



Ministerio de Salud  
Secretaría de Políticas, Regulación  
e Institutos  
A. N. M. A. T

DISPOSICIÓN N° **9430**

BUENOS AIRES **11 NOV. 2015**

VISTO, el expediente n° 1-47-3110-1507/15-1 del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por las presentes actuaciones la firma TECNOLAB S.A. solicita autorización para la venta a laboratorios de análisis clínicos de los Productos para diagnóstico de uso "in Vitro" denominados 1) INNO-LIPA HPV Genotyping *Extra II* / ENSAYO DE SONDAS EN TIRA DE MEMBRANA DISEÑADO PARA LA DETECCIÓN CUALITATIVA E IDENTIFICACIÓN DE DIFERENTES GENOTIPOS DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (HPV alto riesgo: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68; HPV probable alto riesgo: 26, 53, 66, 70, 73, y 82; HPV bajo riesgo o no clasificado: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 67, 81, 83 y 89) MEDIANTE LA DETECCIÓN DE SECUENCIAS ESPECIFICAS DE LA REGION L<sub>1</sub> DEL GENOMA DE VPH; 2) INNO-LIPA HPV Genotyping *Extra II Amp* / PARA LA AMPLIFICACIÓN DE UNA PARTE DE LA REGION L<sub>1</sub> DEL VPH MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Que a fs. 125 consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico que establece que los productos reúnen las condiciones de aptitud requeridas para su autorización.

Que la Dirección Nacional de Productos Médicos ha tomado la intervención de su competencia.



Ministerio de Salud  
Secretaría de Políticas, Regulación  
e Institutos  
A. N. M. A. T

DISPOSICIÓN N° 9430

Que se ha dado cumplimiento a los términos que establece la Ley 16.463, Resolución Ministerial N° 145/98 y Disposición ANMAT N° 2674/99.

Que se actúa en virtud a las atribuciones conferidas por el Decreto N° 1490/92, por el Decreto N° 1886/14 y el Decreto N° 1368/15.

Por ello;

EL ADMINISTRADOR NACIONAL DE LA ADMINISTRACION NACIONAL DE  
MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA MÉDICA

DISPONE:

ARTICULO 1º.- Autorízase la venta a laboratorios de análisis clínicos de los Productos para diagnóstico de uso "in Vitro" denominados 1) INNO-LIPA HPV Genotyping *Extra II* / ENSAYO DE SONDAS EN TIRA DE MEMBRANA DISEÑADO PARA LA DETECCIÓN CUALITATIVA E IDENTIFICACIÓN DE DIFERENTES GENOTIPOS DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (HPV alto riesgo: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68; HPV probable alto riesgo: 26, 53, 66, 70, 73, y 82; HPV bajo riesgo o no clasificado: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 67, 81, 83 y 89) MEDIANTE LA DETECCIÓN DE SECUENCIAS ESPECIFICAS DE LA REGION L<sub>1</sub> DEL GENOMA DE VPH; 2) INNO-LIPA HPV Genotyping *Extra II Amp* / PARA LA AMPLIFICACIÓN DE UNA PARTE DE LA REGION L<sub>1</sub> DEL VPH MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) que serán elaborados por FUJIREBIO EUROPE N.V. Technologiepark 6, B-9052 Gent. (BÉLGICA) e importados por TECNOLAB S.A. a expendirse en envases por 1) 20



Ministerio de Salud  
Secretaría de Políticas, Regulación  
e Institutos  
A. N. M. A. T

DISPOSICIÓN N° 9430

DETERMINACIONES, CONTENIENDO: TIRAS DE MEMBRANA (20 unidades), SOLUCIÓN DE DESNATURALIZACIÓN (1 vial X 1 ml), SOLUCIÓN DE HIBRIDACIÓN (1 vial X 80 ml), SOLUCIÓN DE LAVADO ASTRINGENTE (1 vial X 200 ml), SOLUCIÓN DE LAVADO 5X (1 vial X 80 ml), DILUYENTE DE CONJUGADO (1 vial X 80 ml), CONJUGADO 100X (1 vial X 0,8 ml), TAMPÓN SUSTRATO (1 vial X 180 ml), SUSTRATO BCIP/NBT 100X (1 vial X 0,8 ml), BANDEJAS DE INCUBACIÓN (3 unidades); 2) ENVASES CONTENIENDO: MASTER MIX (1 vial X 1,0 ml) Y CONTROL POSITIVO (1 vial X 0,05 ml); cuya composición se detalla a fojas 104, 107 y 108 con un período de vida útil de 1) 18 (DIECIOCHO) meses, desde la fecha de elaboración conservado entre 2 y 8 °C y 2) 18 (DIECIOCHO) meses, desde la fecha de elaboración conservado entre -25 y -15 °C.

ARTICULO 2º.- Acéptense los rótulos y manual de instrucciones obrantes a fojas 85 a 123, desglosándose las fojas 85 a 97 debiendo constar en los mismos que la fecha de vencimiento es la declarada por el elaborador impreso en los rótulos de cada partida.

ARTICULO 3º.- Extiéndase el Certificado correspondiente.

ARTICULO 4º.- LA ADMINISTRACION NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA MEDICA, se reserva el derecho de reexaminar los métodos de control, estabilidad y elaboración cuando las circunstancias así lo determinen.



Ministerio de Salud  
Secretaría de Políticas, Regulación  
e Institutos  
A. N. M. A. T

DISPOSICIÓN N° **9430**

ARTICULO 5º.- Regístrese; gírese a Dirección de Gestión de Información Técnica a sus efectos, por el Departamento de Mesa de Entradas notifíquese al interesado y hágasele entrega de la copia autenticada de la presente Disposición junto con la copia de los proyectos de rótulos , Manual de Instrucciones y el certificado correspondiente. Cumplido, archívese.-

Expediente nº: 1-47-3110-1507/15-1.

DISPOSICIÓN N°: **9430**

av.

*da*

*L*

Ing. ROGELIO LOPEZ  
Administrador Nacional  
A.N.M.A.T.

9430<sub>1</sub> 1 NOV. 2015 1

**PROYECTO DE RÓTULO EXTERNO**



**INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II Amp**

Uso Diagnóstico "In Vitro"

**FUJIREBIO**

**INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II Amp**  
AMP KIT

The purchase of this product allows the purchaser to use it for amplification of nucleic acid sequences for human in vitro diagnostics in accordance with the patented method described in the package insert. No general patent or other license of any kind other than this specific right of use from purchase is granted hereby.

**IVD CE**

Fujirebio Europe N.V.  
Technologiepark 6  
9052 Gent, Belgium  
☎+32-9 329 13 29

28871 v0

Store AMP Reagents red labelled separately.  
Conserver séparément les réactifs d'amplification portant une étiquette rouge.  
Rist mediante AMP Reagenzien separat legent!  
Conservare i reagenti AMP marcati in rosso separatamente.  
Amacener separatament los reactivos AMP etiquetados en rojo.  
Conservar separatamente os reagentes AMP rotulados de vermelho.

INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II Amp **REF** 81533

**MASTER MIX** 1x 1 mL **REF** 60587  
**CONTROL** 1x 0.05 mL **REF** 59732

**LOT** 412345  
2014-12

EUH210

**IMPORTADOR:** TECNOLAB S.A. Estomba Nº 964 - c1427cco. C.A.B.A. Teléfono: 54-11-4-555-0010.

**DIRECTOR TECNICO:** Bioq. Marisol Masino

**ORIGEN DE ELABORACION:** Fujirebio Europe N.V. Technologiepark 6, 9052 Gent, Bélgica.

**AUTORIZADO POR EL MINISTERIO DE SALUD**

**CERTIFICADO N°:**  
**DISPOSICIÓN N°:**

Marisol Masino  
Bioquímica - M.N. 9483  
Dirección Técnica - TecnoLab S.A.

9430



# INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II

Usó Diagnóstico "In Vitro"



## INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II

Line Probe Assay

The purchase of this product allows the purchaser to use it for the performance of diagnostic services for human in vitro diagnostics. No general patent or other license of any kind other than this specific right of use from purchase is granted hereby.

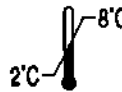
IVD CE

Fujirebio Europe N.V.  
Technologiepark 6  
9052 Gent, Belgium  
☎+32-9 329 13 29

28774-00

### INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II REF 81534

STRIPS	1x	20	REF 80584
DENAT SOLN	1x	1 mL	REF 56718
HYBRIDIZ SOLN	1x	80 mL	REF 57420
STRIN WASH SOLN	1x	200 mL	REF 57421
RINSE SOLN 5x	1x	80 mL	REF 56721
CONJ DIL	1x	80 mL	REF 56951
CONJ 100x	1x	0.8 mL	REF 56952
SUBS BUF	1x	180 mL	REF 56953
SUBS BCIP/NBT 100x	1x	0.8 mL	REF 56954



DANGER



H312 H314 H317 H319 H332 H360D  
P201 P260 P280 P310 P351 P361

LOT 412345  
2014-12

**IMPORTADOR:** TECNOLAB S.A. Estomba Nº 964 - c1427cco. C.A.B.A. Teléfono: 54-11-4-555-0010.

**DIRECTOR TECNICO:** Bioq. Marisol Masino

**ORIGEN DE ELABORACION:** Fujirebio Europe N.V. Technologiepark 6, 9052 Gent, Bélgica.

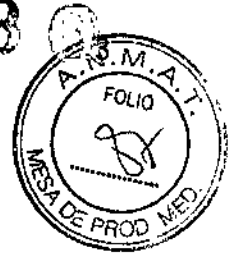
**AUTORIZADO POR EL MINISTERIO DE SALUD**

CERTIFICADO Nº:  
DISPOSICIÓN Nº:

*[Handwritten signature]*

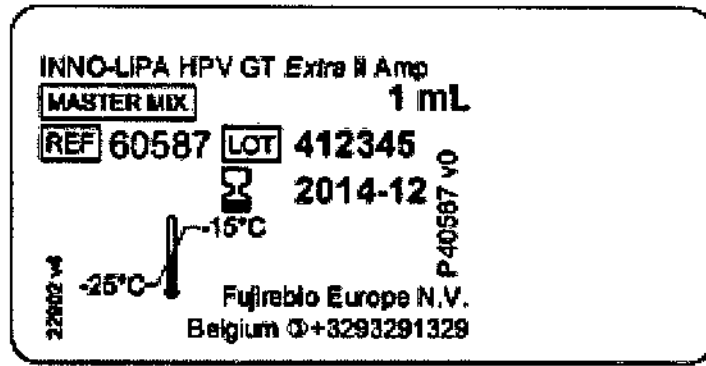
Marisol Masino  
Bioquímica - M.N. 9483  
Dirección Técnica / Tecnolab S.A.

943

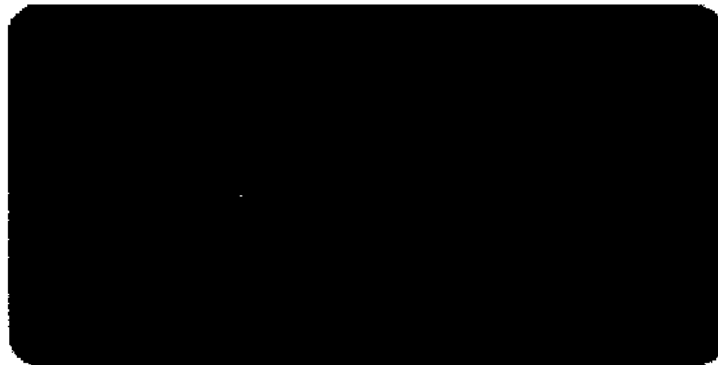


PROYECTO DE RÓTULOS INTERNOS  
**INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II Amp**

**1. MEZCLA PRINCIPAL (Master Mix)**



**2. CONTROL +**



*Handwritten signature or initials.*

*Handwritten signature.*  
Marisol Masino  
Bioquímica - M.N. 9483  
Dirección Técnica - TecnoLab S.A.

9430<sup>4</sup>



# INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II

## 1. TIRAS

INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II

**STRIPS** **LOT** 412345 Σ 20

**REF** 60584 **EXPIRES** 2014-12

P40584 v0

22002 v4 2°C 8°C

Fujirebio Europe N.V.  
Belgium ☎+3293291329

## 2. SOLUCIÓN DE DESNATURALIZACIÓN

**DENAT SOLN** **1 mL**

**REF** 56718 **LOT** 412345

**DANGER** **EXPIRES** 2014-12

P46718 v0

26605 v0 2°C 8°C

Fujirebio Europe N.V.  
Belgium ☎+3293291329

## 3. SOLUCIÓN DE HIBRIDACIÓN

**HYBRIDIZ SOLN** **80 mL**

**REF** 57420 **LOT** 412345

**EXPIRES** 2014-12

P47420 v0

22003 v5 2°C 8°C

Fujirebio Europe N.V.  
Belgium ☎+3293291329

Marisol Masino  
Bioquímica - M.N. 9483  
Dirección Técnica - Tecnolab S.A.





4. SOLUCIÓN DE LAVADO ASTRINGENTE

**STRIN WASH SOLN** **200 mL**

REF 57421 LOT 412345

⌚ 2014-12

P47421 v0

229403 v0 2°C-8°C

Fujirebio Europe N.V.  
Belgium ☎+3293291329

5. CONJUGADO 100X

**CONJ 100x** **0.8 mL**

REF 56952 LOT 412345

⌚ 2014-12

P46952 v0

229402 v0 2°C-8°C

Fujirebio Europe N.V.  
Belgium ☎+3293291329

6. DILUYENTE DE CONJUGADO

**CONJ DIL** **80 mL**

REF 56951 LOT 412345

⌚ 2014-12

P46951 v0

229403 v0 2°C-8°C

Fujirebio Europe N.V.  
Belgium ☎+3293291329

7. SUSTRATO BCIP/NBT 100X

9430

6



SUBS	BCIP/NBT	100x	0.8 mL
REF	56954	LOT	412345
DANGER		⌚	2014-12
			P46954 v0
Fujirebio Europe N.V. Belgium ☎+3293291329			

8. BUFFER SUSTRATO

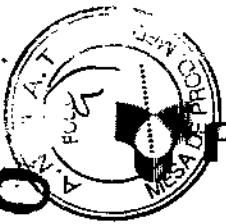
SUBS BUF	180 mL		
REF	56953	LOT	412345
⌚		2014-12	
		P46953 v0	
Fujirebio Europe N.V. Belgium ☎+3293291329			

9. SOLUCIÓN DE LAVADO 5X

RINSE SOLN	5x	80 mL	
REF	56721	LOT	412345
WARNING		⌚	2014-12
			P46721 v0
Fujirebio Europe N.V. Belgium ☎+3293291329			

Marisol Masino  
Bioquímica - M.N. 9483  
Dirección Técnica - Tecnolab S.A.

9430



**FUJIREBIO**

KEY CODE: **FRI79764**  
81533 INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II Amp  
B31011 v0  
2014-04-08  
p 1/11  
Español

81533 INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II Amp / B31011 v0 / KEY-CODE: **FRI79764** p 2/11

**INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II Amp**



Fabricado por:

Fujirebio Europe N.V.  
Technologiepark 6  
9052 Gent  
Belgium  
☎+32-9 329 13 29  
BTW BE 0427.550.660  
RPR Gent

Distribuido por:

Fujirebio Germany GmbH  
Hans-Böckler-Allee 20  
30173 Hannover  
Germany  
☎+49 511 857 39 31

Fujirebio Italia S.r.l.  
Via Vaccareccia 39/A  
00040 Pomezia (Roma)  
Italy  
☎+39 06 965 28 700

Fujirebio France SARL  
Les Conquéranrs, Bât. Le Kilimandjaro  
8/10, avenue des Tropiques  
91940 Les Ulis  
France  
☎+33 1 69 07 48 34

Fujirebio Iberia S.L.  
Calle Tarragona 161, Planta 14  
08014 Barcelona  
Spain  
☎+34 93 270 53 00

Fujirebio Europe N.V.  
Technologiepark 6  
9052 Gent  
Belgium  
☎+32 9 329 13 29

© Fujirebio Europe N.V












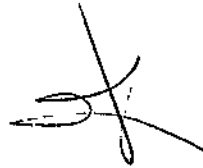

**tecnolab s.a.**  
estomba 964 . c1427cov  
capital federal argentina  
tel. 54 11 4555 0010  
54 11 4859 5300  
fax 54 11 4553 3331  
info@tecnolab.com.ar  
www.tecnolab.com.ar  
ISO 9001:2008 certificada

**Índice**

Símbolos utilizados ..... 2  
 Uso al que está destinado ..... 3  
 Principio del ensayo ..... 3  
 Reactivos ..... 3  
   *Descripción, preparación para el uso y condiciones de almacenamiento recomendadas* ..... 3  
   *Reactivos suministrados:* ..... 4  
 Materiales necesarios pero no suministrados ..... 4  
 Seguridad y medio ambiente ..... 4  
 Recolección de muestras y extracción de ADN ..... 5  
   *Preparación de las células cervicales:* ..... 5  
   *Extracción de ADN con el equipo QiAamp MinElute Media (QIAGEN):* ..... 5  
 Observaciones y precauciones ..... 7  
 Procedimiento de ensayo ..... 8  
   *Preparación de la mezcla de PCR:* ..... 8  
   *Perfil de PCR* ..... 8  
 Resultados ..... 9  
   *Validación* ..... 9  
 Limitaciones del procedimiento ..... 9  
 Procedimiento de ensayo ..... 9  
 Recomendaciones sobre diseño y procedimientos de laboratorio ..... 9  
   *Habitación 1 - almacenamiento y preparación de reactivos:* ..... 10  
   *Habitación 2 - preparación de muestras:* ..... 10  
   *Habitación 3 - amplificación y detección de amplicones:* ..... 10  
 Licencias ..... 10  
 Marcas comerciales ..... 11  
 Referencias ..... 11

**Símbolos utilizados**

-  Fabricante
-  Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*
-  Código de lote
-  Número de catálogo
-  Fecha de caducidad
-  Consulte las instrucciones de uso
-  Límite de temperatura
-  Equipo de amplificación
-  Mezcla principal

  
  
**MARISOL MASINO**  
 BIOQUÍMICA M.N. 9488  
 DT - TECNOLAB S.A.

CONTROL +

Control positivo

**Uso al que está destinado**

El Equipo INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II Amp, para uso en diagnóstico *in vitro*, está diseñado para amplificar parte de la región L1 del virus del papiloma humano (HPV) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

**Principio del ensayo**

La amplificación de una gran variedad de genotipos de HPV requiere utilizar cebadores consensuados que tienen como diana una región del genoma del HPV conservada entre genotipos distintos. La región más conservada del genoma del HPV es la región L1, y se han descrito varios conjuntos de cebadores de PCR consensuados en esta región (Molijn et al. 2005). Algunos ejemplos son los conjuntos de cebadores GP5+/6+ (Jacobs et al. 1997), MY09/11 (Hildesheim et al. 1994) y PGMY (Gravitt et al. 2000).

El conjunto de cebadores utilizado en INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II Amp amplifica una región de 65 bp en el marco abierto de lectura L1 (Kleter et al. 1998) y tiene el potencial de amplificar como mínimo 54 tipos de HPV (Safaeian et al. 2007). Este conjunto de cebadores es una versión actualizada del conjunto de cebadores "SPF10". Esta aplicación está protegida por las siguientes patentes de Fujirebio Europe N.V.: EP 1012348B, US 6,482,588B y sus equivalentes extranjeras.

La amplificación mediante PCR se realiza en una mezcla de reactivos que contienen un exceso de desoxinucleósidos 5'-trifosfato (dNTP), que incluye desoxiuridina trifosfato, cebadores biotinilados, ADN-polimerasa termoestable y uracil-N-glicosilasa (UNG). Un paso de incubación previo a la amplificación elimina las bases de uracilo de los productos de amplificación contaminantes presentes en la mezcla de reacción. La enzima UNG se inactiva cuando la temperatura aumenta a 94°C durante el paso siguiente de desnaturalización. La mezcla con muestra se calienta para separar las dos hebras de la hélice de ADN (desnaturalización) y exponer las secuencias diana a los cebadores. Estos cebadores son complementarios de las regiones que bordean la secuencia diana. Así, después de un ciclo de desnaturalización, hibridación y extensión, se producen dos copias biotiniladas exactas de la secuencia original. Después de 40 ciclos, se obtiene una secuencia diana biotinilada multiplificada.

**Reactivos****Descripción, preparación para el uso y condiciones de almacenamiento recomendadas**

- Si se mantienen a -20°C y se almacenan en los viales originales, los reactivos, abiertos o sin abrir, permanecerán estables hasta la fecha de caducidad del equipo. No utilice reactivos caducados.
- Los reactivos deben almacenarse aislados de fuentes de ADN contaminante, especialmente de productos amplificados.
- Para evitar la contaminación, almacene el control positivo separado de los reactivos de amplificación y del material amplificado.

- Descongele la mezcla principal, lista para usar, dejándola a temperatura ambiente. Una vez descongelada, debe colocarse inmediatamente en un bloque de refrigeración o en hielo. Centrifugue este vial antes de usarlo.
- Si hubiera alteraciones del aspecto físico de los reactivos del equipo, pueden indicar inestabilidad o deterioro.

**Reactivos suministrados:**

Componente	Cantidad	Ref.	Descripción
MEZCLA PRINCIPAL	1x 1 ml	60587	Contiene cebadores biotinilados en tampón con mezcla dNTP/dUTP, MgCl <sub>2</sub> , ADN-polimerasa AmpliTaq Gold 360, uracil-N-glicosilasa y NaN <sub>3</sub> al 0.05% como conservante.
CONTROL +	1x 0.05 ml	59732	El control de PCR contiene ADN de HPV6 y ADN de HLA-DPB1, y NaN <sub>3</sub> al 0.05% como conservante.

**Materiales necesarios pero no suministrados**

- QIAamp MinElute Media Kit, QIAGEN, cat. No. 57414
- Guantes desechables
- Puntas de pipeta desechables resistentes a aerosoles y libres de ADN/DNasa
- Microtubos libres de ADN/DNasa
- DNAZap (Ambion, Cat. No. 9890)
- Racks de microtubos
- Centrifugadora de microtubos
- Vórtex o equivalente.
- Bloque de calentamiento
- Termociclador de ADN y equipamiento
- Pipetas ajustables que permitan pipetear 1 - 20 µl, 20 - 200 µl y 200 - 1000 µl
- Aceite mineral, grasa siliconada (si es necesario)
- Etanol (96-100%)
- Agua desionizada/destilada libre de ADN/DNasa (calidad para PCR)

**Seguridad y medio ambiente**

**Consulte la ficha de datos de seguridad (FDS) y el etiquetado del producto para obtener información acerca de componentes potencialmente peligrosos. La versión más reciente de la FDS se encuentra disponible en la página Web: [www.fujirebio-europe.com](http://www.fujirebio-europe.com).**

- Las muestras deben manipularse siempre como productos potencialmente infecciosos.
- Es imprescindible el uso de equipo de protección personal. Use guantes y gafas de seguridad para manipular agentes peligrosos o infecciosos.
- Deseche los residuos de acuerdo con las normas de manejo de residuos de su institución. También se deben cumplir todas las normativas medioambientales internacionales, nacionales, regionales y locales.
- La mezcla principal y el control positivo contienen azida sódica como conservante. Para evitar la formación de un gas muy tóxico, evite el contacto de la azida sódica con ácidos. Para evitar la formación de azidas de cobre o de plomo explosivas en las cañerías, lave los desagües con abundante agua después de desechar soluciones que contengan azida sódica.

### Recolección de muestras y extracción de ADN

El equipo INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II Amp* no incluye la recolección de la muestra, su transporte y la extracción de ADN posterior.

El equipo INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II Amp* se ha validado mediante la recolección de células cervicales en líquido Surepath o PreserveCyt, y posterior procedimiento de extracción adaptado con el equipo QIAamp MinElute Media (QIAGEN), como se describe a continuación. Se pueden utilizar otros protocolos estándar para la obtención de muestras de células cervicales en líquidos de recolección (p. ej., soluciones que contienen alcohol) combinados con la extracción de ADN de HPV mediante algunos de los equipos comerciales disponibles, pero requieren validación interna.

#### Preparación de las células cervicales

- Desprenda las células del cepillo agitando en vórtex o agitando intensamente durante 15 segundos.
- Transfiera 1 ml de suspensión de células cervicales a un microtubo, evitando la contaminación cruzada entre muestras.
- Centrifugue los viales a aproximadamente 13000 rpm durante 15 segundos.
- Deseche el sobrenadante utilizando una punta de pipeta limpia desechable para cada vial de reacción. Vuelva a tapar cada vial.
- Añada 1 ml de agua destilada y agite en vórtex brevemente para resuspender las células.

Nota: la resuspensión del sedimento celular debe realizarse en el mismo volumen que la suspensión de las células cervicales.

#### Extracción de ADN con el equipo QIAamp MinElute Media (QIAGEN)

Se ha modificado el protocolo del equipo QIAamp MinElute Media (QIAGEN) para que sea más fácil de usar. En este protocolo se aplicó una proporción de ¾ de los volúmenes usados en el protocolo estándar del equipo QIAamp MinElute Media:

1. Pipetee 50 µl de tampón ATL en un microtubo de 2 ml (no suministrado).
2. Añada 150 µl de muestra al microtubo de 2 ml.
3. Añada 15 µl de proteinasa K de QIAGEN. Cierre el tubo y agite en vórtex por pulsos durante 10 s.
4. Incube a 56°C durante 30 min. Agite las muestras para garantizar una elevada concentración de ácidos nucleicos. Para obtener resultados óptimos, use un termoagitador a 900 rpm. Si usa un bloque térmico, agite en vórtex las muestras ocasionalmente durante el período de incubación.
5. Centrifugue brevemente el tubo de 2 ml para eliminar gotas en la parte interior del tapón.
6. Añada 150 µl de tampón AL (con 10 µg/ml de ARN transportador). Cierre el tubo y agite en vórtex por pulsos durante 10 s.

Para garantizar una lisis eficiente es fundamental mezclar bien la muestra, el tampón ATL, la proteinasa K de QIAGEN y el tampón AL para producir una solución homogénea.

Al añadir tampón AL al tampón ATL puede formarse un precipitado de color blanco.

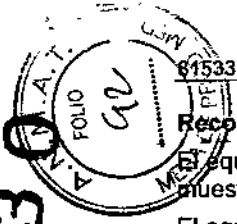
El precipitado no interfiere en el procedimiento y se disolverá en el paso 7 de incubación.

7. Incube a 70°C durante 15 min. Agite las muestras para garantizar una concentración elevada de ácidos nucleicos. Para obtener resultados óptimos, use un termoagitador a 900 rpm. Si usa un bloque térmico, agite en vórtex las muestras ocasionalmente durante el período de incubación.
8. Centrifugue brevemente el tubo de 2 ml para eliminar gotas en la parte interior del tapón.
9. Añada 200 µl de etanol (96-100%) a la muestra. Tápela y mezcle agitando en vórtex por pulsos durante 15 s. Incube el lisado con etanol durante 5 min a temperatura ambiente (15-25°C).  
Nota: Si la temperatura ambiente supera los 25°C, se debe refrigerar el etanol con hielo antes de añadirlo al lisado.
10. Centrifugue brevemente el tubo de 2 ml para eliminar gotas en la parte interior del tapón.
11. Inserte una columna de QIAamp MinElute en un tubo de recolección de 2 ml limpio.
12. Pipetee con cuidado todo el lisado del paso 10 en la columna QIAamp MinElute, cierre el tapón y centrifugue durante 1 min a 8000 rpm. Coloque la columna de QIAamp MinElute en un tubo de recolección de 2 ml limpio y deseche el tubo de recolección que contiene el filtrado.
13. Abra con cuidado la columna de QIAamp MinElute y añada 500 µl de tampón AW2 sin mojar el borde. Cierre el tapón y centrifugue durante 1 min a 8000 rpm. Deseche el tubo de recolección que contiene el filtrado.
14. Añada 500 µl de etanol (96-100%) a la columna de QIAamp MinElute. Cierre el tapón y centrifugue durante 1 min a 8000 rpm.
15. Deseche el tubo de recolección que contiene el filtrado.
16. Coloque la columna de QIAamp MinElute en un tubo de recolección de 2 ml limpio y centrifugue a máxima velocidad (20000 x g, 14000 rpm) durante 3 min para secar completamente la membrana.
17. Coloque la columna de QIAamp MinElute en un tubo de recolección de 1,5 ml limpio (suministrado) y deseche el tubo de recolección de 2 ml que contiene el filtrado. Abra el tapón de la columna de QIAamp MinElute e incube la columna a temperatura ambiente (15-25°C) durante 15 min. Nota: como alternativa, para una incubación más rápida, caliente la columna de QIAamp MinElute abierta a una temperatura de 56°C durante 3 min.
18. Añada 80 µl de tampón AVE al centro de la membrana de la columna de QIAamp MinElute. Cierre el tapón e incube a temperatura ambiente (15-25°C) durante 1 min. Centrifugue a máxima velocidad (20000 x g, 14000 rpm) durante 1 min. Importante: asegúrese de que el tampón AVE está a temperatura ambiente. Generalmente, si se incuba la columna de QIAamp MinElute con tampón AVE durante 5 min a temperatura ambiente antes de centrifugar, aumenta la concentración.

Tabla 1. Volúmenes de tampón AL y mezcla de ARN transportador/tampón AVE requeridos para el procedimiento del equipo QIAamp MinElute Media.

MARISOL MASINO  
BIOQUÍMICA - M N 9483  
DT - TECNOLAB S.A.

943



N.º de muestras	Vol. tampón AL (mL)	Vol. ARN transportador/AVE (µL)
1	0.2	2
2	0.4	4
3	0.6	6
4	0.8	8
5	1	10
6	1.2	12
7	1.4	14
8	1.6	16
9	1.8	18
10	2	20
11	2.2	22
12	2.4	24
13	2.6	26
14	2.8	28
15	3	30
16	3.2	32
17	3.4	34
18	3.6	36
19	3.8	38
20	4	40
21	4.2	42
22	4.4	44
23	4.6	46
24	4.8	48

Almacene el ADN a -20°C o realice la amplificación.

Está disponible un procedimiento de ensayo automatizado. Póngase en contacto con Fujirebio Europe N.V. o con un distribuidor local para obtener más información.

#### Observaciones y precauciones

- Para evitar la contaminación de ADN, se recomienda una separación física máxima entre los pasos previos y posteriores a la amplificación: habitaciones separadas, pipetas y material de laboratorio diferentes, batas y guantes de laboratorio distintos (además de diferentes lugares de almacenamiento) son precauciones mínimas para evitar la contaminación y son parte de unas buenas prácticas de laboratorio. Los reactivos deben almacenarse aislados de fuentes de ADN contaminante, especialmente de productos de ADN amplificados. Evite también la contaminación microbiana de los reactivos.
- Evite devolver materiales de la habitación de post-amplificación a la habitación de pre-amplificación.
- Todas las puntas de pipeta y todos los tubos usados en el proceso de amplificación deben esterilizarse en autoclave. Se recomienda usar puntas de pipeta resistentes a aerosoles. Utilice una nueva punta de pipeta libre de ADN/DNasa para cada alícuota de muestra.
- Los reactivos para los procesos de amplificación deben manipularse en una habitación libre de ADN.

- Después de descongelar, agite la mezcla principal invirtiendo el vial tres veces, agite en vórtex el control positivo y centrifugue todos los reactivos.

#### Procedimiento de ensayo

##### Nota:

- Este protocolo se diseñó para una amplificación óptima en tubos de PCR de 0.2 ml en termocicladores GeneAmp PCR System 9700.
- Este protocolo se puede usar para la mayoría de los termocicladores comerciales, pero puede requerir algunos cambios indicados por el fabricante del termociclador.
- Antes de usar el protocolo, determine si éste es compatible con el termociclador usado en su laboratorio.
- Antes de usar el termociclador, asegúrese de que está calibrado.

#### Preparación de la mezcla de PCR

Es muy importante usar la cantidad correcta de cada componente. Una cantidad excesiva o insuficiente de muestra o de reactivos puede provocar una amplificación inespecífica o incluso la falta de amplificación.

Nota importante: Prepare la mezcla de PCR en hielo y evite retrasos innecesarios en la preparación del ensayo.

1. Determine el número de viales (N) que deben prepararse:  
N = número de muestras de ADN + 1 (control negativo; sin ADN) + 1 (CONTROL +)
2. Volumen de mezcla principal necesario para 1 muestra: 40.0 µl de mezcla principal
3. Divida esta mezcla principal en alícuotas de 40 µl en tubos de amplificación libres de ADN/DNasa. Cubra la mezcla de PCR con aceite mineral si es necesario.
4. Pipetee 10 µl del material extraído en la mezcla de PCR. Añada 10 µl de CONTROL + al tubo de control positivo. Añada 10 µl de agua destilada libre de ADN/DNasa al tubo de control negativo.
5. Coloque las muestras en el bloque térmico precalentado y calibrado (consulte las instrucciones del fabricante).  
Inicie el programa de amplificación diseñado para la amplificación de INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II*.

#### Perfil de PCR

Se debe seleccionar el perfil de temperatura correcto para la amplificación de INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II*.

Perfil de PCR de INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II* (tipo de termociclador: GeneAmp PCR System 9700):

Paso	Temp.	Tiempo	
1	37°C	10 min	Degradación de ADN que contiene uracilo
2	94°C	9 min	Inactivación de UNG y activación de la ADN-polimerasa AmpliTaq Gold 360
3	94°C	30 seg	Repetir ciclo pasos 3 a 5
4	52°C	45 seg	
5	72°C	45 seg	
			40 veces

**Paso**Mantener a  
72°C**Temp. Tiempo**

Duración &lt; 2 hrs

Retire los tubos del termociclador, e inmediatamente o almacene el amplicón a  $-20^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$  o realice el ensayo con el equipo INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II*.  
Nota: no almacene los productos de ADN amplificados con reactivos de amplificación.

**Resultados****Validación**

- Incluya como mínimo un control positivo y un control negativo cada vez que realice una amplificación. Como en cualquier procedimiento de laboratorio nuevo, se debe considerar la posibilidad de incluir controles positivos y negativos adicionales hasta que se alcance un grado de confianza elevado en la capacidad de realizar correctamente el procedimiento de ensayo.
- Si se desea introducir un control positivo adicional, use una muestra positiva conocida.

**Limitaciones del procedimiento**

- El uso de este producto debe estar limitado únicamente a personal bien formado en las técnicas de amplificación.
- El polvo de los guantes desechables y el hipoclorito sódico producen un efecto inhibitorio en la amplificación.
- Las muestras muy hemolizadas pueden inhibir la amplificación de la PCR y generar falsos negativos.
- No se ha realizado ningún experimento para probar el efecto de sustancias que pueden interferir en los resultados.
- La congelación y descongelación repetida de muestras de ADN puede provocar una amplificación menos eficiente.
- Una amplificación específica depende de unas buenas prácticas de laboratorio y una realización meticulosa de los procedimientos, como se especifica en **Observaciones y precauciones y en Recomendaciones sobre diseño y procedimientos de laboratorio.**

**Procedimiento de ensayo**

Consulte el manual de INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II*.

**Recomendaciones sobre diseño y procedimientos de laboratorio**

Se recomienda seguir la siguiente secuencia de operaciones:

1. Preparación y división en alícuotas de las mezclas de PCR.
2. Preparación de muestras (extracción de ADN).
3. Reacción en cadena de la polimerasa.
4. Análisis de productos de PCR biotinilados mediante hibridación reversa.

El personal involucrado en los pasos 3 y 4 no debe participar posteriormente en las tareas de los pasos 1 y 2 en el mismo día. De manera similar, después de realizar el paso 2 no se debe trabajar posteriormente en el paso 1 en el mismo día.

MARISOL MASINO  
BIOQUÍMICA - M.N. 8483  
DT - TECNOLAB S.A.

Para evitar la contaminación de muestras (p. ej., con amplicones) y evitar resultados falsos positivos, el procedimiento debe realizarse en tres habitaciones separadas — físicamente, cada una con su propio material necesario (p. ej., pipetas). Se necesita una habitación para la preparación de reactivos, otra para la preparación de muestras y una tercera para la amplificación y la detección de amplicones. Todo el equipo debe mantenerse en la habitación en la que se utiliza y no debe trasladarse de una habitación a otra.

Se deben usar puntas de pipeta resistentes a aerosoles para evitar la contaminación cruzada entre muestras. Por la misma razón, se deben usar guantes de exploración desechables y renovarlos frecuentemente.

**Habitación 1 - almacenamiento y preparación de reactivos**

Esta habitación y su equipamiento deben mantenerse **libres de ADN**. Esta habitación sólo debe usarse para preparar reactivos de PCR. El control positivo no se debe introducir en la Habitación 1. El personal involucrado debe usar una bata de laboratorio limpia, que no debe ser usada fuera de esta habitación. Para manipular reactivos utilice guantes desechables.

**Habitación 2 - preparación de muestras**

Esta habitación y su equipamiento deben mantenerse **libres de amplicones**. El personal involucrado en el procesamiento de muestras debe usar una bata de laboratorio limpia, que no debe ser usada fuera de esta habitación. Durante la preparación de muestras, se deben usar guantes de exploración desechables y renovarlos frecuentemente. Abra con cuidado los viales que contienen la muestra (procesada). Evite abrir más de un vial de reacción de muestra a la vez.

Para evitar la contaminación o para limpiar superficies contaminadas, se recomienda limpiar las pipetas y las superficies de trabajo con DNAZap (Ambion). Tenga en cuenta que el uso de DNAZap sólo es una medida de precaución adicional y las recomendaciones descritas en el diseño y los procedimientos de laboratorio deben seguirse lo más estrictamente posible.

**Habitación 3 - amplificación y detección de amplicones**

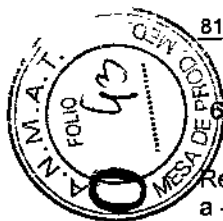
El personal involucrado en la amplificación y detección de amplicones debe usar una bata de laboratorio limpia, que no debe ser usada fuera de esta habitación y que debe cambiarse diariamente. Para trabajar con amplicones, utilice guantes de exploración desechables.

**Licencias**

La compra de este producto autoriza al comprador el derecho a usarlo para la amplificación de secuencias de ácido nucleico para diagnóstico *in vitro* en humanos, en conformidad con el método patentado descrito en el manual del producto. No se otorga ninguna patente general ni ninguna licencia de otro tipo aparte del derecho específico de uso adquirido con la compra.

Este producto se vende mediante contrato de concesión de licencia establecido entre Fujirebio Europe N.V. e Invitrogen IP Holdings, Inc.

El precio de compra de este producto incluye derechos limitados e intransferibles protegidos por las patentes europeas 0401037, 0522884 y 0415755, y las patentes



9430

extranjeras correspondientes, distintas de las patentes de Estados Unidos, que son propiedad de Invitrogen Corporation para el uso exclusivo de esta cantidad de producto a fin de poner en práctica lo descrito en dichas patentes únicamente para actividades del comprador relacionadas con la detección del virus de papiloma humano (HPV) en el campo del diagnóstico en humanos. No se otorgan otros derechos.

Para obtener más información sobre la adquisición de licencias sujetas a las patentes anteriores, póngase en contacto con el Departamento de Licencias, Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, CA 92008. Correo electrónico: [outlicensing@invitrogen.com](mailto:outlicensing@invitrogen.com).

#### **Marcas comerciales**

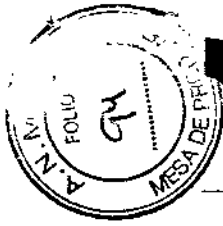
- INNO-LiPA es una marca comercial™ internacional en EEUU.
- DNAZap™ es una marca comercial de Ambion Inc. (Estados Unidos).
- PreservCyt® es una marca comercial registrada de Hologic Inc. (Estados Unidos).
- Surepath™ es una marca comercial de BD Diagnostics (Estados Unidos).
- AmpliTaq Gold® es una marca comercial registrada en Estados Unidos de Roche Molecular Systems Inc (Estados Unidos).
- GeneAmp® es una marca comercial registrada de Applied Biosystems, LLC.
- QIAamp® es una marca comercial registrada del grupo QIAGEN.

#### **Referencias**

- Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 2000;38:357-361.
- Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, Glass AG, et al. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis.* 1994;169:235-240.
- Jacobs MV, Snijders PJ, van den Brule AJ, Helmerhorst TJ, et al. A general primer GP5+/GP6(+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol.* 1997;35:791-795.
- Kleter B, van Doorn LJ, ter Schegget J, Schrauwen L, et al. Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am J Pathol.* 1998;153:1731-1739.
- Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol.* 2005;32S:S43-S51.
- Safaeian M, Herrero R, Hildesheim A, Quint W, et al. Comparison of the SPF10-LiPA system to the Hybrid Capture 2 assay for detection of carcinogenic human papillomavirus genotypes among 5683 young women in Guanacaste, Costa Rica. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1447-1454.







# FUJIREBIO

9430

KEYCODE: FRI59684

81534 INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II

B31016 v0

2014-03-24

p 1/16

Español

81534 INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II / B31016 v0 / KEY-CODE: FRI59684

p2/16

## INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II



### Fabricado por:

Fujirebio Europe N.V.  
Technologiepark 6  
9052 Gent  
Belgium  
☎+32 9 329 13 29  
BTW BE 0427.550.660  
RPR Gent

### Distribuido por:

Fujirebio Germany GmbH  
Hans-Böckler-Allee 20  
30173 Hannover  
Germany  
☎+49 511 857 39 31

Fujirebio Italia S.r.l.  
Via Vaccareccia 39/A  
00040 Pomezia (Roma)  
Italy  
☎+39 06 965 28 700

Fujirebio France SARL  
Les Conquéranants, Bât. Le Kilimandjaro  
8/10, avenue des Tropiques  
91940 Les Ulis  
France  
☎+33 1 69 07 48 34

Fujirebio Iberia S.L.  
Calle Tarragona 161, Planta 14  
08014 Barcelona  
Spain  
☎+34 93 270 53 00

Fujirebio Europe N.V.  
Technologiepark 6  
9052 Gent  
Belgium  
☎+32 9 329 13 29

© Fujirebio Europe N.V.



**tecnolab s.a.**  
estomba 964 c1427cov  
capital federal, argentina  
tel. 54 11 4555 0010  
54 11 4859 5300  
fax 54 11 4553 3331  
info@tecnolab.com.ar  
www.tecnolab.com.ar  
ISO 9001:2008 certificada

MARISOL MASINO  
BIOQUIMICA N.º 6483  
DT - TECNOLAB S.A.

### Índice

Símbolos utilizados .....	2
Uso al que está destinado .....	3
Principio del ensayo .....	3
Reactivos .....	4
<i>Descripción, preparación para el uso y condiciones de almacenamiento recomendadas</i> .....	4
Reactivos suministrados: .....	4
Materiales necesarios pero no suministrados .....	5
Seguridad y medio ambiente .....	6
Muestras .....	7
Observaciones y precauciones .....	7
Procedimientos de preparación y manipulación .....	8
<i>Manipulación de tiras</i> .....	8
Procedimiento de ensayo manual .....	8
<i>Instrucciones para la incubación</i> .....	8
<i>Instrucciones para cambiar el líquido de las cubetas</i> .....	9
<i>Hibridación</i> .....	9
<i>Lavado astringente</i> .....	10
<i>Revelado de color</i> .....	10
Procedimiento de ensayo automatizado .....	11
Resultados .....	11
<i>Lectura</i> .....	11
<i>Control de calidad</i> .....	11
<i>Interpretación de los resultados</i> .....	12
Programa de interpretación: LiRAS for LiPA HPV .....	13
Limitaciones del procedimiento .....	13
Recomendaciones sobre el diseño y procedimientos de laboratorio .....	14
Procedimiento de ensayo .....	15
<i>Inclusividad</i> .....	15
<i>Concordancia</i> .....	15
<i>Programa LiRAS for LiPA HPV</i> .....	15
<i>Precisión</i> .....	16
<i>Sensibilidad analítica</i> .....	16
Licencias .....	16
Marcas comerciales .....	16

### Símbolos utilizados



Fabricante



Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*



Código de lote



Número de catálogo



Fecha de caducidad



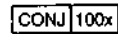
Consulte las instrucciones de uso



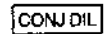
Límite de temperatura



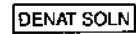
Contenido suficiente para &lt;n&gt; ensayos



Conjugado 100x



Diluyente de conjugado



Solución de desnaturalización



Solución de hibridación



Solución de lavado 5x



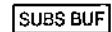
Solución de lavado astringente



Tiras



Sustrato BCIP/NBT 100x



Tampón sustrato

### Uso al que está destinado

INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II* es un ensayo de sondas en tira para uso en diagnóstico *in vitro*, diseñado para la detección cualitativa e identificación de los genotipos del virus del papiloma humano (HPV) mediante la detección de secuencias específicas en la región L1 del genoma de HPV. Se detectan e identifican los siguientes genotipos de HPV:

- HPV HR\* GT: 16, 18, 31,33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68
- HPV pHR\* GT: 26, 53, 66, 70, 73, 82
- HPV LR\* o GT no clasificado: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 67, 81, 83, 89

(\*) La designación de HR, pHR o LR es solo para fines informativos, y se basa en publicaciones de Muñoz *et. al.* (2003) e IARC Monographs Volume 100B (2012).

### Principio del ensayo

INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II* se basa en el principio de hibridación reversa. Se amplifica parte de la región L1 (región SPF10) del genoma del virus del papiloma humano (HPV) con cebadores específicos de HPV, y los amplicones biotinilados resultantes se desnaturalizan y se hibridan con sondas de oligonucleótidos específicas. Se añade cebador adicional para la amplificación del gen HLA-DPB1 humano, para controlar la calidad y extracción de la muestra. Todas las sondas se inmovilizan como bandas paralelas en tiras de membrana. Después de la hibridación y el lavado astringente, se añade fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina, que se une a cualquier híbrido biotinilado formado previamente.

La incubación con el cromógeno BCIP/NBT produce un precipitado de color púrpura y los resultados se pueden interpretar de forma visual o con el programa LIRAS for LiPA HPV.

Está disponible un equipo de amplificación (INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II* Amp) para la preparación estandarizada de material amplificado biotinilado. Este equipo de amplificación se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante cebadores SPF10.

Fujirebio Europe N.V. ha protegido la aplicación de SPF10 en el equipo INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II* mediante las siguientes patentes: EP-1012348B, US-6,482,588B y sus equivalentes extranjeras.

Posteriormente, los productos de amplificación se hibridan con una única tira de identificación de tipo en la que están fijadas 32 sondas de ADN específicas de secuencia y 4 bandas de control (vea la Figura 1).

Ensayo INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II*: pasos necesarios

Paso 1 Amplificación del ADN extraído.

Paso 2 Hibridación del producto amplificado en la tira, seguida de un lavado astringente.

Paso 3 Adición de conjugado y sustrato, que produce el revelado de color.

Paso 4 Interpretación visual del patrón de reactividad o utilización del programa LIRAS for LiPA HPV.

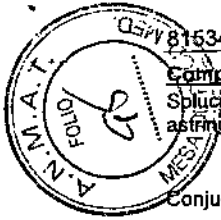
### Reactivos

#### Descripción, preparación para el uso y condiciones de almacenamiento recomendadas

- Si los reactivos se mantienen a 2-8°C y se almacenan en los viales originales, abiertos o sin abrir, permanecerán estables hasta la fecha de caducidad del equipo. **No utilice reactivos caducados. No congele ninguno de los reactivos.**
- Los reactivos deben almacenarse aislados de fuentes de ADN contaminante, especialmente de productos amplificados.
- Aproximadamente 60 minutos antes de su uso, deben ponerse todos los reactivos y el tubo que contiene las tiras, a temperatura ambiente (20-25°C); después de su uso, deben devolverse inmediatamente a la nevera.
- Cualquier alteración física de los componentes del equipo, puede indicar inestabilidad o deterioro.
- Para minimizar la posibilidad de que las tiras se enrolen antes de usarse, se recomienda almacenar el tubo horizontalmente.

#### Reactivos suministrados:

Componente	Cantidad	Ref.	Descripción
Tiras	1x 20	60584	Contiene 20 tiras de INNO-LiPA HPV Genotyping <i>Extra II</i> marcadas con una línea de marca de color azul.
Solución de desnaturalización	1x 1 mL	56718	Solución alcalina con EDTA. Este vial debe cerrarse inmediatamente después de usarse; una exposición prolongada de esta solución al aire produce un rápido deterioro de la eficacia de la desnaturalización.
Solución de hibridación	1x 80 mL	57420	Tampón SSC con lauril sulfato de sodio (SLS) y 0.01% MIT/<0.1% CAA como conservante, que debe precalentarse a una temperatura mínima de 37°C y no debe superar los 49°C.



9430

Componente	Cantidad	Ref.	Descripción
Solución de lavado aséptico	1x 200 mL	57421	Tampón SSC con SLS y 0.01% MIT/<0.1% CAA como conservante, que debe precalentarse a una temperatura mínima de 37°C y no debe superar los 49°C.
Conjugado 100x	1x 0.8 mL	56952	Estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina en tampón Tris con estabilizadores de proteínas y 0.01% MIT/<0.1% CAA como conservante. Debe diluirse 1/100 en Diluyente de Conjugado: prepare 2 mL de solución de Conjugado de trabajo para cada cubeta de ensayo + 2 mL adicionales para ensayo manual. La solución de Conjugado de trabajo se mantiene estable durante 8 horas a temperatura ambiente (20-25°C) si se almacena en un lugar oscuro.
Diluyente de conjugado	1x 80 mL	56951	Tampón fosfato con NaCl, Triton, estabilizadores de proteínas y 0.01% MIT/<0.1% CAA como conservante.
Sustrato BCIP/NBT 100x	1x 0.8 mL	56954	BCIP y NBT en DMF. Debe diluirse 1/100 en Tampón Sustrato antes de usarse: prepare 2 mL de solución de Sustrato de trabajo para cada cubeta de ensayo + 2 mL adicionales para ensayo manual. La solución de Sustrato de trabajo se mantiene estable durante 8 horas a temperatura ambiente (20-25°C) si se almacena en un lugar oscuro.
Tampón sustrato	1x 180 mL	56953	Tampón Tris con NaCl, MgCl <sub>2</sub> , 0.01% MIT/<0.1% CAA como conservante.
Solución de lavado 5x	1x 80 mL	56721	Tampón fosfato con NaCl, Triton y 0.05% MIT/0.48% CAA como conservante. Debe diluirse 1/5 en agua destilada o desionizada antes de usarse: prepare 8 mL de solución de lavado de trabajo para cada cubeta de ensayo + 10 mL adicionales para ensayo manual. La solución de lavado de trabajo se mantiene estable durante 2 semanas a 2 - 8°C.
Bandejas de incubación	3	-	
Tarjeta de lectura	1	-	Para identificación de las sondas positivas
Hoja de registro de datos	1	-	Para almacenar las tiras reveladas.

**Materiales necesarios pero no suministrados**

- INNO-LIPA HPV Genotyping Extra II Amp.
- Agua destilada o desionizada.
- Guantes desechables
- Puntas de pipeta libres de DNA/DNasa desechables (resistentes a aerosoles).
- Pinzas para manipular tiras.
- Probetas graduadas (10, 25, 50 y 100 mL).
- Pipetas ajustables que permitan pipetear 1 - 20 µL, 20 - 200 µL y 200 - 1000 µL.
- Vórtex o equivalente.
- Microcentrifuga.

**Materiales necesarios únicamente para el procedimiento manual:**

- Baño de agua con plataforma de agitación (80 rpm; con tapa inclinada; temperatura ajustable a 49°C ± 0.5°C).

MARISOL MASINO  
BIOQUÍMICA - N.º 9483  
DT - TECNO LAB S.A.

- Aparato de aspiración.
- Termómetro calibrado.
- Agitador de plataforma orbital, de movimiento recíproco o de balanceo.

**Recomendaciones**

**Para un agitador orbital:**

- El diámetro del movimiento circular debe ser igual o mayor que 13 mm.
- La velocidad recomendada para un movimiento circular de 13 mm es de 160 rpm.

**Para un agitador de movimiento recíproco:**

- La velocidad recomendada para el movimiento de ida y vuelta es de 80 movimientos por minuto.

**Para un agitador de plataforma de balanceo:**

- El ángulo de agitación no debe superar los 13° para evitar que el líquido se derrame.
- La velocidad recomendada es 50 rpm.
- Multipipeta de dispensación (Eppendorf, opcional).
- Cronómetro, 2 horas (± 1 minuto).

**Seguridad y medio ambiente**

Consulte la ficha de datos de seguridad (FDS) y el etiquetado del producto para obtener información acerca de componentes potencialmente peligrosos. La versión más reciente de la FDS se encuentra disponible en la página Web: [www.fujirebio-europe.com](http://www.fujirebio-europe.com).



**Peligro:** DENAT SOLN

H314 P260 P280 P303+P361+P353 P305+P351+P338 P310 P363



**Atención:** Contiene 2-cloroacetamida: RINSE SOLN 5x

H317 P261 P280 P333+P313 P363 P302+P352



**Peligro:** Contiene N,N-Dimetilformamida y dicloruro de 5,5'-difenil-3,3'-bis(4-nitrofenil)-2,2'-(3,3'-dimetoxibifenil-4,4'-ilen)ditetrazolio: SUBS BCIP/NBT 100x

H312 H319 H332 H360D

P201 P261 P280 P281 P305+P351+P338 P308+P313

**Indicaciones de peligro**

- H312 Nocivo en contacto con la piel.
- H314 Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.
- H317 Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
- H319 Provoca irritación ocular grave.
- H332 Nocivo en caso de inhalación.
- H360D Puede dañar al feto.

**Consejos de prudencia**

- P201 Pedir instrucciones especiales antes del uso.
- P260 No respirar la niebla/los vapores/el aerosol.
- P261 Evitar respirar la niebla/los vapores/el aerosol.

- P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.  
 P281 Utilizar el equipo de protección individual obligatorio.  
 P302+P352 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.  
 P303+P361+P353 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitarse inmediatamente las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua o ducharse.  
 P305+P351+P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.  
 P308+P313 EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico.  
 P310 Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACION TOXICOLOGICA o a un médico.  
 P333+P313 En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.  
 P363 Lavar las prendas contaminadas antes de volver a usarlas.

- Las muestras deben manipularse siempre como productos potencialmente infecciosos. Por lo tanto, toda la sangre y hemoderivados, y los materiales biológicos, deberán considerarse como potencialmente infecciosos y manipularse como tales. Únicamente el personal debidamente capacitado debe llevar a cabo el procedimiento de ensayo.
- Toda la sangre y hemoderivados, y todos los materiales biológicos, deben desecharse de acuerdo con los procedimientos de seguridad establecidos.
  - Esterilice en autoclave durante 15 minutos como mínimo a 121°C.
  - Incinere el material desechable.
  - Mezcle los residuos líquidos con hipoclorito sódico (lejía) hasta obtener una concentración final de  $\pm 1\%$  de hipoclorito sódico. Déjelos reposar durante toda la noche antes de eliminarlos.  
 PRECAUCIÓN: neutralice los residuos líquidos que contengan ácido antes de añadir el hipoclorito sódico.
- Es necesario usar equipo de protección personal (guantes y gafas de seguridad) para manipular agentes peligrosos o infecciosos.
- Deseche los residuos de acuerdo con las normas de manejo de residuos de su institución. También se deben cumplir todas las normativas medioambientales internacionales, nacionales, regionales y locales.

### Muestras

Debido a que el ensayo INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II* utiliza material de ADN amplificado biotinilado como muestra, un equipo de amplificación está disponible, el INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II* Amp.

### Observaciones y precauciones

- Solo para uso profesional
- No mezclar reactivos de equipos distintos a menos que los componentes tengan el mismo número de lote,
- No reutilizar material de laboratorio desechable.

- Todos los recipientes usados para preparar soluciones de conjugado y sustrato deben limpiarse meticulosamente y aclararse con agua destilada.
- Evitar la contaminación microbiana de los reactivos.
- Debe usarse una punta de pipeta nueva libre de DNA/DNasa para cada alícuota de muestra. Se recomienda usar puntas de pipeta desechables, resistentes a aerosoles y en envase estéril.

### Procedimientos de preparación y manipulación

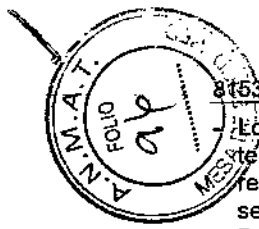
#### Manipulación de tiras

- Las tiras están diseñadas para un único uso!
- No toque las tiras con las manos; use pinzas limpias.
- Use un lápiz para identificar las tiras de ensayo. No use bolígrafo, etc. Escriba la identificación por encima de la línea de marca de las tiras.
- Coloque las tiras de ensayo en las cubetas, con la membrana recubierta orientada hacia arriba (este lado está marcado).
- Las tiras de ensayo deben permanecer siempre en la misma cubeta durante todos los pasos de la incubación.
- Las tiras sin usar o reveladas deben mantenerse protegidas de luz o calor intensos.
- Deje que las tiras se sequen completamente antes de interpretarlas, cubriéndolas y almacenarlas.
- Las tiras secas reveladas deben almacenarse preferiblemente en un lugar oscuro a temperatura ambiente (20-25°C).
- No reutilice las cubetas.

### Procedimiento de ensayo manual

#### Instrucciones para la incubación

- Las incubaciones con la solución de hibridación y de lavado astringente deben realizarse a una temperatura **exacta de 49°C**; estos son los pasos más importantes para evitar falsos positivos (temperatura demasiado baja) o falsos negativos/señales muy débiles (temperatura demasiado alta). Un baño de agua agitada con tapa **inclinada** permite un buen control de las variaciones de temperatura. Es necesario un control de temperatura estricto (con un margen de 0.5°C con respecto al punto de referencia de 49°C) con un termómetro calibrado.
- **Cierre siempre la tapa del baño de agua durante las incubaciones para evitar bandas falso positivas.**
- **No use un agitador de aire caliente para la hibridación y el lavado astringente.**
- La amplitud del movimiento generado por el baño de agitación de agua (procedimiento de hibridación y lavado astringente) y el agitador orbital, de movimiento recíproco o de plataforma de balanceo (procedimiento de revelado de color) es fundamental para alcanzar la máxima sensibilidad y una coloración homogénea. La amplitud debe ser lo mayor posible, de forma que tanto el líquido como las tiras de ensayo se muevan de un lado a otro en la cubeta. Sin embargo, debe evitarse el derramamiento de líquido por los bordes de las cubetas.
- Para la hibridación y el lavado astringente, las cubetas deben colocarse en la plataforma de agitación del baño de agua. Ajuste el nivel de agua entre 1/3 y 1/2 de la altura de la cubeta. Asegúrese de que las cubetas no flotan en el agua. El agua debe estar en contacto directo con las cubetas.



9430

Los pasos de incubación para el revelado de color deben realizarse a una temperatura entre 20 y 25°C. Si la temperatura es inferior a 20°C se obtendrán resultados menos intensos. Si la temperatura es superior a 25°C, pueden obtenerse señales intensas de ruido de fondo o falsos positivos.

- Debe respetarse estrictamente los tiempos de incubación especificados para garantizar el correcto funcionamiento del ensayo.
- No tape la bandeja. Durante las incubaciones de hibridación y lavado astringente, las cubetas deben dejarse destapadas en el baño de agua. Si se tapan las cubetas con selladores de microplaca puede producirse contaminación cruzada.

**Instrucciones para cambiar el líquido de las cubetas**

- aspire el líquido de la cubeta con una pipeta, preferiblemente conectada a un aspirador de vacío. Sostenga la bandeja inclinándola un ángulo que permita al líquido fluir completamente hacia un extremo de la cubeta.
- Añada a cada cubeta 2 mL de la solución apropiada y siga el protocolo.
- NOTA: Una multipipeta de dispensación (Eppendorf) es útil para este fin.
- Repita este paso las veces indicadas en el protocolo de ensayo.
- NOTA:
  - Evite que las tiras se sequen entre los pasos de lavado.
  - Evite dañar la superficie de las tiras al aspirar. aspire, preferiblemente, el líquido de la parte superior de la tira, por encima de la línea de marca.
  - Asegúrese de lavar toda la tira meticulosamente, sumergiéndola completamente en la solución.
  - Modifique la velocidad del agitador si es necesario.

**Hibridación**

NOTA: Use guantes desechables y pinzas.

1. Caliente un baño de agitación de agua a una temperatura exacta de 49°C. Compruebe la temperatura con un termómetro calibrado y ajústela si es necesario. Precaliente la solución de hibridación y la solución de lavado astringente a una temperatura mínima de 37°C, sin superar 49°C. Mézclelas antes de usar.
2. Use pinzas para retirar el número necesario de tiras de ensayo del tubo (1 tira por muestra) y use un lápiz para escribir un número de identificación por encima de la marca de cada tira.
3. Coloque en la bandeja el número necesario de cubetas de ensayo (1 cubeta por tira).
4. Pipetee 10 µL de solución de desnaturalización en la esquina superior de cada cubeta.

NOTA: Cierre el vial inmediatamente después de usarlo.

5. Añada 10 µL de producto amplificado biotinilado en la solución de desnaturalización y mezcle con cuidado pipeteando hacia arriba y hacia abajo varias veces. Use siempre puntas de pipeta resistentes a aerosoles y libres de ADN/ADNasa. Permita que se produzca la desnaturalización durante 5 minutos a temperatura ambiente (20-25°C).

6. Agite la solución de hibridación precalentada y añada con cuidado 2 mL al producto amplificado desnaturalizado en cada cubeta. Evite contaminar las cubetas adyacentes al pipetear.

7. Coloque inmediatamente la tira en la cubeta. Las tiras deben quedar completamente sumergidas en la solución.
8. Coloque la bandeja en el baño de agua de agitación a 49°C (aproximadamente 80 rpm; vea Instrucciones para la incubación), cierre la tapa e incube durante 60 minutos.

NOTA: Evite salpicar la cubeta con agua del baño de agitación. Ajuste el nivel de agua a un nivel entre 1/3 y 1/2 de la altura de la cubeta.

**Lavado astringente**

- Después de la hibridación, retire la bandeja del baño de agua.
- Sostenga la bandeja ligeramente inclinada y aspire el líquido de la cubeta con una pipeta, preferiblemente conectada a un aspirador de vacío. Añada 2 mL de solución de lavado astringente precalentada a cada cubeta y lave agitando la bandeja durante 10 - 20 segundos a temperatura ambiente. aspire la solución de cada cubeta.
- Repita este paso de lavado una vez (vea también Instrucciones para cambiar el líquido de las cubetas).
- Por último, aspire la solución e incube cada tira con 2 mL de solución de lavado astringente precalentada en el baño de agua de agitación a 49°C durante 30 minutos. Cierre la tapa del baño de agua.

NOTA: Prepare solución de lavado y solución de conjugado durante la incubación con el lavado astringente (vea Reactivos).

**Revelado de color**

Todas las incubaciones posteriores deben realizarse a 20-25°C en un agitador.

1. Lave cada tira dos veces durante 1 minuto con 2 mL de solución de lavado diluida (vea Instrucciones para cambiar el líquido de las cubetas). aspire.
2. Añada a cada cubeta 2 mL de solución de conjugado e incube durante 30 minutos a la vez que se agita la bandeja. aspire.

NOTA: Prepare solución de sustrato unos 10 minutos antes del final de la incubación de conjugado (vea Reactivos).

3. Lave cada tira dos veces durante 1 minuto con 2 mL de solución de lavado diluida y lave una vez más con 2 mL de tampón sustrato. aspire.
4. Añada a cada cubeta 2 mL de solución de sustrato e incube durante 30 minutos a la vez que se agita la bandeja. aspire.
5. Detenga el revelado de color lavando las tiras dos veces en 2 mL de agua destilada a la vez que agita durante 3 minutos como mínimo.
6. Use pinzas para retirar las tiras de las cubetas y colóquelas sobre papel absorbente. Deje que las tiras se sequen completamente y fíjelas a la hoja de registro de datos.

La banda superior es la línea de marca. La banda de control de conjugado ayuda a alinear correctamente las tiras en la hoja de registro de datos.

  
 MARISOL MASINO  
 BIOQUÍMICA - M/N 9483  
 DT - TECNOLAB S.A.



**Procedimiento de ensayo automatizado**

Está disponible un procedimiento de ensayo automatizado. Póngase en contacto con Fujirebio Europe N.V. o con su distribuidor local para obtener más información.

**Resultados****Lectura**

Espera a que las tiras estén completamente secas para leerlas. Todas las bandas visibles deben identificarse con la tarjeta de lectura de INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II*, alineando la línea azul de la tira con la línea de marca de la tarjeta de lectura.

La Figura 1 ilustra la posición de las distintas sondas de oligonucleótido de la tira de INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II*. Una banda se considera positiva si aparece una franja de color púrpura o marrón al final del procedimiento de ensayo.

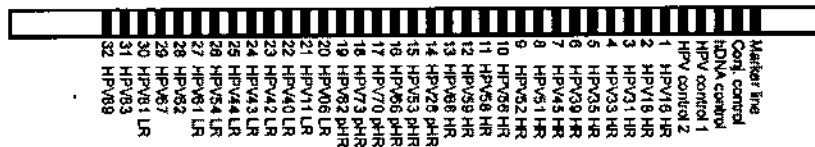


Figura 1: Ubicación de las sondas específicas en la tira de INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II*. En la parte superior de la tira hay una línea de marca para su orientación. Esta línea es azul y esta diferencia de color permite distinguirla de la tira de INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra*.

**Control de calidad**

- La primera banda (inmediatamente por debajo de la línea de marca) es la banda de Control de Conjugado. Esta banda controla la adición de solución de conjugado y de sustrato durante el procedimiento de detección. Siempre debe ser positiva y debe tener aproximadamente la misma intensidad en cada tira para un mismo ensayo. Un resultado negativo en la banda de Control de Conjugado indica un error en el revelado de color durante el ensayo. El resultado del ensayo debe considerarse como no válido y se recomienda repetir el ensayo LiPA.
- La segunda banda es una banda de control de ADN humano. Se añaden los cebadores que amplifican un fragmento del gen HLA-DPB1 humano al equipo de amplificación de HPV para controlar la calidad de la muestra y la eficiencia de la extracción. Esta banda siempre debe ser positiva; sin embargo, si en la muestra hubiera una gran cantidad de HPV, es posible que la banda de control de ADN humano sea negativa, a causa de la competencia entre el ADN de HPV y el ADN humano.
- Incluya siempre un control de ensayo positivo: p. ej., el control de amplificación positivo incluido en el equipo INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II* Amp. El control positivo contiene HPV6 y HLA-DPB1, y debe reaccionar con las siguientes bandas: Control Conj, control de ADN humano, control de HPV 1 y banda 20 (HPV6). Si se obtiene un patrón de LiPA negativo o distinto para el control positivo, se debe descartar todo el ensayo y repetir el procedimiento completo desde la PCR.
- Incluya siempre un control de ensayo negativo que, preferiblemente, sea una muestra negativa que se procese simultáneamente con las muestras de pacientes durante los pasos de extracción de ADN y PCR. Si se obtiene una banda positiva

en el LiPA para el control negativo (excepto para el control de ADN humano que debe ser positivo en caso de una muestra clínica negativa de HPV), se debe descartar todo el ensayo y repetir el procedimiento completo desde la extracción de ADN.

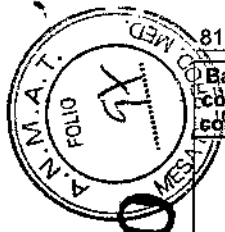
**Interpretación de los resultados**

- Una muestra se considera positiva para HPV si al menos una de las bandas específicas de tipo es positiva, o si una de las bandas de control de HPV es positiva.
- Las muestras que no generan ninguna banda específica de tipo positiva (bandas 1 - 32) pero tienen al menos una banda de control de HPV positiva, deben clasificarse como positivas para HPV, pero de tipo no identificable ("HPVX").
- Si hay más de una banda de genotipo de HPV, significa que está presente una mezcla de esos genotipos de HPV.
- Una muestra se considera negativa para HPV si la banda de control de ADN humano es positiva y todas las bandas específicas de tipo de HPV (incluidas las bandas de control de HPV) son negativas.
- Si ninguna de las bandas específicas de tipo de HPV es positiva y la banda de control de ADN humano es negativa, se debe considerar que el resultado del ensayo no es válido. Este resultado de ensayo puede indicar que la recolección o el procesamiento de muestras fue inadecuado, o la presencia de inhibidores en el ADN extraído. En el segundo caso, el ensayo de una dilución 1:10 del ADN extraído puede mejorar el rendimiento de la amplificación. Si no se obtiene un resultado correcto, inicie el procedimiento completo con otra alícuota de la muestra.
- Una señal positiva en como mínimo 7 de 12 bandas consecutivas en una tira debe interpretarse como un resultado posiblemente no válido. Es recomendable repetir todo el procedimiento desde la extracción de ADN para esta muestra. Si se obtiene el mismo resultado, puede ser un resultado auténtico para determinadas poblaciones, como las personas inmunodeficientes, con múltiples infecciones\*. (\* Como se describe en Wheeler *et. al.* 2006. Human Papillomavirus Genotypes and the Cumulative 2-Year Risk of Cervical Precancer. J Infect Dis. 2006;194:1291-1299).

Resumen de resultados de interpretación de tira:

**Tabla 1:** Resumen de resultados de interpretación de tira

Banda de control de conjugado	Resultado de ADN humano	Resultado de HPV	Interpretación
-	+ o -	+ o -	<b>Resultado no válido</b> Un resultado negativo en la banda de Control de Conjugado indica un error en el revelado de color del ensayo. Se recomienda repetir el ensayo LiPA.
+	-	-	<b>Resultado válido en el caso de una muestra de control negativa</b> <b>Resultado no válido en el caso de una muestra humana</b> Un resultado negativo en la banda de control de ADN humano indica que la recolección o el procesamiento de muestras fue inadecuado, o la presencia de inhibidores en



9430

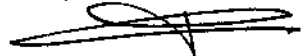
Banda de control de conjugado	Resultado de ADN humano	Resultado de HPV	Interpretación
			el ADN extraído. En el segundo caso, el ensayo de una dilución 1:10 del ADN extraído puede mejorar el rendimiento de la amplificación. Si no se obtiene un resultado correcto, inicie el procedimiento con otra alícuota de la muestra.
+	+	-	<b>HPV no detectado</b> Un resultado negativo en las bandas de control de HPV y las bandas específicas de tipo indican la ausencia de ADN de HPV, pero no permite descartar la presencia de una infección con HPV.
+	+ o -	+	<b>HPV detectado</b> Un resultado positivo en como mínimo una de las bandas específicas de tipo o una de las bandas de control de HPV indica la presencia de ADN de HPV. La presencia de genotipos de HPV adicionales no se puede descartar. Si en la muestra hay una gran cantidad de HPV, es posible que la banda de control de ADN humano sea negativa, a causa de la competencia entre el ADN de HPV y el ADN humano.
+	+ o -	≥ 7 de 12 bandas consecutivas positivas	<b>Resultado no interpretable</b> Una señal positiva en como mínimo 7 de 12 bandas consecutivas en una tira debe interpretarse como un resultado posiblemente no válido. Es recomendable repetir todo el procedimiento desde la extracción de ADN para esta muestra. Si se obtiene el mismo resultado, puede ser un resultado auténtico de determinación de genotipo para determinadas poblaciones, como las personas inmunodeficientes, con múltiples infecciones.

**Programa de interpretación: LiRAS for LiPA HPV**

El programa LiRAS for LiPA HPV está diseñado para ayudar a interpretar los resultados de INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II. Póngase en contacto con su distribuidor local para obtener la versión más reciente. Compare siempre el patrón de la tira y la información del paciente mostrada en el informe con la tira original para asegurarse de que la tira se ha identificado, alineado y escaneado correctamente.

**Limitaciones del procedimiento**

- Las infecciones con genotipo de HPV mixto son comunes. El equipo INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II Amp usa un conjunto de cebadores que amplifican todos los genotipos simultáneamente.
- A causa de la competencia de la PCR y la ausencia de genotipos concretos en la tira, es posible que no se detecten determinados genotipos presentes en la muestra coinfectada.
- Si está presente HPV52, puede observarse una reactividad débil no específica en la banda de sonda HPV31, a causa de secuencias homólogas.

  
**MARISOL MASINO**  
 BIOQUIMICA - M N 9483  
 JT - TECNOLAB S.A.

**Recomendaciones sobre el diseño y procedimientos de laboratorio**

Se recomienda la siguiente secuencia de operaciones:

1. Preparación de las alícuotas de las mezclas de PCR.
2. Preparación de las muestras (aislamiento de ADN).
3. Reacción en cadena de la polimerasa.
4. Análisis de los productos de PCR biotinilados mediante hibridación reversa.

El personal involucrado en los pasos 3 y 4 no debe participar posteriormente en las tareas de los pasos 1 y 2 en el mismo día. De manera similar, después de participar en el paso 2 no se debe trabajar posteriormente en el paso 1 en el mismo día.

Para evitar la contaminación (p. ej., con amplicones) de muestras y evitar falsos positivos, el procedimiento debe realizarse en tres habitaciones separadas físicamente, cada una con su propio conjunto de suministros y pipetas. Es necesaria una habitación para la preparación de reactivos, otra para la preparación de las muestras y otra más para la amplificación y la detección de amplicones. Todo el material debe mantenerse en la habitación en la que se utiliza; no se debe trasladar de una habitación a otra.

Deben usarse puntas de pipeta resistentes a aerosoles para evitar la contaminación cruzada entre muestras. Por la misma razón, se deben usar guantes de exploración desechables y renovarlos frecuentemente.

**Habitación 1 - almacenamiento y preparación de reactivos**

Esta habitación y su equipamiento deben mantenerse libres de ADN. Esta habitación solo se debe usar para preparar los reactivos de PCR. El control de PCR no se debe introducir en la Habitación 1.

El personal involucrado debe usar una bata de laboratorio limpia, que no debe ser usada fuera de esta habitación. Usar guantes desechables para manipular los reactivos.

**Habitación 2 - preparación de las muestras**

Esta habitación y su equipamiento deben mantenerse libres de amplicones. El personal involucrado en el procesamiento de las muestras debe usar una bata de laboratorio limpia, que no debe ser usada fuera de esta habitación. Durante la preparación de las muestras, se deben usar guantes de exploración desechables y cambiarlos frecuentemente. Destape con cuidado los viales que contiene la muestra (procesada). Evite abrir a la vez varios viales de reacción con muestra.

Para evitar la contaminación o para limpiar superficies contaminadas, se recomienda limpiar las pipetas y las superficies de trabajo con DNAZap (Ambion). Tenga en cuenta que el uso de DNAZap solo es una medida de precaución adicional, y las recomendaciones descritas en el diseño y los procedimientos de laboratorio deben seguirse lo más estrictamente posible.

**Habitación 3 - amplificación y detección de amplicones**

El personal involucrado en la amplificación y detección de amplicones debe usar una bata de laboratorio limpia, que no debe ser usada fuera de esta habitación. Para trabajar con amplicones deben usarse guantes de exploración desechables.



**Procedimiento de ensayo****Inclusividad**

Los fragmentos de SPF10 de los 32 genotipos de HPV presentes en la tira se clonaron en plásmidos y se ensayaron con INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II*. Todos los genotipos de HPV fueron detectados de forma específica por su sonda respectiva.

**Concordancia**

La concordancia entre INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra II* e INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra* se evaluó con un total de 150 suspensiones de células cervicales positivas con Digene HC2 High-Risk HPV DNA almacenadas en líquido Surepath (BD-Tripath) o ThinPrep PreservCytSolutionpreservative. Los ensayos se realizaron con *Auto-LiPA 48* e interpretación visual. Todas las muestras produjeron resultados válidos (150/150; 100%, intervalo de confianza unilateral del 95% 98.2%).

La concordancia se definió como el porcentaje de resultados de LiPA válidos e interpretables con muestras de HC2+ en concordancia con el método de referencia INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra*, para genotipos de alto riesgo (=HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) comunes en ensayos (HC2, LiPA *Extra* y LiPA *Extra II*). Así, se definió un resultado concordante como un resultado con al menos uno de estos genotipos de alto riesgo de acuerdo con el nuevo ensayo y el método de referencia.

De las 150 muestras ensayadas, 135 produjeron un resultado concordante con el método de referencia (135/150; 90%, intervalo de confianza unilateral del 95% 85.2%). En total, 15 muestras produjeron resultados discordantes.

- En 12 de estas muestras se detectaron genotipos de alto riesgo con el nuevo ensayo y no se detectaron con el método de referencia (las muestras se determinaron como positivas de alto riesgo en HC2). En 7 de estas muestras los tipos fueron HPV59 o 68. Se esperaban estos resultados discordantes, ya que uno de los objetivos entre otros, al desarrollar el nuevo ensayo, era mejorar la sensibilidad para estos genotipos.
- Otras dos muestras eran infecciones mixtas, en las que se detectaron genotipos de alto riesgo probables (HPV70 en un caso, HPV53 y HPV82 en el otro) tanto para el nuevo ensayo como para el método de referencia.
- En otra muestra se detectó HPV68 en el nuevo ensayo y HPV51 en el método de referencia.

**Programa LiRAS for LiPA HPV**

Las 150 tiras reveladas del estudio de concordancia se interpretaron visualmente y con el programa LiRAS for LiPA HPV v3.00. De estas muestras, 143 mostraron un resultado de coincidencia exacta del genotipo (95.3%, intervalo de confianza unilateral del 95% 91.6%). Los genotipos que discreparon en las 7 muestras restantes tenían valores de densidad óptica muy cercanos al valor de corte programado, con la excepción de una banda de sonda para HPV31 con una densidad óptica de 0.0305. Las 7 muestras eran infecciones mixtas en las que se detectó al menos un genotipo de alto riesgo mediante interpretación visual y mediante el programa.

**Precisión**

Se ensayó un panel de 8 muestras positivas para HPV (5 infecciones individuales, 3 infecciones múltiples) en días diferentes, con 3 lotes distintos y con 3 operadores que usaron distintos autoanalizadores (*Auto-LiPA 48* y termociclador de PCR). Toda la variabilidad introducida produjo los mismos resultados de ensayo en todas las réplicas de las muestras, salvo en el caso de una muestra para la que se detectó un HPV16 adicional en una réplica. Así, la precisión fue de 111/112 (99.1%, intervalo de confianza unilateral del 95% CI 96.1%).

**Sensibilidad analítica**

El límite de detección se determinó para los genotipos de HPV 16, 18, 31, 33 y 45, que representan cinco de los genotipos de alto riesgo más prevalentes. El ADN de plásmido, en presencia de ADN humano, se diluyó (1/3) desde 5000 copias por reacción de PCR hasta 0 copias por reacción de PCR. Cada dilución se ensayó 8 veces.

No fue posible definir el límite de detección como un valor probit 95% (estimación puntual) para HPV16, HPV18 y HPV31 a causa de la separación casi completa de los datos observados. En un análisis de sensibilidad en el que se asumió que una observación era negativa en el punto en que se obtuvo por primera vez positividad completa (8/8 se reemplazó por 7/8), se pudieron calcular estimaciones de valores probit. Se obtuvo un límite de detección muy bajo para HPV16 y HPV18 (el límite superior del intervalo de confianza del 95% fue de 6 copias por PCR) y límites de detección más altos para HPV31, 33 y 45 (el límite superior del intervalo de confianza del 95% varió de 42 copias por PCR a 437 copias por PCR).

**Licencias**

La compra de este producto otorga al comprador el derecho a usarlo para la amplificación de secuencias de ácido nucleico para diagnóstico *in vitro* en humanos, en conformidad con el método patentado descrito en el manual del producto. El presente documento no otorga ninguna patente general ni ninguna otra licencia de otro tipo aparte del derecho específico de uso adquirido con la compra.

**Marcas comerciales**

- INNO-LiPA es una marca comercial™ internacional en EEUU.
- LiPA es una marca comercial registrada® en Benelux y una marca comercial™ en el resto del mundo (incluyendo EEUU).
- LiRAS es una marca comercial registrada® en Europa y es una marca comercial™ en el resto del mundo (incluyendo EEUU).
- Auto-LiPA es una marca comercial™ internacional en EEUU.





Ministerio de Salud  
Secretaría de Políticas, Regulación  
e Institutos  
A. N. M. A. T

## CERTIFICADO DE AUTORIZACION DE VENTA

### DE PRODUCTOS PARA DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO

Expediente nº:1-47-3110-1507/15-1

Se autoriza a la firma TECNOLAB S.A. a importar y comercializar los Productos para Diagnóstico de uso "in vitro" denominados 1) INNO-LIPA HPV Genotyping *Extra II* / ENSAYO DE SONDAS EN TIRA DE MEMBRANA DISEÑADO PARA LA DETECCIÓN CUALITATIVA E IDENTIFICACIÓN DE DIFERENTES GENOTIPOS DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (HPV alto riesgo: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68; HPV probable alto riesgo: 26, 53, 66, 70, 73, y 82; HPV bajo riesgo o no clasificado: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 67, 81, 83 y 89) MEDIANTE LA DETECCIÓN DE SECUENCIAS ESPECIFICAS DE LA REGION L<sub>1</sub> DEL GENOMA DE VPH; 2) INNO-LIPA HPV Genotyping *Extra II Amp* / PARA LA AMPLIFICACIÓN DE UNA PARTE DE LA REGION L<sub>1</sub> DEL VPH MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR), en envases conteniendo 1) 20 DETERMINACIONES, CONTENIENDO: TIRAS DE MEMBRANA (20 unidades), SOLUCIÓN DE DESNATURALIZACIÓN (1 vial X 1 ml), SOLUCIÓN DE HIBRIDACIÓN (1 vial X 80 ml), SOLUCIÓN DE LAVADO ASTRINGENTE (1 vial X 200 ml), SOLUCIÓN DE LAVADO 5X (1 vial X 80 ml), DILUYENTE DE CONJUGADO (1 vial X 80 ml), CONJUGADO 100X (1 vial X 0,8 ml), TÁMPÓN SUSTRATO (1 vial X 180 ml), SUSTRATO BCIP/NBT 100X (1 vial X 0,8 ml), BANDEJAS DE INCUBACIÓN (3 unidades); 2) ENVASES CONTENIENDO: MASTER MIX (1 vial X 1,0 ml) Y CONTROL POSITIVO (1 vial X 0,05 ml). Se le asigna la

categoría: Venta a laboratorios de Análisis clínicos por hallarse comprendido en las condiciones establecidas en la Ley 16.463, y Resolución M.S. y A.S. N° 145/98. Lugar de elaboración: FUJIREBIO EUROPE N.V. Technologiepark 6, B-9052 Gent. (BÉLGICA). Periodo de vida útil: 1) 18 (DIECIOCHO) meses, desde la fecha de elaboración conservado entre 2 y 8 °C y 2) 18 (DIECIOCHO) meses, desde la fecha de elaboración conservado entre -25 y -15 °C .En las etiquetas de los envases, anuncios y Manual de instrucciones deberá constar PRODUCTO PARA DIAGNOSTICO DE USO "IN VITRO" USO PROFESIONAL EXCLUSIVO AUTORIZADO POR LA ADMINISTRACION NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA MEDICA.

Certificado n°: **008327**

ADMINISTRACION NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA.

Buenos Aires,

**11 NOV. 2011**

Firma y sello

**Ing ROGELIO LOPEZ**  
Administrador Nacional  
A.N.M.A.T.