación.

PARÁMETROS ANALÍTICOS

Sensibilidad analítica del sistema

La sensibilidad analítica fue determinada mediante la amplificación específica de fragmentos clonados en plásmidos. El límite de detección (mínima cantidad detectable) en función del virus se especifica en la siguiente tabla:

	Copias virales/ul
HPV16	375
HPV18	225
HPV31	200
HPV33	250
HPV35	250
HPV39	500
HPV45	625
HPV51	650
HPV52	500
HPV53	225
HPV56 y 66	500
HPV58	500
HPV59	750
HPV68	650
HPV 6 y 11	500

Especificidad analítica del sistema

El sistema ha sido diseñado para la amplificación específica de las secuencias de cada uno de estos VIRUS y no de otros.