



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

DISPOSICIÓN N° 3809

BUENOS AIRES, 12 MAY 2015

VISTO el expediente N° 1-47-11672/13-8 del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por los presentes actuados la firma NIPRO MEDICAL CORPORATION Sucursal Argentina solicita autorización para la venta a laboratorios de análisis clínicos de los Productos para diagnóstico de uso "in vitro" denominados 1) PapilloCheck®/ DISEÑADO PARA LA DETECCIÓN CUALITATIVA Y LA GENOTIPIFICACIÓN DE 24 TIPOS DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN PREPARACIONES DE ADN A PARTIR DE CITOLOGÍAS CERVICOUTERINAS HUMANAS; 2) PapilloCheck® Collection Kit/ PARA LA EXTRACCIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS CERVICALES QUE SE ANALIZARÁN CON PapilloCheck® .

Que a fojas 662 consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico que establecen 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.

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



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

DISPOSICIÓN N° 3809

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por los Decretos N° 1490/92 y 1886/14.

Por ello;

EL ADMINISTRADOR NACIONAL DE LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE
MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA

DISPONE:

ARTÍCULO 1º.- Autorízase la venta a laboratorios de análisis clínicos de los productos de diagnóstico para uso in Vitro denominados 1) PapilloCheck®/ DISEÑADO PARA LA DETECCIÓN CUALITATIVA Y LA GENOTIPIFICACIÓN DE 24 TIPOS DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN PREPARACIONES DE ADN A PARTIR DE CITOLOGÍAS CERVICOUTERINAS HUMANAS; 2) PapilloCheck® Collection Kit/ PARA LA EXTRACCIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS CERVICALES QUE SE ANALIZARÁN CON PapilloCheck®, el que será elaborado por 1) GREINER BIO-ONE DIAGNOSTICS GMBH. Gewerbepark 2, 4261 Rainbach im Muhlkreis (AUSTRIA) para GREINER BIO-ONE GMBH. Maybachstraße 2, D-72636 Frickenhausen (ALEMANIA) y 2) BLISPAC S.A.S. Rue de la Gare 60250 Balagny/Thérain. (FRANCIA) PARA GREINER BIO-ONE GMBH. Maybachstraße 2, D-72636 Frickenhausen (ALEMANIA) e importado terminado por la firma NIPRO MEDICAL CORPORATION Sucursal Argentina, en envases conteniendo: 1) Envases por 60 determinaciones conteniendo: PapilloCheck® PCR MasterMix (5 x 300 µl), PapilloCheck® Slidebox (5 x 12 matrices), PapilloCheck® BUF A conc. (2 x 40 ml), PapilloCheck® BUF B conc. (1 x 15 ml) y PapilloCheck® Buffer de Hibridación (2 x



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

DISPOSICIÓN N° 3809

1000 µl); 2) Envases conteniendo 10 o 50 kits de recolección (kit de recolección: 1 cepillo cervical y 1 vial con 5 ml de medio de transporte), con una vida útil de 1) DIEZ (10) meses, desde la fecha de elaboración conservado entre 4 y 8 °C y 2) DOS (2) años, desde la fecha de elaboración conservado entre 15 y 30 °C y que la composición se detalla a fojas 263 a 264 .

ARTICULO 2º.- Acéptense los proyectos de rótulos y Manual de Instrucciones a fojas 286 a 288, 337 a 339, 340 a 342, 469 a 471 y 523 a 661. Desglosándose fojas 288, 339, 342, 471, 523 a 524, 529 a 572 y 659 debiendo constar en los mismos que la fecha de vencimiento es la declarada por el elaborador impreso en los rótulos de cada partida.

ARTÍCULO 3º.- Extiéndase el Certificado correspondiente.

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

ARTÍCULO 5º.- Regístrese, gírese a la Dirección de Gestión de Información Técnica a sus efectos, por Mesa de Entradas de la Dirección Nacional de Productos Médicos 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 N° 1-47-11672/13-8

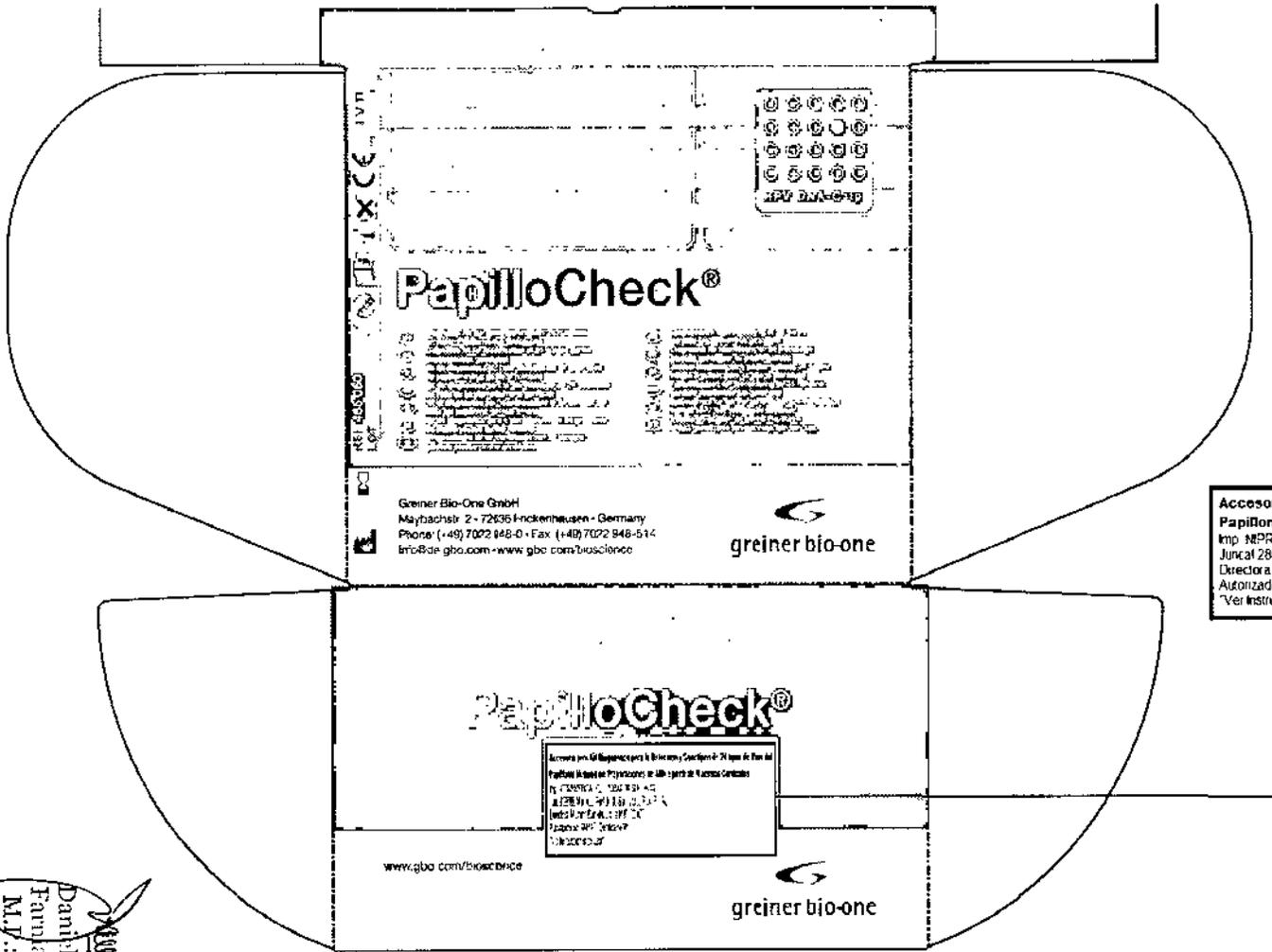
DISPOSICIÓN N°:

3809

3

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

1
↑



PapilloCheck®

Greiner Bio-One GmbH
Maybachstr. 2 • 72336 Frickenhausen • Germany
Phone: (+49) 7022 948-0 • Fax: (+49) 7022 948-514
info@gb.com • www.gb.com/bioscience

greiner bio-one

PapilloCheck®

Accesorio para Kit Diagnóstico para la Detección y Genotipo de 24 tipos de Virus del Papiloma Humano en Preparaciones de ADN a partir de Muestras Cervicales

www.gb.com/bioscience

greiner bio-one

Sobrerótulo de Importador

Accesorio para Kit Diagnóstico para la Detección y Genotipo de 24 tipos de Virus del Papiloma Humano en Preparaciones de ADN a partir de Muestras Cervicales
Imp: NPREC MEDICAL CORPORATION SUC ARG
Junca! 2868, Martínez, Partido de San Isidro, Prov. Bs. As.
Directora Técnica: Daniela Croce M.P. 20.070
Autorizado por ANMAT. Certificado N°
Ver Instrucciones de Uso

3809
12 MAY 2015



Daniela Croce
Farmacéutica
M.P.: 20070

GONZALO GONZALEZ
GERENTE GENERAL
NPREC MEDICAL CORP.
SUC. ARG.

1
↑

3809



Contenit:

- 1 x Slidebox with 6 x 12 Arrays
- 5 x vials PapilioCheck® MasterMix, 300 µl each
- 2 x vials PapilioCheck® Hybridisation Buffer, 1000 µl each
- 2 x bottles PapilioCheck® Buffer A, 40 ml each
- 1 x bottle PapilioCheck® Buffer B, 15 ml

www.gbo.com/bioscience



www.gbo.com/bioscience

greiner bio-one

PapilioCheck®

greiner bio-one

PapilioCheck®

Daniela Croce
 Daniela Croce
 Farmaceutica
 M.V.:20070

Gonzalo Gouk
 GONZALO GOUK
 GERENTE GENERAL
 NIPRO MEDICAL CORP.
 SUC. ARG.

~~CE~~

↑



Kit Diagnostico para la Detección y Genotipo de 24 Tipos de Virus del Papilloma Humano en Preparaciones de ADN a partir de Muestras Cervicales

Proyectos de Rótulos

GONZALO GOUK
GERENTE GENERAL
NIPRO MEDICAL CORP.
SUC. ARG.

PapilloCheck®
Slidebox, 5x12 Arrays

Greiner Bio-One GmbH
Maybachstr. 2 • 72636 Frickenhausen • Germany
greiner bio-one

PapilloCheck® **B**

BUF B

Greiner Bio-One GmbH
Maybachstraße 2 • 72636 Frickenhausen • Germany
Phone: (+49) 7022 948-0 • Fax: (+49) 7022 948-514
greiner bio-one

PapilloCheck®
PCR MasterMix

Greiner Bio-One GmbH
Maybachstr. 2 • 72636 Frickenhausen • Germany
Phone: (+49) 7022 948-0 • Fax: (+49) 7022 948-514
www.greiner-bio-one.com
greiner bio-one

PapilloCheck® **A**

BUF A

Greiner Bio-One GmbH
Maybachstraße 2 • 72636 Frickenhausen • Germany
Phone: (+49) 7022 948-0 • Fax: (+49) 7022 948-514
greiner bio-one

Rótulos internos provistos para el fabricante.

Daniela Croce
Farmacéutica
M.P.: 20070

3809
ANM. 4
FOLIO
238
MESA DE PREC.

3809



PapilioCheck[®] **X**
Hyb-Buffer
LOT PPHH WYXX
200Y-MM-11 1000 µl

Rótulo interno de Buffer de Hibridación PapilioCheck

Daniela Croce
 Daniela Croce
 Farmacéutica
 M.P.:20070

Gonzalo Gouk
 GONZALO GOUK
 GERENTE GENERAL
 NIPRO MEDICAL CORP.
 SUC. ARG.

✓

✓

ENTNAHME KIT

PAPILLOCHECK[®]
COLLECTION KIT

2014-01



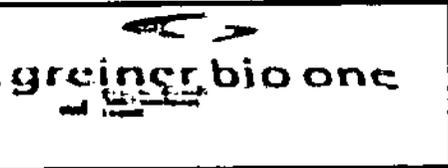
Rev. 11.2011

Stück / Pieces: 50

REF 465075

LOT PCK5012001
BOX 00110
IPC

MADE IN FRANCE



PAPILLOCHECK[®]
ENTNAHME KIT

PAPILLOCHECK[®]
COLLECTION KIT

2014-01



Stück / Pieces: 50

REF 465075

LOT PCK5012001
BOX 00110
IPC

MADE IN FRANCE

Kit para la toma de muestra Papillocheck
(Accesorio para IGI Diagnostico para la Detección y
Genotipo de 24 tipos de Virus del Papilloma Humano en
Preparaciones de ADN a partir de Muestras Cervicales)
Imp NIPRO MEDICAL CORPORATION SUC ARG
Junca 2809, Maronez, Partido de San Isidro, Prov. Bs. As.
Directora Técnica Daniela Croce M.P. 20 070
Autorizado por ANMAT Certificado N°
"Ver Instrucciones de Uso"

Sobrerótulo de Importador

greiner bio-one
Greiner Bio-One GmbH
Maybachstraße 2 D-72636
Frickenhäuser, Alemania

Dirección de fabricante

CONZALIO GIL
GERENTE GENERAL
NIPRO MEDICAL CORP
SUC. ARG.

Daniela Croce
Farmacéutica
M.P.: 20070



3809

3809

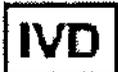


Kit Diagnostico para la Detección y Genotipeo de 24 Tipos de Virus del Papilloma Humano en Preparaciones de ADN a partir de Muestras Cervicales

Proyectos de Rótulos



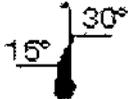
PapilloCheck® Sample Tube 5 ml



Name



Patient ID



Site



LOT



WARNING

Rev. 465075_02_00



Greiner Bio-One GmbH, Maybachstr.2
72636 Frickenhausen, Germany



greiner bio-one

Rótulo interno del accesorio Kit para la Toma de Muestra provisto para el fabricante.

GONZALO GOUK
GERENTE GENERAL
NIPRO MEDICAL CORP.
SUC. ARG.

Daniela Croce
Farmacéutica
M.P.:20070

PapilloCheck® Collection Kit

Rev. 465075_00_01

Contenido

50x PapilloCheck® Collection Kit

Cada PapilloCheck® Collection Kit consiste en un cepillo cervical y un vial con medio de transporte de muestra PapilloCheck® de 5 ml en un envase blíster etiquetado.

Símbolos

	Fecha de Vencimiento
	Catálogo número
	Número de Lote
	Ver instrucciones de uso
	Un solo uso
	H319 – Causa irritación ocular seria P280 – Utilizar guantes, ropa de protección, protección ocular y facial
	Diagnóstico In Vitro
	CE Marca de conformidad
	Límite de Temperatura
	Fabricante

Instrucciones de Uso

Antes de usar Papillocheck® Collection Kit, lea atentamente las instrucciones de uso. Las instrucciones impresas en este blíster proveen sólo información reducida sobre el manejo del kit. (Descargue instrucciones de uso actualizadas, disponibles en varios idiomas)

Uso Previsto

Para la extracción y el transporte de las muestras cervicales que se analizarán con Papillocheck® Collection Kit.

Descripción del Producto

Cepillo cervical:

El cepillo cervical del kit de recolección PapilloCheck® es designado para muestra simultánea de ambas ecto y endocervix. Esto también viene con una cabeza recortable como complemento, la que permanece almacenada en el vial después de recoger la muestra, asegurando así que toda la muestra se recoja.

Vial con medio de transporte de muestra PapilloCheck®:

5 ml medio de transporte de muestras garantiza las condiciones óptimas de almacenamiento y un transporte libre de contaminación y degradación DNA. Las dimensiones del vial de almacenamiento aseguran un manejo fácil y seguro de la muestra para el análisis descendente, incluso con la cabeza recortable que quedá dentro del vial.

Almacenamiento

3809

greiner bio-one



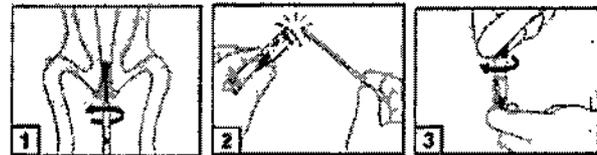
El Papillocheck® Collection Kit viene listo para usar y no necesita preparación adicional. Almacenar sin abrir en su empaque original a temperaturas entre 15 y 30°C en un lugar limpio y seco hasta su vencimiento.

Precauciones y Advertencias

- No usar para muestras de endometrio
- No usar si se sospecha o se confirma embarazo
- Producto para un solo uso. No reutilizar alguna parte del kit
- No usar luego de la fecha de vencimiento
- No usar si algún componente está dañado
- Manejar todas las muestras biológicas y los dispositivos de recolección usados de acuerdo a las políticas y procedimientos de su institución
- Prestar la atención médica apropiada cuando se manejen las muestras biológicas, pueden transmitir enfermedades infecciosas
- Usar guantes y ropa de laboratorio adecuada para reducir los riesgos de infección.

Colección de muestras para Papillocheck®

(utilizar guantes cuando se manejen muestras cervicales para minimizar exposición al peligro)



1. Recolectar muestra del cérvix: Insertar el cepillo cervical en el endocervix y rotar media vuelta.
2. Abra el vial con medio de transporte de muestras: Inserte el cepillo y rompa la cabeza del cepillo en el punto de ruptura.
3. Cierre firmemente la tapa del frasco y rotule la etiqueta engomada.

Disposición

Observar normas de higiene generales, nacionales, estatales y regulaciones locales con respecto a la disposición de muestras y materiales utilizados.

Transporte y Almacenamiento de Muestras

Para resultados óptimos, las muestras cervicales tomadas con Papillocheck® Collection Kit no deben ser almacenadas a temperatura ambiente por más de 14 días. Las muestras deben transportarse sin refrigeración. Las muestras deben ser transportadas en cumplimiento con regulaciones nacionales, estatales y locales.



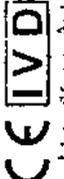
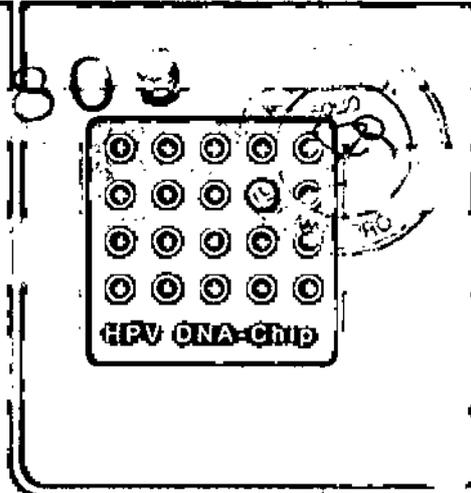
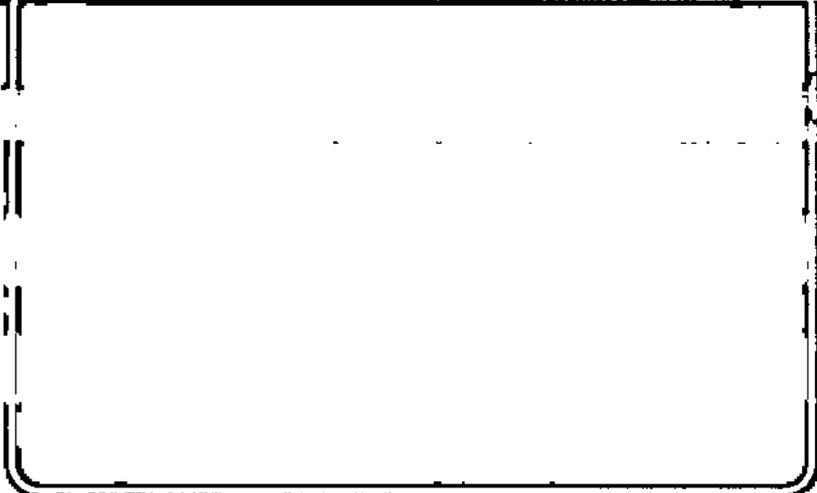
Greiner Bio-One GmbH
Maybachstrasse 2, 72638 Frickenhausen, Germany
Phone: (+49) 7022 645-0
Fax: (+49) 7022 645-614
info@de.gbo.com
www.gbo.com/bio-science

greiner bio-one

Handwritten signature
Daniela Croce
Farmaceutica
M.P.:20070

Handwritten signature
GONZALO GOUK
GERENTE GENERAL
NIPRO MEDICAL CORP.
SUC. ARG.

Handwritten signature



PapilloCheck®

Manual de instrucciones



Equipo de diagnóstico para la genotipificación de los tipos del virus del papiloma humano 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44/55, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82 en muestras cervicouterinas

REF 465 060

Para uso diagnóstico in vitro únicamente por parte de personal de laboratorio profesional

Revisión: BQ-013-07
Agosto de 2011



Greiner Bio-One GmbH
Maybachstr. 2 • 72636 Frickenhausen • Alemania
Teléfono: +49 (0) 7022 948-0 • Fax +49 (0) 7022 948-514
info@de.gbo.com • www.gbo.com/bioscience

Daniela Croce
Firma manuscrita y sello de la representante.

GOZALDO GOUK
Firma manuscrita y sello de la representante.
GERENTE GENERAL
NIPRO MEDICAL CORP.
SUC. ARG.



greiner bio-one

GLOSARIO DE SÍMBOLOS

3809



en	Store in the dark	Use by	Consult Instructions For Use	Catalog Number	Manufacturer	In Vitro Diagnostic Medical Device	Temperature limitation	Contents sufficient for <n> tests	Irritant	Batch code	Important Note
de	Im Dunkeln lagern	Mindestens haltbar bis	Vor Gebrauch Anweisung lesen	Katalognummer	Hersteller	In-Vitro-Diagnostika Medizinprodukt	Temperaturbegrenzung	Inhalt ausreichend für <n> Tests	Reizend	Chargenbezeichnung	Wichtiger Hinweis
fr	À stocker à l'abri de la lumière	Date limite de conservation jusqu'à	Lire les instructions avant utilisation	Numéro de référence	Fabricant	Produit médical de diagnostic in-vitro	Limite de température	Contenu suffisant pour <n> tests	irritant	N° de lot	Note importante
es	Conservar en un lugar oscuro	A utilizar preferiblemente antes de	Antes de usar, lee las instrucciones	Número de catálogo	Fabricante	Producto medicinal de diagnóstico in vitro	Limitación de temperatura	Contenido suficiente para <n> ensayos	Irritante	Código de lote	Nota importante
it	Conservare al buio	Da utilizzare entro e non oltre	Leggere le istruzioni prima dell'uso	Numero catalogo	Produttore	Dispositivo medico-diagnostico in-vitro	Limitazione temperatura	Contenuto sufficiente per test <n>	Irritante	Codice del lotto	Nota importante
pt	Conservar num local escuro	A utilizar preferivelmente antes de	Antes de usar, leia as instruções	Número de catálogo	Fabricante	Produto medicinal de diagnóstico in vitro	Limitação de temperatura	Conteúdo suficiente para <n> ensaios	irritante	Código do lote	Aviso importante
nl	Donker bewaren	Tenminste houdbaar tot	Gebruiksaanwijzing lezen	Catalogusnummer	Fabrikant	In vitro diagnostisch medisch product	Temperatuurbepaling	Voldoende inhoud voor <n> tests	Irriterend	Lot nummer	Belangrijke opmerking
da	Opbevares mørkt	Anvendes senest	Les brugsanvisningen	Katalognummer	Producent	In vitro medicinsk diagnosticke apparat	Temperaturbegrænsning	Indeholder nok til <n> test	Lokalirriterende	Lotnummer	Vigtig henvisning
sv	Förvaras mörkt.	Sista förbrukningsdag	Läs bruksanvisningen före användning	Katalognummer	Tillverkare	In vitro medicinsk diagnostisk apparatur	Temperaturbegränsning	Innehåller räcker till <n> tester	Irriterande	Lot nummer	Viktigt meddelande
pl	Przechowywać w ciemności	Termin zdatności	Przed użyciem przeczytać instrukcję	Numer katalogowy	Producent	Diagnostyka in vitro (Produkt yw	Ograniczenie temperatury	Zawartość wystarcza na <n> testów	drażniący	Kod partii	Ważne
no	Oppbevares mørkt	holdbar til	Les bruksanvisning før bruk	katalognummer	produsent	in vitro-diagnostisk medisinsk utstyr	temperaturbegrensning	Innhold tilstrekkelig for <n> tester	irriterende	batch nr.	Viktig merknad
el	Αποθηκεύεται στο σκοτάδι	το λιγότερο διατηρείται	πριν την χρήση διαβάστε τις οδηγίες	Αριθμός Καταλόγου	Παραγωγός	in vitro διαγνωστικό ιατρικό προϊόντα	περιορισμός θερμοκρασίας	Περιεχόμενο αρκετό για <n> tests	ερεθιστικό	κωδικός παρτίδας	Εμπνευστική υποδείξη
tr	Karanlık yerde saklayınız	Son kullanma tarihi:	Kullanmadan önce talimatı okuyun	Katalog numarası	Üretici firma	In vitro diagnostik tıbbi tanı ürünü	Sıcaklık sınırlaması	İçerdiği <n> test için yeterlidir	Tahşi edici	Parti kodu	Önemli Not

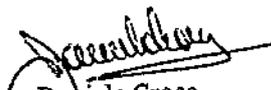
Gonzalo Gouk
Dan la Croce
Farmaceutica
M.P.:20070

TABLA DE CONTENIDO

3809



1. CONTENIDO DEL EQUIPO	5
2. CONSUMIBLES, EQUIPO Y HARDWARE NECESARIOS	6
3. TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO	8
4. INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD	8
5. ELIMINACIÓN DE RESIDUOS	9
6. INTRODUCCIÓN.....	10
6.1 Uso previsto	10
6.2 Tipos de VPH detectables con PapilloCheck®	10
6.3 Principio del ensayo	11
6.4 Diseño del microchip PapilloCheck®	13
6.4.1 Distribución del microchip PapilloCheck®	13
6.4.2 Controles del microchip	14
7. INSTRUCCIONES PARA LA SECUENCIA DE TRABAJO DE PAPILOCHECK®	15
7.1 Instrucciones generales	15
7.2 Separación de las salas.....	15
7.3 Advertencias y precauciones	16
7.3.1 Prevención de la contaminación	16
7.3.2 Instrucción para la manipulación de microchips de ADN.....	16
7.3.3 Precauciones generales	16
7.3.4 Seguridad en el trabajo.....	17
8. PROCEDIMIENTO DE PAPILOCHECK®.....	18
8.1 Toma de muestras y extracción de ADN	18
8.1.1 Toma de muestras	18
8.1.2 Extracción de ADN.....	20
8.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	21
8.2.1 Preparación del termociclador	21
8.2.2 Tratamiento de uracil-N-glucosilasa (UNG)	22
8.2.3 Preparación de la reacción PCR.....	23
8.3 Hibridación y lavado	25
8.3.1 Preparación.....	25
8.3.2 Hibridación	27
8.3.3 Lavado y secado.....	29
8.4 Escaneado y evaluación del microchip PapilloCheck®	31


 Daniela Croce
 Farmacéutica
 M.P.:20070


 GONZALO GOUK
 GERENTE GENERAL
 NIPRO MEDICAL CORP.
 SUC. ARG.



9. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS.....	35
10. ASISTENCIA TÉCNICA.....	35
11. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO DE PAPILOCHECK®	34
11.1 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO DE PapilloCheck®	34
11.1.1 Sensibilidad analítica	34
11.1.2 Especificidad analítica - Tipos de VPH.....	35
11.1.3 Especificidad analítica - Organismos no VPH	35
11.2 Repetibilidad.....	36
11.3 Reproducibilidad.....	37
11.4 Solidez.....	38
11.5 Rendimiento clínico de PapilloCheck®	39
12. PROTOCOLO BREVE DE PAPILOCHECK®	41
12.1 Sala 2: PCR - Preparación de la mezcla de reacción.....	41
12.2 Sala 2: PCR - Adición de ADN mensajero / reacción PCR	42
12.3 Sala 3: Hibridación - Preparación / Reacción de hibridación	43
12.4 Sala 3: Lavado y secado / Escaneo y evaluación	44


GONZALO GOUK
 GERENTE GENERAL
 NIPRO MEDICAL CORP.
 SUC. ARG.


Daniela Croce
 Farmacéutica
 M.P.:20070

1. CONTENIDO DEL EQUIPO

3809



Equipo de ensayo PapilloCheck® ¹	Contenido	Cantidad
PCR MasterMix	5 PapilloCheck® ¹ PCR MasterMix ²	5 x 300 µl
Caja para portaobjetos, 5 x 12 matrices	1 caja para portaobjetos PapilloCheck® con 5 microchips PapilloCheck® ³	5 x 12 matrices
Tampón de hibridación	2 PapilloCheck®	2 x 1000 µl
BUF A conc.	2 tampones A PapilloCheck® concentrado	2 x 40 ml
BUF B conc.	1 tampón B PapilloCheck® concentrado	1 x 15 ml

¹ Un equipo de ensayo PapilloCheck® es suficiente para el análisis de 60 muestras.

² Contiene todos los componentes necesarios para PCR, excepto Taq ADN polimerasa y uracil-N-glucosilasa.

³ Un microchip PapilloCheck® contiene 12 micromatrices PapilloCheck®.

GONZALO GOUK
GERENTE GENERAL
NIPRO MEDICAL CORP.
SUC. ARG.

Daniela Croce
Farmacéutica
M.P.:20070

2. CONSUMIBLES, EQUIPO Y HARDWARE NECESARIOS

Se recomienda el uso de PapilloCheck® en combinación con los consumibles, el equipo y el hardware enumerados únicamente por parte de personal profesional.

Consumibles	N.º de catálogo de Greiner Bio-One	Cantidad
Equipo de ensayo PapilloCheck®	465 060	Equipo de ensayo para 60 reacciones
Equipo de toma de muestras PapilloCheck®	465 070	10 muestras
Equipo de extracción de ADN / Preparación con una columna oCheck®	515 040	Equipo de ensayo para 50 preparaciones
Equipo de extracción de ADN / Preparación con banda de 8 columnas oCheck®	515 050	12 x 8 preparaciones
Puntas de filtro de micropipeta libres de desoxirribonucleasa estériles¹		
Puntas de filtro de 0,5-10 µl	765 288	96/960
Puntas de filtro de 0,5-20 µl	774 288	96/960
Puntas de filtro de 10-100 µl	772 288	96/960
Puntas de filtro de 10-200 µl	739 288	96/960
Puntas de filtro de 100-1000 µl	750 288	60/600
Microtubos libres de desoxirribonucleasa		
Microtubo de 1,5 ml	616 201	500/4000
Microtubo de 0,2 ml ²	683 201	500/1000
8 bandas PCR de 0,2 ml	673 210	125/1250
Tiras de tapa para 8 bandas PCR de 0,2 ml	373 270	125/1250
Tubo de polipropileno de 50 ml ³	210 261	25/450
Pipetas de plástico para pipeteador		
Pipeta de 10 ml	607 180 o 607 160	1/200
Pipeta de 25 ml	760 180 o 760 160	1/200
Pipeta de 50 ml	786 180 o 768 160	1/200

¹ Algunos de los tamaños de puntas mencionados son opcionales según las micropipetas disponibles.

² En principio, se recomienda el uso de las bandas PCR con 8 tubos. Los microtubos individuales (0,2 ml) son opcionales si no hay bandas disponibles.

³ Solamente necesario si no hay disponible una centrifuga para portaobjetos.

Daniela Croce
Farmacéutica
M.P.:20070

GONZALO GOUK
GERENTE GENERAL
NIPRO MEDICAL CORP.
SUC. ARG.

3809



Equipo	N.º de catálogo de Greiner Bio-One	Cantidad
CheckScanner™	862 070	1
Software CheckReport™ básico	862 080	1
Software CheckReport™ complemento para PapilloCheck®	862 081	1
Cámara de hibridación oCheck® con soporte de portaobjetos	447 070	1
Asa para el soporte de portaobjetos	447 001	1
Recipiente de lavado oCheck®	447 020	1
oCheck® VacSet ³	863 080	1
oCheck® VacPump ³	863 070	1
Enzimas necesarias		
<ul style="list-style-type: none"> • Taq polimerasa: Polimerasa ADN HotStarTaq® 5 U/µl (Qiagen: 203203, 203205, 203207, 203209) • Uracil-N-glicosilasa: Uracil-ADN-glicosilasa 1 U/µl (Fermentas; #EN0361, #EN0362) 		
Otros consumibles necesarios		
<ul style="list-style-type: none"> • Agua grado PCR • Agua destilada o desionizada • Guantes de un solo uso 		
Otro equipo necesario		
<ul style="list-style-type: none"> • Microcentrifuga para microtubos de 1,5 y 2 ml • Centrifuga para tubos de polipropileno de 50 ml (por ejemplo, BeckmanCoulter, centrifuga Allegra X-22, rotor de angulo fijo C0650) o centrifuga para portaobjetos (por ejemplo, Labnet, Slide Spinner, VWR International centrifuga Galaxy MiniArray) • Microcentrifuga para microtubos individuales de 0,2 ml o bandas PCR de 8 tubos (por ejemplo, Labnet centrifuga Spectrafuge Mini) • Termociclador de PCR: GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) o Venti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) • Baño María (50 °C) • Micropipetas (diferentes tamaños entre 1 y 1000 µl) • Multipipeta de 8 canales (rango 5 - 50 µl), por ejemplo, Brand Transferpette®-8 (Brand) • Pipeteador para pipetas de vidrio y plástico • Agitador Vortex • Gradillas para diferentes microtubos 		
Otro hardware necesario		
<ul style="list-style-type: none"> • PC (consulte los requisitos del sistema en el Manual de instrucciones de CheckScanner™ y el software CheckReport™) 		

* Para realizar el procedimiento de lavado de PapilloCheck®, se necesitan tres recipientes de lavado oCheck®.

³ Solamente necesario en combinación con n.º de catálogo 515 050.

Daniela Croce
Daniela Croce
Farmacéutica
M.P.:20070

Gonzalo Gouk
GONZALO GOUK
GERENTE GENERAL
NIPRO MEDICAL CORP.
SUC. ARG.

3. TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO

3809



El transporte del equipo de ensayo PapilloCheck® se realiza a temperatura ambiente. No obstante, es preciso almacenar el equipo inmediatamente después de recibirlo a 4-8 °C y protegerlo de la luz. Si se almacenan correctamente, el equipo de ensayo PapilloCheck® y sus componentes se pueden utilizar hasta la fecha de caducidad indicada. Asimismo, en estas condiciones, la vida útil no se desvía de la fecha de caducidad una vez abiertos el equipo y sus componentes.

4. INSTRUCCIONES DE SEGURIDAD

El equipo de ensayo PapilloCheck® está destinado únicamente para el uso en un laboratorio, y no como fármaco, para uso doméstico ni otros fines. Lleve siempre una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas de seguridad, y siga las instrucciones de seguridad proporcionadas en esta sección.

Los siguientes componentes del equipo de ensayo PapilloCheck® contienen elementos nocivos o peligrosos.

Componente	Símbolo de peligroso	Símbolo de peligro	Frases de riesgo	Frases de riesgo	Frases de seguridad
Tampón de hibridación	Trocianato de guanidina (25-60 %)		Nocivo*	R 20/21/22 R 32 R 52/53	S13 S61 S36/37
Tampón B	<20 % de dodecilsulfato de sodio		Peligroso*	R 21/22 R 36/37/38	S26 S36/37

* La etiqueta de peligro no es necesaria para paquetes pequeños de un máximo de 125 g o ml (según 67/548/CEE Art. 25, 1999/45/CE Art. 12 y las normas alemanas GefStoffV § 20(3) y TRGS 200 7.1). Para obtener más información, consulte las fichas de datos de seguridad.

Frases de riesgo

- R 21/22 Nocivo en contacto con la piel y por ingestión
- R 20/21/22 Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel
- R 32 En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos
- R 36/37/38 Irrita los ojos, las vías respiratorias y la piel
- R 52/53 Nocivo para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático

Frases de seguridad

- S13 Manténgase lejos de alimentos, bebidas y piensos
- S26 En caso de contacto con los ojos, lávese inmediatamente con agua abundante y acuda a un médico
- S36/37 Utilizar indumentaria y guantes de protección adecuados
- S61 Evitar su liberación al medio ambiente. Consulte las instrucciones especiales/fichas de datos de seguridad.

La versión actual de las fichas de datos de seguridad de este producto se puede descargar del sitio web de Greiner Bio-One: www.gbo.com/bioscience/biochips_download

Daniela Croce
Farmacéutica
R.F. 20070

GONZALO GOUK
GERENTE GENERAL
NIPRO MEDICAL CORP.
SUC. ARG.

8

5. ELIMINACIÓN DE RESIDUOS

3809



Después de lavar y secar el microchip PapilloCheck®, se pueden desechar las soluciones de lavado I, II y III sin precauciones especiales. Deseche el microchip PapilloCheck® usado, los componentes del equipo sin utilizar y la mezcla de hibridación no utilizada con los desechos químicos del laboratorio. Respete todas las normativas locales, provinciales y nacionales en lo referente al desecho de materiales.


Daniela Croce
Farmacéutica
M.P.:20070


GONZALO GOUK
GERENTE GENERAL
NIPRO MEDICAL CORP.
SUC. ARG.

6. INTRODUCCIÓN

3809



En prácticamente todos los casos de cáncer del cuello uterino (el segundo cáncer más común en mujeres en todo el mundo), se encuentra una infección persistente con un virus del papiloma humano (VPH) carcinógeno.¹ Hasta la fecha, se han identificado más de 100 tipos de VPH, 40 de los cuales son de transmisión sexual e infectan la mucosa genital. Los tipos de VPH cervicouterino se clasifican en un grupo de alto riesgo (VPH de alto riesgo o VPHAR) o en uno de bajo riesgo (VPH de bajo riesgo o VPHBR). Mientras que los tipos de VPH de alto riesgo se asocian a una mayor posibilidad de padecer cáncer cervicouterino, los tipos de bajo riesgo causan principalmente condilomas genitales benignos.² No obstante, incluso dentro del grupo de alto riesgo, el riesgo relativo de desarrollar cáncer o lesiones cervicales intraepiteliales (NIC) depende del tipo.³ Alrededor del 70 % de todos los casos de cáncer cervicouterino están vinculados a una infección persistente de VPH 16 o 18. Los tipos de bajo riesgo con mayor prevalencia son VPH 6 y 11. Partiendo de la base de un vínculo etiológico prácticamente absoluto entre el VPH carcinógeno y el cáncer cervicouterino, en la actualidad se está teniendo en cuenta la realización de pruebas del VPHAR para la detección primaria del cáncer cervicouterino.⁴

6.1 Uso previsto

PapilloCheck® es un equipo de diagnóstico para la detección cualitativa y la genotipificación de 24 tipos del virus del papiloma humano en preparaciones de ADN a partir de citologías cervicouterinas humanas. Este equipo únicamente puede ser utilizado por personal cualificado.

PapilloCheck® cumple los requisitos de la directiva sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro (98/78/CE) y por tanto presenta la marca de conformidad CE. Todos los resultados diagnósticos generados con PapilloCheck® se deben interpretar en combinación con otros hallazgos clínicos o de laboratorio.

6.2 Tipos de VPH detectables con PapilloCheck®

PapilloCheck® permite identificar los 18 tipos de alto riesgo y los 6 tipos de bajo riesgo del virus del papiloma humano (VPH) (Tabla 1).

Tabla 1: Tipos de VPH detectables con PapilloCheck®

VPH 16	VPH 45	VPH 59	VPH 6
VPH 18	VPH 51	VPH 66	VPH 11
VPH 31	VPH 52	VPH 68	VPH 40
VPH 33	VPH 53	VPH 70	VPH 42
VPH 35	VPH 56	VPH 73	VPH 43
VPH 39	VPH 58	VPH 82	VPH 44 / VPH 55*

* PapilloCheck® no permite diferenciar entre el VPH 44 y el VPH 55.

- 1 Walboomers, J. et al (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol. 189(1):12-9.
- 2 Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. Clin Microbiol Rev. 2003;16:1-17.
- 3 Bosch FX. et al. (2008). Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. Vaccine. 26 Suppl 10.K1-16.
- 4 Meijer, C.J. et al. (2009). Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. Int J Cancer. 124(3):516-20.



6.3 Principio del ensayo

PapilloCheck® es un equipo de ensayo basado en micromatrices para la detección y la genotipificación de un fragmento del gen E1 del genoma del virus del papiloma humano (VPH). El procedimiento del ensayo se resume en la figura 1.

Antes del análisis PapilloCheck®, se debe extraer ADN de una muestra de citología cervicouterina. La toma de muestras y la extracción de ADN no forman parte del equipo de ensayo PapilloCheck®. Greiner Bio-One también ofrece productos especializados para la toma de muestras (equipo de toma de muestras PapilloCheck®) y la extracción de ADN (equipo de extracción de ADN oCheck®); se deben adquirir por separado (consulte la información sobre pedidos en el capítulo 2).

Después de la extracción de ADN genómico humano y vírico de una muestra cervicouterina, se amplifica un fragmento de 350 bp del gen E1 vírico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en presencia de un conjunto de cebadores específicos del VPH. En la misma reacción, se amplifica un fragmento de una copia del gen humano ADAT1 (adenosina desaminasa específica del ARNt humano1) con el fin de controlar la presencia de material de muestra humano en la muestra cervicouterina (control de muestra) y una plantilla de control interna presente en el PapilloCheck® PCR MasterMix para controlar el rendimiento de la PCR (control de PCR). Además, el PapilloCheck® PCR MasterMix contiene dUTP. Por tanto, se puede eliminar la contaminación cruzada de reacciones PCR anteriores mediante el uso del tratamiento con uracil-N-glucosilasa (UNG) (consulte el capítulo 8.2.2).

A continuación, los productos de la PCR se hibridan según sondas de ADN específicas y controles en el microchip enlazados a la superficie del microchip de PapilloCheck®. Cada microchip contiene 12 micromatrices de ADN, lo que permite el análisis simultáneo de 12 muestras cervicouterinas. Durante la hibridación, el ADN unido se marca de forma fluorescente y el no unido se elimina en los pasos de lavado subsiguientes. Se supervisa la eficiencia de la hibridación (control de hibridación).

Finalmente, el microchip PapilloCheck® se escanea, analiza y evalúa de forma automática mediante CheckScanner™ y el software CheckReport™, respectivamente (consulte la información sobre pedidos en el capítulo 2). CheckScanner™ es un escáner láser bicolor (longitudes de onda de excitación de 532 nm y 635 nm), que permite la detección de la señal fluorescente generada por la presencia de productos de la amplificación específicos de VPH así como los controles (consulte el capítulo 6.4.2). El software CheckReport™ permite visualizar, analizar y evaluar los resultados, y muestra de forma automática los valores correspondientes tanto de los tipos de VPH detectados como de los controles en un informe detallado.

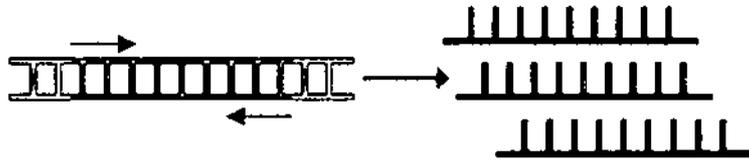
El informe indica claramente la presencia o la ausencia de uno o varios de los 24 tipos de VPH detectables y los completos controles en el microchip garantizan la elevada fiabilidad del análisis.


Daniela Croce
Farmacéutica
M.P.:20070

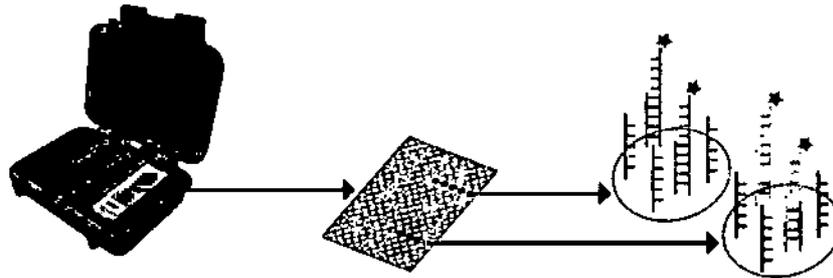

GONZALO GOURK
GERENTE GENERAL
NIPRO MEDICAL CORP.
SUC. ARG.



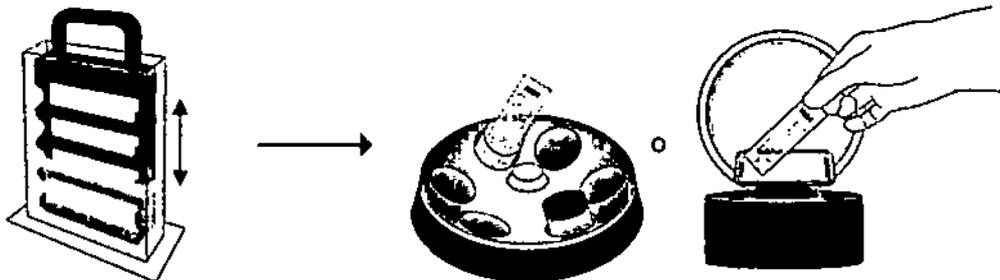
1. Reacción PCR



2. Hibridación



3. Lavado y secado



4. Escaneo y evaluación

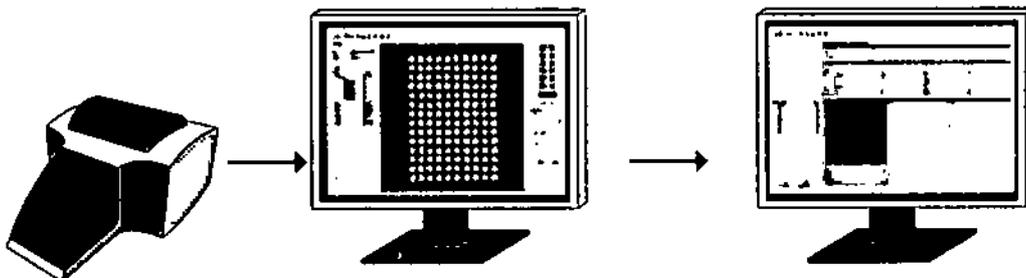


Figura 1: Procedimiento del ensayo PapilloCheck®

1. **Reacción PCR:** después de la extracción del ADN, se amplifican un fragmento de 350 bp del gen E1 vírico y fragmentos de dos objetivos de control mediante PCR. A continuación, los productos de la amplificación se hibridan según sondas de ADN complementario en el microchip.
2. **Hibridación:** se detecta cada tipo de VPH mediante una sonda de ADN específica presente en cinco réplicas. Durante la hibridación, se introduce el marcado fluorescente.
3. **Lavado y secado:** se elimina el ADN sin unir en los pasos de lavado subsiguientes.
4. **Escaneo y análisis:** se escanea, analiza y evalúa el microchip PapilloCheck® utilizando CheckScanner™ y el software CheckReport™. Se crea un informe que indica claramente la presencia o la ausencia de uno o varios de los 24 tipos de VPH detectables.

6.4 Diseño del microchip PapilloCheck®

3809



6.4.1 Distribución del microchip PapilloCheck®

Cada microchip PapilloCheck® contiene 12 micromatrices designadas como pocillos del A1 al B6. Cada micromatriz PapilloCheck® se compone de 28 sondas diferentes y tiene un reborde elevado. Cada sonda se marca en cinco réplicas. La distribución de la micromatriz PapilloCheck® se ilustra en la figura 2 y los controles del microchip se explican con más detalle en el capítulo 6.4.2.

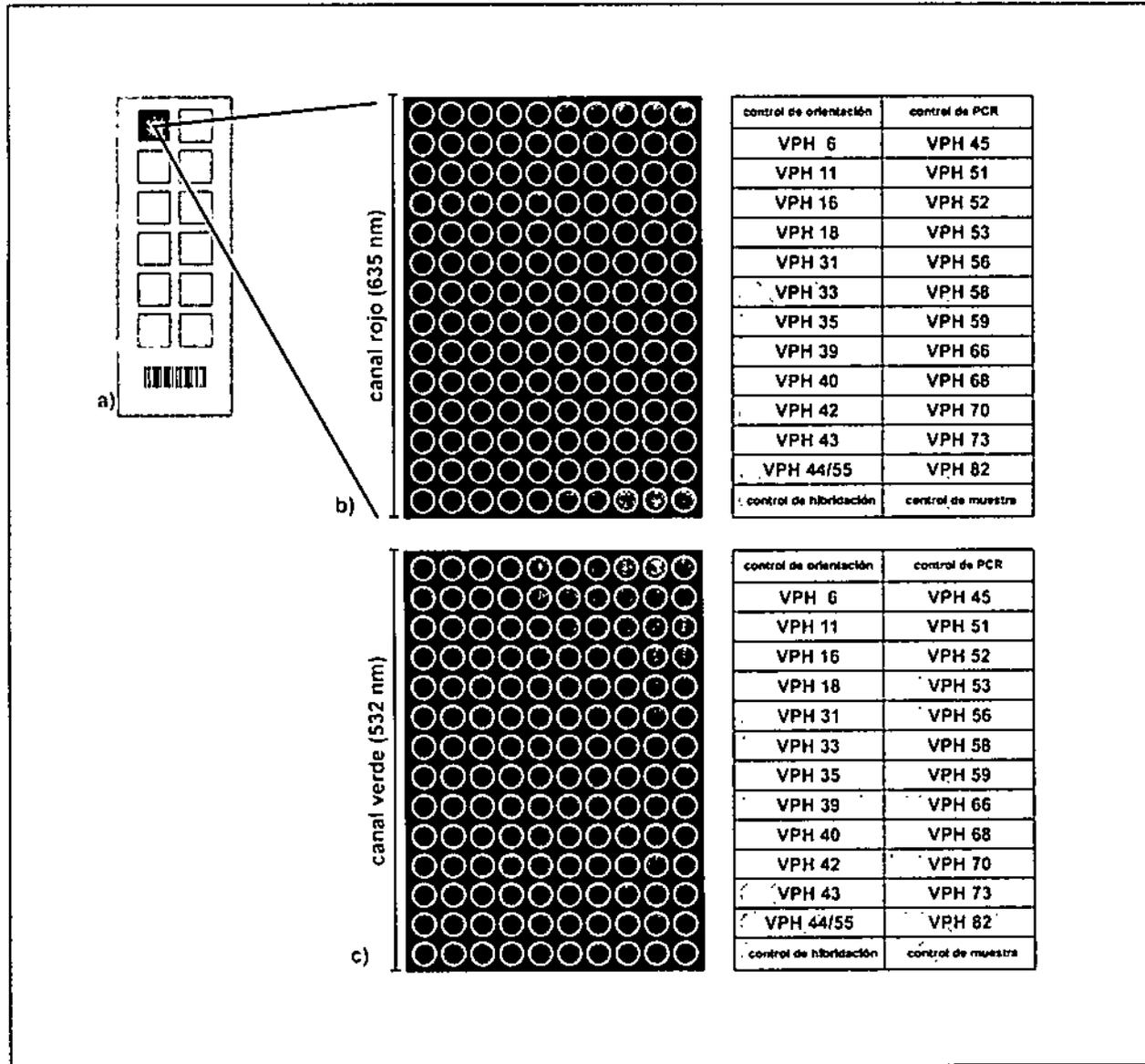


Figura 2: Diseño del microchip PapilloCheck®

a) Dibujo esquemático del microchip PapilloCheck®. b) y c) Imágenes mostradas por el software CheckReport™ para las dos longitudes de onda de excitación diferentes usadas para el escaneo (b) canal rojo: 635 nm; c) canal verde: 532 nm) y dibujos esquemáticos de la distribución de la micromatriz PapilloCheck®. Se indican las sondas específicas del tipo de VPH y los controles del microchip.

Daniela Croce
 Daniela Croce
 Farmacéutica
 M.P.: 20070

RONZALO GOURK
 GERENTE GENERAL
 NIPRO MEDICAL CORP.
 SUC. ARG.

6.4.2 Controles del microchip

El diseño del microchip de ADN PapilloCheck® incorpora unos completos controles integrados en el microchip. Varios sistemas de control supervisan todos los pasos críticos del ensayo y el procesamiento del microchip, lo que incluye la calidad de la muestra y la extracción de ADN (control de muestra), la calidad de la reacción PCR (control de PCR), la eficiencia de la hibridación (control de hibridación), así como la homogeneidad de las marcas y la calidad de impresión (control de orientación y control de impresión). Además de la presencia o ausencia de los tipos de VPH, el software CheckReport™ muestra de forma automática tanto los valores correspondientes de los controles como los tipos de VPH detectados en un informe detallado. Para la lectura de los diferentes controles, se utilizan ambas longitudes de onda de excitación de CheckScanner™. Para el control del rendimiento del ensayo (control de muestra y de PCR), se usa el canal rojo (longitud de onda de excitación de 635 nm), mientras que la calidad de la hibridación y el microchip (control de hibridación, orientación e impresión) se evalúa en el canal verde (longitud de onda de excitación de 532 nm).

Control de muestra

PapilloCheck® controla la calidad de la muestra y/o la extracción de ADN mediante la amplificación de un fragmento de una copia del gen humano ADAT1 (adenosina desaminasa específica del ARN humano1). Si hay presente ADN humano en una cantidad adecuada en el ADN extraído de la muestra cervicouterina, se genera una señal fluorescente en las marcas de control de muestra.

Si la amplificación de ADAT1 es insuficiente o inexistente, el software CheckReport™ indicará el error en el control de muestra (Failed) y se deberá repetir el análisis, como consecuencia de una cantidad insuficiente de células en la muestra cervicouterina y/o el rendimiento insuficiente de la extracción (consulte el capítulo 9).

Control de PCR

PapilloCheck® también controla la calidad de la reacción PCR. La amplificación de una plantilla de control interna presente en el PapilloCheck® PCR MasterMix genera una señal en las marcas de control de PCR en el microchip PapilloCheck®. Además, se evalúa la calidad de la reacción de amplificación automáticamente en el software CheckReport™. Si el rendimiento de la PCR es inferior a un umbral predefinido, el software CheckReport™ indicará el error en el control de PCR (Failed) y se deberá repetir el análisis (consulte el capítulo 9).

Si la cantidad de ADN de VPH en la muestra es muy elevada, la señal fluorescente de las marcas de control de PCR puede ser débil o incluso no aparecer, como consecuencia de la competición durante la reacción PCR. En este caso, la señal fluorescente de al menos una sonda específica de VPH debe superar un umbral predefinido para que el ensayo se considere válido.

Control de hibridación

PapilloCheck® controla la eficiencia de la hibridación mediante una sonda marcada con fluorescencia en el tampón de hibridación PapilloCheck®, que hibrida según secuencias de ADN específicas en el microchip PapilloCheck®. Una hibridación con la eficiencia adecuada da como resultado señales fluorescentes en cada marca de la matriz. Los resultados de cinco marcas de control de hibridación en el microchip PapilloCheck® también se evalúan mediante el software CheckReport™.

Control de orientación y de impresión

Las marcas de control de orientación del microchip PapilloCheck® generan señales fluorescentes con independencia de la eficiencia del proceso de hibridación. Estas marcas se usan en el software CheckReport™ como puntos de guía para la búsqueda de marcas correctas, que es un requisito previo para analizar las señales correctamente. Además, se controla la calidad del proceso de impresión mediante la presencia de una señal fluorescente verde en cada marca del microchip (control de impresión).



7. INSTRUCCIONES PARA LA SECUENCIA DE TRABAJO DE PAPILOCHECK®

7.1 Instrucciones generales

Al implementar en un laboratorio técnicas de vanguardia de uso actual en la biología molecular, se deben tener en cuenta las siguientes instrucciones para garantizar la máxima seguridad del personal del laboratorio y la elevada calidad de los resultados.

En general, la ejecución de técnicas de biología molecular tales como la extracción de ADN, la amplificación y la detección de productos de la amplificación requiere de personal con la formación adecuada. Además, es preciso contar con una secuencia de trabajo clara y bien estructurada que impida la obtención de resultados erróneos como consecuencia de la degradación o la contaminación del ADN por productos de la amplificación. Para garantizar esto, es necesario separar las zonas dedicadas a la extracción, la amplificación y la detección, según se describe en el capítulo 7.2.

Cada zona debe estar provista de equipos, consumibles, batas de laboratorio y guantes diferentes. No transfiera nunca las batas, los guantes ni el equipo de una zona separada a otra.

7.2 Separación de las salas

La figura 3 muestra un ejemplo de cómo se puede dividir un laboratorio en tres secciones diferentes. Una se utiliza únicamente para la extracción de ADN, otra se dedica a la preparación y generación de las reacciones PCR y la última se dedica a la hibridación y al análisis. Cada sala se debe utilizar exclusivamente para la aplicación o técnica indicadas a fin de impedir la contaminación de las muestras. El uso de diferentes colores puede ayudar a evitar un intercambio accidental de equipo y consumibles entre las zonas.

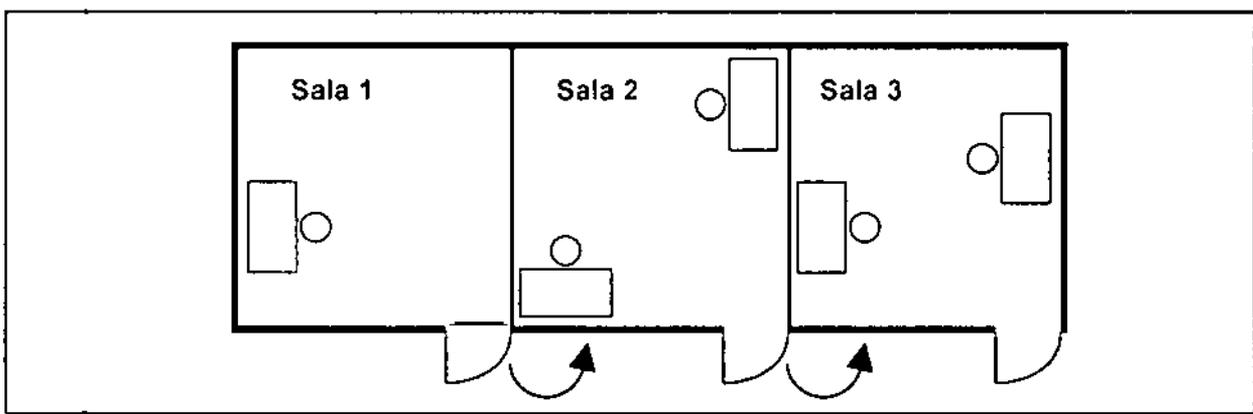


Figura 3: Separación de las salas

Sala 1: se debe realizar el procedimiento de extracción de ADN completo en esta sala.
Sala 2: en esta sala, se prepara la mezcla de reacción para PCR y se crean alícuotas (idealmente, bajo una campana PCR). La adición de las muestras de ADN extraídas en la sala 1 se debe realizar en un espacio diferente en la sala 2.
Sala 3: en la tercera sala del laboratorio, se llevan a cabo la reacción de hibridación, los pasos de lavado y el secado del microchip. Además, se usa CheckScanner™ junto con el software CheckReport™ para realizar el análisis final del ensayo PapilloCheck®.



No se deben intercambiar equipo ni consumibles entre las diferentes salas y espacios del laboratorio. Por tanto, la duplicación del equipo y los consumibles es necesaria y se debe tener en cuenta al equipar el laboratorio.

Dafne La Croce
Dafne La Croce
Farmacéutica
M.P.:20070

Gonzalo Gouk
GONZALO GOUK
GERENTE GENERAL
NIRO MEDICAL CORP.
SUC. ARG.



7.3 Advertencias y precauciones

7.3.1 Prevención de la contaminación

- Se debe llevar una bata de laboratorio durante el procedimiento y utilizar una bata diferente para cada sala del laboratorio.
- Se deben llevar guantes durante cada paso del análisis y se deben cambiar con frecuencia, especialmente durante la extracción de ADN.
- El lugar de trabajo se debe descontaminar con un limpiador adecuado.
- No toque nunca la parte interior de la tapa del microtubo. Para evitar la contaminación cruzada, abra solamente un tubo cada vez.
- Utilice puntas de filtro de micropipeta anti-aerosol adecuadas (libres de desoxirribonucleasa, ribonucleasa y ADN humano). Es preciso cambiar siempre las puntas de pipeta tras una transferencia de líquido.

7.3.2 Instrucción para la manipulación de microchips de ADN

- Los microchips de ADN se deben utilizar en un entorno libre de polvo. Se debe evitar la sedimentación de polvo y otras partículas en la superficie del microchip.
- No toque la zona de hibridación en la superficie del microchip.
- El único lado del microchip destinado a la hibridación es el etiquetado.
- No utilice rotuladores para identificar los microchips de ADN, ya que pueden producir una fluorescencia no específica en el microchip.
- Las matrices de ADN son exclusivamente de un solo uso. No se pueden reutilizar los microchips hibridados.
- Almacene los microchips sin usar en el envase original dentro de la bolsa con cierre que contiene el desecante.

7.3.3 Precauciones generales

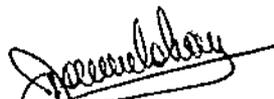
- Este equipo está destinado únicamente al diagnóstico in vitro y debe ser utilizado exclusivamente por personal formado en las prácticas de laboratorio para el diagnóstico in vitro.
- Cuando reciba el equipo, compruebe que los componentes no estén dañados. Si uno de los componentes estuviera dañado (por ejemplo, frascos de tampón), póngase en contacto con su distribuidor local de Greiner Bio-One. No utilice los componentes dañados del equipo, ya que podría obtener unos resultados deficientes.
- No utilice el equipo de ensayo PapilloCheck® después de la fecha de caducidad.
- No utilice reactivos caducados.
- No mezcle reactivos procedentes de lotes diferentes.
- Use únicamente los reactivos y el equipo proporcionados con el equipo y aquellos recomendados por el fabricante.
- Se debe realizar la calibración y el mantenimiento de las micropipetas, el baño María y el bloque de calentamiento con regularidad.
- El pipeteado de pequeñas cantidades de líquido en el intervalo de microlitros resulta dificultoso. Por lo tanto, realice el pipeteado con la mayor precisión posible.
- Para evitar la contaminación microbiana de los reactivos, tenga cuidado al extraer alícuotas de los microtubos.
- Todos los pasos de centrifugado deberían realizarse a temperatura ambiente (18-25 °C).

7.3.4 Seguridad en el trabajo

3809



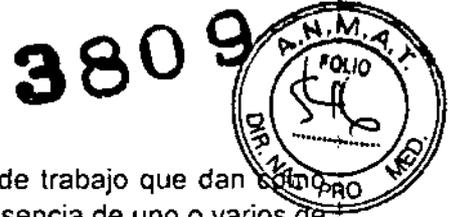
- Extreme la precaución al manipular las muestras biológicas que contengan material de origen humano potencialmente infeccioso. Para minimizar el riesgo de infección con material potencialmente infeccioso, se recomienda trabajar en una cabina de flujo laminar hasta que complete la lisis de las muestras. Manipule y elimine todas las muestras biológicas como si pudieran transmitir agentes infecciosos.
- No pipetee nunca las soluciones utilizando la boca.
- No coma, beba, fume ni aplique productos cosméticos en las zonas de trabajo.
- Evite el contacto directo con las muestras biológicas y evite salpicarlas o pulverizarlas.
- Lleve siempre una bata de laboratorio, guantes y gafas de seguridad cuando trabaje con muestras humanas.
- Lávese las manos de forma exhaustiva después de manipular muestras y reactivos.


Daniela Croce
Farmacéutica
M.P.:20070


GONZALO GOURK
GERENTE GENERAL
NIPRO MEDICAL CORP.
SUC. ARG.



8. PROCEDIMIENTO DE PAPILOCHECK®



En el siguiente capítulo, se describen con detalle los diferentes pasos de trabajo que dan como resultado un informe detallado que indica claramente la presencia o la ausencia de uno o varios de los 24 tipos de VPH detectables en cada muestra cervicouterina analizada. La figura 4 muestra un resumen de los diferentes pasos de trabajo necesarios. También indica el apartado correspondiente donde se describe el paso de ensayo específico. Los pasos de trabajo se deben realizar en el orden indicado en este capítulo. Los pasos prácticos específicos se indican con una flecha azul ➔.



La toma de muestras, la extracción de ADN y el análisis con el software CheckReport™ no forman parte del equipo de ensayo PapilloCheck®. Por tanto, la descripción de estos pasos de trabajo ofrecida en este capítulo está abreviada. Para obtener información más detallada, consulte los manuales de instrucciones correspondientes, por ejemplo, del equipo de toma de muestras PapilloCheck®, el equipo de extracción de ADN oCheck® y el software CheckReport™.

8.1 Toma de muestras y extracción de ADN

8.1.1 Toma de muestras

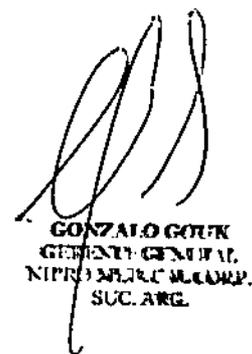
La toma de muestras no forma parte del equipo de ensayo PapilloCheck®. Greiner Bio-One también ofrece un equipo de toma de muestras especializado (equipo de toma de muestras PapilloCheck®); consulte la información sobre pedidos en el capítulo 2.

PapilloCheck® se ha validado con ADN preparado con el equipo de extracción de ADN oCheck® a partir de citologías cervicouterinas humanas con uno de los siguientes sistemas o medios de toma de muestras:

- Equipo de toma de muestras PapilloCheck® (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemania)
- PreservCyt® (Hologic, Bedford, MA, EE. UU.)
- Surepath™ (BD, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.)
- STM™ (Qiagen, Hilden, Alemania)

Para obtener más información sobre los sistemas de extracción de ADN o los medios de transporte adecuados, póngase en contacto con el distribuidor local de Greiner Bio-One o visite el sitio web de Greiner Bio-One: www.gbo.com/bioscience/biochips_download

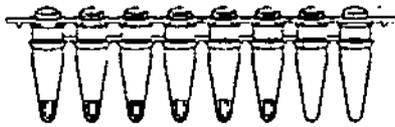

Daniela Croce
Farmacéutica
M.P.:20070


GONZALO GÓTZ
GERENTE GENERAL
NIPRO MEDICAL COMPANY
SUC. ARG.

Capítulo 8.1.2 Extracción de ADN



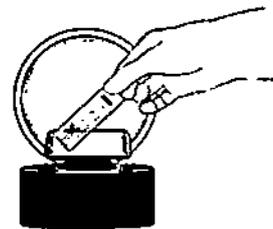
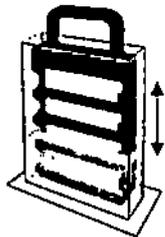
Capítulo 8.2 PCR



Capítulo 8.3.2 Hibridación



Capítulo 8.3.3 Lavado y secado



Capítulo 8.4 Escaneo y evaluación

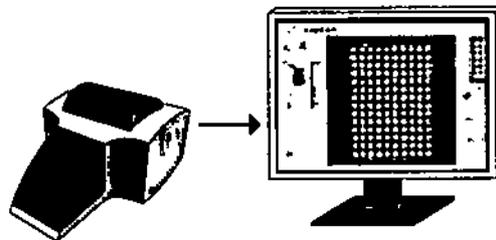


Figura 4: Resumen de los diferentes pasos de trabajo de PapilloCheck®

3809



8.1.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN no forma parte del equipo de ensayo PapilloCheck®. La extracción de ADN antes del análisis PapilloCheck® se debe realizar con el equipo de extracción de ADN oCheck®, también suministrado por Greiner Bio-One (consulte la información sobre pedidos en el capítulo 2). Siga las instrucciones de uso detenidamente cuando utilice el equipo de extracción de ADN oCheck®.

Para la extracción de ADN con el equipo de extracción de ADN oCheck®, se deben utilizar 250 µl de solución de muestra.

Las muestras de citologías cervicouterinas humanas que se tomen

- con el equipo de toma de muestras PapilloCheck® (Greiner Bio-One; n.º de catálogo 465 070)
- en medio de toma de muestras PreservCyt® (Hologic, Bedford, MA, EE. UU.) se pueden procesar directamente.

Las muestras de citologías cervicouterinas que se tomen en

- el medio de toma de muestras Surepath™ (BD, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) se deben lavar antes de usarlas: centrifugue 250 µl de la muestra durante 5 minutos a 11.000 g y resuspenda el pellet en 250 µl de agua destilada. Después, se pueden procesar los 250 µl con el equipo de extracción de ADN oCheck®.

Las muestras de citologías cervicouterinas que se tomen en

- el medio de toma de muestras STM™ (Qiagen, Hilden, Alemania) se deben diluir: use 100 µl de la muestra y añada 150 µl de agua destilada. Después, se pueden procesar los 250 µl de la muestra diluida con el equipo de extracción de ADN oCheck®.

En general, si la muestra de la citología cervicouterina parece estar muy concentrada y ya agregada, es necesario diluir y homogeneizar la muestra antes de comenzar el proceso de extracción de ADN.

Las muestras de citologías cervicouterinas que estén muy diluidas y no presenten células visibles deben concentrarse a fin de obtener un mayor volumen de células para la extracción de ADN: centrifugue un máximo de 1000 µl de la muestra durante 5 minutos a 11.000 g y resuspenda el pellet en 250 µl de agua destilada. Después, se pueden procesar los 250 µl con el equipo de extracción de ADN oCheck®.



Este paso de concentración solo es adecuado para las muestras de citologías cervicouterinas que se tomaron con el equipo de toma de muestras PapilloCheck®, en el medio de toma de muestras PreservCyt® o Surepath™. Si se usó el medio de toma de muestras STM™, no es posible concentrar mediante centrifugado

Daniela Croce
Farmacéutica
M.P.:20070

GONZALO GOUK
GERENTE GENERAL
NIPRO MEDICAL CORP.
SUC. ARG.

3809



8.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es un método muy sensible que puede detectar cantidades extremadamente reducidas de ADN. Se deben extremar las precauciones para evitar la contaminación de la reacción (consulte el capítulo 7). Se requieren polimerasa HotStarTaq[®] y uracil-N-glucosilasa, las cuales no se suministran con el equipo de ensayo PapilloCheck[®] y deben adquirirse por separado (consulte el capítulo 2).

! El equipo de ensayo PapilloCheck[®] se ha validado con polimerasa HotStarTaq[®] de Qiagen y uracil-N-glucosilasa de Fermentas (consulte la información sobre pedidos en el capítulo 2). Es obligatorio usar estas enzimas para lograr el rendimiento establecido.

8.2.1 Preparación del termociclador

El equipo de ensayo PapilloCheck[®] se ha validado con los siguientes termocicladores:

- GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- Veriti[™] 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems)

! Es absolutamente necesario usar uno de los termocicladores mencionados antes para lograr el rendimiento establecido.

El programa del termociclador de la PCR PapilloCheck[®] se resume en la tabla 2.

Tabla 2: Programa del termociclador para la PCR PapilloCheck[®]

Tiempo	Temp. °C	N.º de ciclos
20 min	37 °C	1
15 min	95 °C	1
30 s	95 °C	40
25 s	55 °C	
45 s	72 °C	
30 s	95 °C	15
45 s	72 °C	
Espera	10 °C	

Además, se deben establecer los siguientes parámetros de ejecución en cada termociclador. Para obtener una descripción de cómo establecer estos parámetros, consulte el manual de instrucciones del termociclador en cuestión.

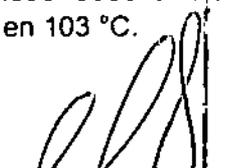
GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems)

Establezca el volumen de reacción en 26 µl, la velocidad de incremento en "9600" y use la temperatura de tapa 103 °C.

Veriti[™] 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems)

Use la herramienta de conversión de método (Convert Method) del termociclador Veriti[™] 96-Well Thermal Cycler para introducir el programa de PCR PapilloCheck[®] y elija el modo "9600 Emulation Mode". Establezca el volumen de reacción en 26 µl y la temperatura de tapa, en 103 °C.


Daniela Croce
Farmacéutica
M.P.:20070


GONZALO GOUK
GERENTE GENERAL
NIPRO MEDICAL CORP.
SUC. ARG.

3809



8.2.2 Tratamiento de uracil-N-glucosilasa (UNG)⁵

El PapilloCheck[®] PCR MasterMix contiene dUTP, que se incorpora a los productos de la amplificación durante la PCR PapilloCheck[®], lo que convierte los productos de la PCR en susceptibles a la degradación mediante UNG. La UNG divide el producto de la PCR en los sitios donde se ha incorporado un residuo de desoxiuridilato. Los productos de la PCR divididos no se amplificarán en una reacción subsiguiente. Por tanto, se puede utilizar un tratamiento de UNG para eliminar la contaminación cruzada de anteriores reacciones PCR.⁶

- Diluya la uracil-N-glucosilasa 1:200 en agua grado PCR. Use una nueva dilución de UNG para cada reacción PCR PapilloCheck[®] preparada (consulte el capítulo 8.2.3). No reutilice la UNG diluida.
- Mezcle la dilución de UNG con cuidado; para hacerlo, mézclela con un Vortex durante 2 segundos y después centrifúguela, o bien pipetéela arriba y abajo varias veces.

La concentración original de uracil-N-glucosilasa es 1 U/μl. Por consiguiente, la concentración de la dilución es 0,005 U/μl.



El equipo de ensayo PapilloCheck[®] se ha validado con uracil-N-glucosilasa de Fermentas (consulte el capítulo 2). Es obligatorio usar esta enzima para lograr el rendimiento establecido.

- Añada 1 μl de esta dilución a cada reacción PCR PapilloCheck[®] (consulte el capítulo 8.2.3, Tabla 3).

Esta cantidad es suficiente para eliminar la contaminación cruzada de PCR. Tenga cuidado de no usar una solución de UNG con mayor concentración, ya que esto podría tener un efecto negativo sobre el rendimiento de la PCR, lo que reduciría la sensibilidad de PapilloCheck[®].

En general, para el tratamiento de UNG, la mezcla de la reacción PCR se incuba durante 20 minutos a 37 °C. Después, se inactiva la UNG con un paso de incubación adicional de 15 minutos a 95 °C. Estos dos pasos ya están incorporados en la PCR PapilloCheck[®] y se corresponden con los dos primeros pasos del programa del termociclador (consulte la tabla 2). Durante el segundo paso (15 minutos a 95 °C), se producen tanto la inactivación de la uracil-N-glucosilasa como la activación de la polimerasa HotStarTaq[®].



El sistema de UNG incorporado de la PCR PapilloCheck[®] solamente eliminará la contaminación cruzada con productos de la PCR de reacciones PCR anteriores. No se podrá eliminar otro tipo de contaminación, por ejemplo, la que se produce durante la preparación de las muestras, la extracción de ADN o la adición de la plantilla de PCR. Por lo tanto, es necesario seguir las instrucciones y las precauciones especiales para impedir la contaminación, descritas en el capítulo 7.


Daniela Croce
Farmacéutica
M.P.:20070


GONZALO GOUR
GERENTE GENERAL
NIPRO MEDICAL CORP.
SUC. ARG.

⁵ La adquisición de PapilloCheck[®] va acompañada de una licencia limitada bajo los números de patente de EE. UU. 5.035.996; 5.683.896; 5.945.313; 6.287.823; y 6.518.026 y las patentes correspondientes en otros países.

⁶ Longo, M.C., et al., Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions, Gene, 93, 125-128, 1990.

8.2.3 Preparación de la reacción PCR

3809



A excepción de la polimerasa HotStarTaq® y la uracil-N-glucosilasa, el PapilloCheck® PCR MasterMix ya contiene todos los componentes necesarios para realizar la reacción PCR (tampón de PCR, MgCl₂, dNTPs, cebadores, plantilla de control de PCR).



El equipo de ensayo PapilloCheck® se ha validado con la polimerasa HotStarTaq® de Qiagen (consulte el capítulo 2). Es obligatorio usar esta enzima para lograr el rendimiento establecido.

Idealmente, la preparación de la mezcla de reacción se debe realizar en un entorno con protección, como una campana PCR, para evitar la contaminación de la reacción.

- Prepare la mezcla de reacción (compuesta por PapilloCheck® PCR MasterMix, polimerasa HotStarTaq® y uracil-N-glucosilasa) para la cantidad necesaria de reacciones PCR según lo descrito en la Tabla 3.

Para analizar varias muestras, se debe preparar la mezcla de reacción en un lote (en la cantidad necesaria para todos los análisis). Para adaptarse a las variaciones de volumen durante el pipeteado, se recomienda aumentar el número de reacciones (n) a tenor de 1 por cada microchip (=n+1), por ejemplo, prepare un volumen de mezcla de reacción para 13 reacciones de amplificación si se van a analizar 12 muestras (consulte la tabla 3). Utilice siempre una ampolla de MasterMix para las reacciones de un microchip.



Se recomienda incluir un control negativo para cada lote de PapilloCheck® PCR MasterMix preparado. Se pueden usar como control negativo el tampón de elución del ADN del equipo de extracción de ADN adecuado o agua de categoría PCR.

- Mezcle exhaustivamente la mezcla de reacción; para hacerlo, mézclela con un Vortex durante 2 segundos y después centrifúguela, o bien pipetéela arriba y abajo varias veces.
- Divida la mezcla de reacción en alícuotas pipeteando 21 µl de la mezcla de reacción para cada reacción PCR en un microtubo para PCR fino de 0,2 ml.

Realice la adición del ADN mensajero en una zona de trabajo diferente a la de la preparación de la mezcla de reacción (consulte el capítulo 7.2).

- Añada 5 µl del ADN extraído a cada reacción PCR y mézclelo con un Vortex durante 2 segundos y después centrifúguelo, o bien pipetéelo arriba y abajo varias veces. El volumen total de una reacción PCR es 26 µl.
- Coloque los microtubos en el termociclador e inicie la reacción PCR con el programa del termociclador descrito en el capítulo 8.2.1 (Tabla 2).



Una vez completada la PCR, se deberían usar los productos de la amplificación inmediatamente para la hibridación, o bien se deberían almacenar a oscuras a -20 °C durante una semana.


Daniela Croce
Farmacéutica
M.P.:20070


GONZALO GOUK
GERENTE GENERAL
NIPRO MEDICAL CORP.
SUC. ARG.



Tabla 3: Preparación de la reacción PCR PapilloCheck®

3809



	1 reacción	13 reacciones (1 microchip)	26 reacciones (2 microchips)	39 reacciones (3 microchips)	52 reacciones (4 microchips)
PapilloCheck® PCR MasterMix	19,8 µl	257,4 µl	514,8 µl	772,2 µl	1029,6 µl
Polimerasa HotStarTaq® (5 U/µl)	0,2 µl	2,6 µl	5,2 µl	7,8 µl	10,4 µl
Uracil-N-glucosilasa (dilución de 1:200, 0,005 U/µl)	1 µl	13 µl	26 µl	39 µl	52 µl
Volumen total antes de añadir el ADN de muestra	21 µl	273 µl	546 µl	819 µl	1092 µl
ADN extraído de muestra cervicouterina (ADN mensajero)	5 µl				
Volumen total por reacción	26 µl				

Daniela Croce
 Daniela Croce
 Farmacéutica
 M.P.:20070

Gonzalo Gour
 GONZALO GOUR
 GERENTE GENERAL
 NIPRO MEDICAL CORP.
 SUC. ARG.

[Handwritten signature]

8.3 Hibridación y lavado

3809



8.3.1 Preparación

La hibridación se debe realizar a temperatura ambiente (20-25 °C). Comience con los preparativos necesarios para la hibridación y los pasos de lavado al menos 30 minutos antes de iniciar el procedimiento de hibridación.

- Para disolver los potenciales precipitados en los tampones de lavado e hibridación, expóngalos a temperatura ambiente (20-25 °C) durante 30 minutos y mézclelos bien antes de usarlos.

El almacenamiento del equipo de ensayo PapilloCheck® a 4-8 °C puede dar como resultado la precipitación de dodecilsulfato de sodio en los tampones B y de hibridación. Deje que las soluciones se equilibren a temperatura ambiente y después mezcle el tubo en el Vortex o agite el frasco hasta que se disuelvan los precipitados.

- Prepare la cámara de hibridación oCheck®: coloque una nueva toallita de papel humedecida en la cámara de hibridación y cierre la tapa para crear una atmósfera saturada de humedad.

Para evitar la evaporación del pequeño volumen de mezcla de hibridación utilizada en el microchip, es necesario realizar la hibridación en una atmósfera saturada de humedad. Greiner Bio-One suministra una cámara de hibridación especializada para el análisis PapilloCheck® (consulte el capítulo 2).

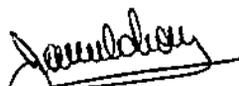
- Incube la cantidad necesaria de microchips PapilloCheck® en la cámara de hibridación preparada a temperatura ambiente (20-25 °C) durante al menos 10 minutos.

! El soporte de portaobjetos magnético de la cámara de hibridación contiene un imán solamente en uno de sus extremos. Si se van a hibridar en paralelo menos de cuatro microchips PapilloCheck®, tenga cuidado de llenar el soporte con microchips PapilloCheck® empezando desde el lado opuesto al imán. De lo contrario, los microchips PapilloCheck® no quedarán sumergidos durante el procedimiento de lavado.

- Prepare las soluciones de lavado I, II y III según las siguientes instrucciones.

Preparación de las soluciones de lavado I, II y III:

- Prepare la mezcla de solución de lavado para las soluciones de lavado I, II y III adecuadas para el número de microchips PapilloCheck® que se vayan a analizar, como se muestra en la tabla 4.
- Divida tres alícuotas con el mismo volumen de mezcla de solución de lavado en tres recipientes de lavado oCheck® diferentes y etiquételas como solución de lavado I, II y III. Cada recipiente de lavado oCheck® contiene una escala grabada, que indica la cantidad correcta de solución de lavado necesaria para un máximo de 4 microchips. Use esta escala para comprobar la cantidad de tampón.
- Precaliente la solución de lavado II a 50 °C en un baño María con temperatura controlada durante al menos 20 minutos antes de usarla. Asegúrese de que el nivel de llenado del baño María sea equivalente al de la solución de lavado II.


Daniela Croce
Farmacéutica
M.P.:20070


GONZALO GOUK
GERENTE GENERAL
NIPRO MEDICAL CORP.
SUC. ARG.

3809



Tabla 4: Preparación de la mezcla de solución de lavado

Los volúmenes resumidos en esta tabla son suficientes para los tres pasos de lavado (soluciones de lavado I, II y III) para el número indicado de microchips PapilloCheck®

Componentes	Número de microchips PapilloCheck®			
	1	2	3	4
Agua destilada o desionizada	140 ml	280 ml	420 ml	560 ml
Tapón A PapilloCheck®	14 ml	28 ml	42 ml	56 ml
Tapón B PapilloCheck®	1,75 ml	3,5 ml	5,25 ml	7 ml
Volumen total	155,75 ml	311,50 ml	467,25 ml	623 ml

! No reutilice nunca las soluciones de lavado, ya que esto podría resultar en una acumulación del producto de PCR eliminado, lo que podría interferir con los resultados de PapilloCheck®. Use soluciones de lavado nuevas para cada ensayo.

La mezcla de solución de lavado preparada se puede almacenar durante un máximo de una semana a temperatura ambiente. Compruebe si hay precipitados de dodecilsulfato de sodio. De haberlos, calienté la mezcla de solución de lavado hasta que se disuelvan y equilibre de nuevo a temperatura ambiente. A continuación, realice los preparativos para el siguiente experimento de hibridación.

Daniela Croce
 Daniela Croce
 Farmacéutica
 M.P.: 20070

Gonzalo Gouk
 GONZALO GOUK
 GERENTE GENERAL
 NIPHO MEDICAL CORP.
 SUC. ARG.

[Handwritten signature]



8.3.2 Hibridación

La hibridación se debe realizar a temperatura ambiente (20-25 °C). Los pasos de trabajo del principio para hibridar los productos de PCR de la reacción PCR PapilloCheck® en el microchip PapilloCheck® se muestran en la figura 5.

- Mezcle los productos de la PCR antes de usarlos. Centrifúguelo brevemente.

Si los productos de la PCR se almacenaron a -20 °C hasta la hibridación, primero descongéuelos antes de mezclarlos y después continúe según lo descrito.

- Mezcle el tampón de hibridación en el Vortex antes de usarlo. Centrifúguelo brevemente.
- Mezcle 30 µl del tampón de hibridación PapilloCheck® en un microtubo nuevo de una banda PCR con 8 tubos con 5 µl del producto de la PCR mezclándolo con un Vortex, o bien pipeteándolo arriba y abajo varias veces.
- Centrifúguelo brevemente.
- Transfiera 25 µl de la mezcla de hibridación a cada pocillo del microchip usando los seis canales de una multipipeta. Evite la formación de burbujas de aire.

Se recomienda procesar seis muestras en paralelo usando una multipipeta de 8 canales y bandas PCR con 8 tubos (consulte la figura 5). Esto aumenta la eficiencia y velocidad de la manipulación, lo que reduce el riesgo de evaporación. Si se va a procesar más de un portaobjetos al mismo tiempo, es obligatorio usar una multipipeta para lograr el tiempo correcto de hibridación.

Si es posible, hibride los 12 pocillos del microchip. Si va a procesar menos de 12 muestras, deje vacíos los pocillos sin usar. Los pocillos sin usar de un microchip procesado no se pueden usar para muestras futuras.

! Manipule el microchip con cuidado para no derramar la mezcla de hibridación. Los derrames pueden ocasionar la contaminación cruzada de muestras y resultados falsamente positivos.

Incube el microchip durante exactamente 15 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C) dentro de la cámara de hibridación preparada en una atmósfera oscura y saturada de humedad. Tenga cuidado de no mover la cámara de hibridación durante el proceso.

! No cambie nunca el tiempo ni la temperatura de incubación de la reacción de hibridación, ya que podría causar una pérdida de intensidad en la señal fluorescente o un aumento de la fluorescencia no específica.

No deje que los microchips hibridados entren en contacto directo con la luz del sol.

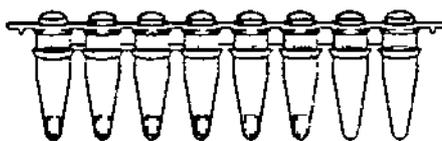
Daniela Croce
Daniela Croce
Farmacéutica
M.P.:20070

Gonzalo Gouk
GONZALO GOUK
GERENTE GENERAL
NIPRO MEDICAL CORP.
SUC. ARG.

- ➔ Prepare una atmósfera saturada de humedad en la cámara de hibridación.
- ➔ Incube la cantidad necesaria de microchips PapilloCheck® en la cámara de hibridación a temperatura ambiente (20-25 °C) (consulte el capítulo 8.3.1).



- ➔ Mezcle 30 µl del tampón de hibridación PapilloCheck® en un microtubo de 0,2 ml de una banda PCR con 5 µl del producto de la PCR. Mézclelo bien.



- ➔ Transfiera 25 µl de la mezcla de hibridación a cada pocillo del microchip PapilloCheck® usando una multipipeta.



- ➔ Cierre la cámara de hibridación e incube el microchip PapilloCheck® durante exactamente 15 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C).



Figura 5: Pasos de trabajo del proceso de hibridación

Daniela Croce
 Daniela Croce
 Farmacéutica
 M.P.:20070

Gonzalo Gouk
 GONZALO GOUK
 GERENTE GENERAL
 NIPRO MEDICAL CORP.
 SUC. ARG.

8.3.3 Lavado y secado

3809

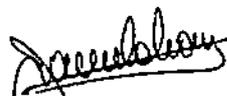


El equipo especializado suministrado por Greiner Bio-One permite realizar el lavado en paralelo de hasta cuatro microchips PapilloCheck® (consulte el capítulo 2). El equipo adicional necesario para procesar los microchips PapilloCheck® se compone de tres recipientes de lavado oCheck® y un asa para el soporte de portaobjetos magnético de la cámara de hibridación.

Los diferentes pasos de trabajo se muestran en la figura 6.

- Retire cuidadosamente el soporte de portaobjetos magnético que contiene los portaobjetos hibridados de la cámara de hibridación.
- Coloque el soporte de portaobjetos que contiene los portaobjetos directamente en el recipiente de lavado oCheck® con la solución de lavado I. Asegúrese de que el lado magnético esté orientado hacia arriba.
- Encaje el asa oCheck® en el soporte de portaobjetos y comience el primero de los tres pasos de lavado.
- Lave el microchip a temperatura ambiente (20-25 °C) en la solución de lavado I moviéndolo rápidamente arriba y abajo durante 10 segundos. Las matrices deben mantenerse sumergidas en la solución de lavado en todo momento.
- Lave el microchip durante 60 segundos en la solución de lavado II a 50 °C moviendo el soporte de portaobjetos arriba y abajo con fuerza.
- Lave el microchip a temperatura ambiente (20-25 °C) en la solución de lavado III moviéndolo rápidamente arriba y abajo durante 10 segundos.
- Inmediatamente, retire el líquido de la superficie del microchip mediante centrifugado. Si se utiliza una microcentrífuga especial para micromatrices, centrifúguelo durante 1 minuto. Si se usa una centrífuga apta para tubos de 50 ml, coloque cada microchip PapilloCheck® lavado en un tubo de 50 ml y centrifúguelo a temperatura ambiente durante 3 minutos a 500 g.

El microchip PapilloCheck® está ahora listo para escanearse, lo que se debería hacer de inmediato. Para limpiar los recipientes de lavado oCheck®, enjuáguelos varias veces en agua después de cada procedimiento completo de lavado y secado.


Daniela Croce
Farmacéutica
M.P.:20070

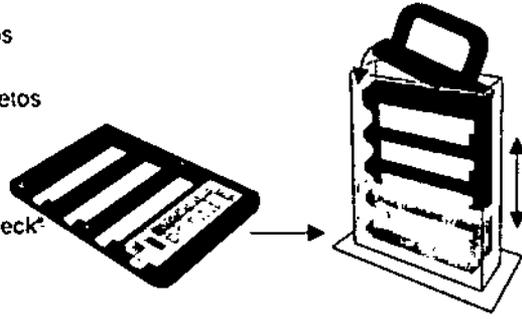

GONZALO GOUK
GERENTE GENERAL
NIPRO MEDICAL CORP.
SUC. ARG.





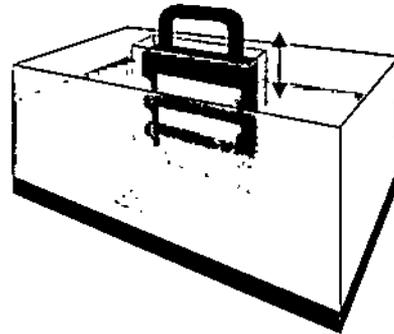
Primer paso de lavado

- Retire con cuidado el soporte de portaobjetos magnético de la cámara de hibridación.
- Coloque rápidamente el soporte de portaobjetos en el recipiente de lavado oCheck® con la solución de lavado I
- Encaje el asa oCheck®
- Lave el microchip o los microchips PapilloCheck® en la solución de lavado I a temperatura ambiente durante 10 segundos subiendo y bajando el soporte de portaobjetos



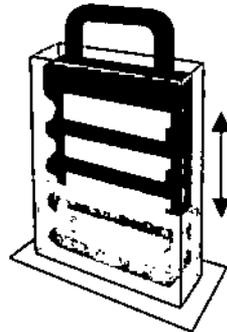
Segundo paso de lavado

- Lave el microchip o los microchips PapilloCheck® en la solución de lavado II en un baño María a 50 °C durante 60 segundos subiendo y bajando el soporte de portaobjetos.



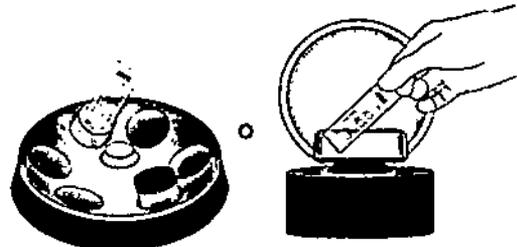
Tercer paso de lavado

- Lave el microchip o los microchips PapilloCheck® en la solución de lavado III a temperatura ambiente durante 10 segundos subiendo y bajando el soporte de portaobjetos



Secado

- Inmediatamente, retire el líquido de la superficie de los microchips PapilloCheck® mediante centrifugado.



3 minutos
500 g

1 minuto
máx. velocidad

Figura 6: Pasos de trabajo del proceso de lavado

Diferentes pasos de lavado y procedimiento de secado antes del análisis del microchip PapilloCheck® con CheckScanner™ y el software CheckReport™

Daniela Croce
 Daniela Croce
 Farmacéutica
 M.P.:20070

Gonzalo Gouk
 GONZALO GOUK
 GERENTE GENERAL
 NIPRO MEDICAL CORP.
 SUC. ARG.

[Signature]

3809



8.4 Escaneado y evaluación del microchip PapilloCheck®

Coloque el microchip o los microchips PapilloCheck® en CheckScanner™ y realice el escaneado como se describe con más detalle en el manual del usuario del software CheckReport™.

Para obtener información más detallada sobre la instalación de CheckScanner™ y el software CheckReport™, así como los requisitos del sistema informático, consulte los manuales de instrucciones correspondientes de CheckScanner™ y el software CheckReport™.

Siempre que se analicen datos con el software CheckReport™, asegúrese de que la versión del software CheckReport™ instalada en el PC coincida con la indicada en el equipo PapilloCheck® usado actualmente. Si las versiones no coinciden, actualice el software CheckReport™. La versión más reciente del software se puede descargar en el sitio web de Greiner Bio-One: www.gbo.com/bioscience/biochips_download


Daniela Croce
Farmacéutica
M.P.:20070


GONZALO GOUK
GERENTE GENERAL
NIPRO MEDICAL CORP.
SUC. ARG.



9. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

3809



Si aparece uno de los siguientes mensajes de error durante el escaneo del microchip o si el análisis PapilloCheck® genera un error debido a controles específicos en el microchip, proceda como se describe a continuación. No dude en ponerse en contacto con el distribuidor local de Greiner Bio-One si tiene alguna duda o experimenta dificultades al usar PapilloCheck®.

PROBLEMA y causa	Comentarios y sugerencias
<p>MENSAJE DE ERROR "COULD NOT READ BARCODE" (NO SE PUDO LEER EL CÓDIGO DE BARRAS)</p> <p>Código de barras dañado</p> <p>El microchip no se cargó correctamente</p>	<p>Compruebe si hay daños en el código de barras. Escriba el código de barras manualmente cuando aparezca la ventana correspondiente.</p> <p>Compruebe la orientación del microchip y escanéelo en la orientación correcta.</p>
<p>MENSAJE DE ERROR "MISSING SPOTS" (FALTAN MARCAS), ERROR EN EL CONTROL DE IMPRESIÓN O EN EL CONTROL DE ORIENTACIÓN</p> <p>Polvo en el microchip</p> <p>Formación de burbujas de aire durante la transferencia de líquido en el microchip</p>	<p>Repita la hibridación del producto o los productos de PCR en otro microchip.</p> <p>Repita la hibridación del producto o los productos de PCR en otro microchip. Pipeteo con cuidado para evitar la formación de burbujas de aire.</p>
<p>ERROR DEL CONTROL DE HIBRIDACIÓN</p> <p>Temperatura incorrecta de la solución de lavado II</p> <p>Temperatura incorrecta del baño María</p> <p>Preparación incorrecta de la mezcla de hibridación</p>	<p>El segundo paso de lavado se debe realizar a 50 °C. Asegúrese de que la solución de lavado II se caliente a 50 °C</p> <p>El segundo paso de lavado se debe realizar a 50 °C. Compruebe la temperatura del baño María. Asegúrese de que el baño María esté a una temperatura de 50 °C. Si es necesario, confirme la temperatura con un termómetro.</p> <p>Repita la preparación de la mezcla de hibridación con los volúmenes correctos e hibride los productos de la PCR en otro microchip.</p>


 Daniela Croce
 Farmacéutica
 M.P.:20070


 GONZALO GOUK
 GERENTE GENERAL
 NIPRO MEDICAL CORP.
 SUC. ARG.



PROBLEMA y causa	Comentarios y sugerencias
<p>ERROR DEL CONTROL DE PCR</p> <p>Polimerasa de ADN HotStarTaq® no añadida al MasterMix</p> <p>Adición de una polimerasa de ADN HotStarTaq® con funcionamiento incorrecto al MasterMix</p> <p>Adición de uracil-N-glucosilasa sin diluir al MasterMix</p> <p>Mezclado insuficiente de la mezcla de reacción</p> <p>Inhibidores de PCR presentes en la muestra</p> <p>Hibridación realizada sin añadir el producto de PCR</p> <p>Mezclado insuficiente de la mezcla de hibridación</p> <p>Problemas con el termociclador</p>	<p>Repita el análisis PapilloCheck® a partir de la preparación de la reacción PCR.</p> <p>Repita el análisis PapilloCheck® a partir de la preparación de la reacción PCR.</p> <p>Repita el análisis PapilloCheck® a partir de la preparación de la reacción PCR</p> <p>Repita el análisis PapilloCheck® a partir de la reacción PCR. Asegúrese de mezclar bien la mezcla de reacción.</p> <p>Repita la extracción de ADN y el análisis PapilloCheck®.</p> <p>Repita la hibridación.</p> <p>Repita la hibridación.</p> <p>Compruebe el funcionamiento del termociclador, así como la programación correcta del mismo (pasos de PCR, incremento térmico, volumen). Atención: use el termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) o Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) en combinación con PapilloCheck®.</p>
<p>ERROR DEL CONTROL DE MUESTRA</p> <p>ADN de muestra no añadido a la reacción PCR</p> <p>Error de preparación del ADN</p> <p>Material de muestra insuficiente</p>	<p>Repita el análisis PapilloCheck® a partir de la reacción PCR</p> <p>Repita la extracción de ADN.</p> <p>Toma de muestras incorrecta. La muestra está muy poco concentrada. Concéntrela de acuerdo con la descripción en el capítulo 9.1 y repita la extracción de ADN o la toma de muestras.</p>
<p>LOS CONTROLES DE MUESTRA Y/O DE PCR NO GENERAN ERROR PERO MUESTRAN UN VALOR DE SNR 0</p>	<p>Este resultado se considera válido si el software CheckReport™ detecta como mínimo un tipo de VPH en la muestra con una señal por encima de un umbral definido. Entonces, es posible que el control de muestra y/o de PCR muestre señales fluorescentes débiles o no las muestre en absoluto debido a competición durante la PCR.</p>

10. ASISTENCIA TÉCNICA

Greiner Bio-One cuenta con un departamento de servicio técnico compuesto por científicos con amplia experiencia tanto práctica como teórica en biología molecular y en los productos oCheck®. Si se tiene alguna duda o experimenta dificultades con los productos oCheck®, no dude en ponerse en contacto con el distribuidor local de Greiner Bio-One.

Daniela Croce
Daniela Croce
Farmacéutica
M.P.:20070

Gonzalo Gouk
GONZALO GOUK
GERENTE GENERAL
NIPRO MEDICAL CORP.
- SUC. ARG.



11. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO DE PAPILOCHECK®

11.1 Rendimiento analítico de PapilloCheck®

11.1.1 Sensibilidad analítica

El límite de detección (LD) se estableció usando plásmidos de referencia para cada tipo de VPH detectable que contenga la región E1 que es el objetivo de PapilloCheck®. Los LD se resumen en la tabla 8.

Tabla 8: Límites de detección de los tipos de VPH detectables

Genotipo de VPH	Copias / reacción	pg/ml**
VPH 6	30*	0,052
VPH 11	150*	0,26
VPH 16	50*	0,086
VPH 18	300*	0,516
VPH 31	300*	0,522
VPH 33	300*	0,519
VPH 35	750*	1,29
VPH 39	30*	0,052
VPH 40	30*	0,052
VPH 42	30*	0,052
VPH 43	100*	0,175
VPH 44	30*	0,052
VPH 45	50*	0,087
VPH 51	30*	0,051
VPH 52	100*	0,174
VPH 53	30*	0,052
VPH 56	30*	0,052
VPH 58	150*	0,255
VPH 59	50*	0,087
VPH 66	100*	0,171
VPH 68	30*	0,052
VPH 70	30*	0,052
VPH 73	200*	0,338
VPH 82	30*	0,052

* La concentración validada de cada plásmido de referencia de VPH se preparó en dos series de dilución independientes y se midió en tres repeticiones de la concentración analizada (es decir, un total de 6 repeticiones por concentración). Además, cada análisis contenía 10 ng de ADN humano. En caso de variación respecto a los datos validados, las concentraciones del plásmido concreto se aumentaron o redujeron y después se volvieron a analizar (6 repeticiones de dos series de dilución independientes). El límite de detección fue la concentración más baja en que las 6 repeticiones fueron positivas.

** Analizado directamente, sin consideración de la preparación del ADN. La cantidad se refiere al ADN de VPH contenido en el plásmido.


 GONZALO CHIRIK
 GERENTE GENERAL
 NIPRO MEDIC AL, S.A.
 SUC. ARG.


 Daniela Croce
 Farmacéutica
 M.P.: 20070

11.1.2 Especificidad analítica - Tipos de VPH

3809



Los plásmidos de referencia para los tipos de VPH enumerados se analizaron con 2.12×10^8 copias de reacción PCR.

VPH 6b, VPH 11, VPH 13, VPH 16, VPH 18, VPH 26, VPH 30, VPH 31, VPH 33, VPH 34, VPH 35, VPH 39, VPH 40, VPH 42, VPH 43, VPH 44, VPH 45, VPH 51, VPH 52, VPH 53, VPH 54, VPH 55, VPH 56, VPH 58, VPH 59, VPH 61, VPH 66, VPH 67, VPH 68, VPH 69, VPH 70, VPH 71, VPH 73, VPH 74, VPH 81, VPH 82, VPH 84, VPH 85, VPH 91.

Se detectaron las siguientes hibridaciones cruzadas:

VPH 55 da una señal en la sonda de VPH 44. Como resultado, el software CheckReport™ muestra un resultado combinado de VPH 44/VPH 55.

Es posible que VPH 13 tenga una reacción cruzada con la sonda de VPH 11, pero no da como resultado una señal de falso positivo, ya que VPH 13 no está presente en las muestras cervicouterinas.

11.1.3 Especificidad analítica - Organismos no VPH

Los siguientes organismos no VPH se han analizado con PapilloCheck® (5-10 ng de ADN genómico). No se detectaron señales positivas.

Acinetobacter baumannii, Acinetobacter calcoaceticus, Acinetobacter lwoffii, Actinobacillus actinomycetemcomitans Serovar c, Actinomyces odontolyticus, Actinomyces viscosus, Bacillus subtilis, Bifidobacterium adolescentis, Bifidobacterium breve, Campylobacter concisus, Campylobacter gracilis, Campylobacter rectus, Candida albicans, Capnocytophaga gingivalis, Capnocytophaga ochracea, Capnocytophaga sputigena, Citrobacter amalonaticus, Citrobacter freundii, Citrobacter freundii, Citrobacter koseri, Citrobacter koseri, Clostridium difficile, Clostridium perfringens, Eikenella corrodens, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Enterobacter sakazakii, Enterococcus durans, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Escherichia coli, Eubacterium nodatum, Fusobacterium nucleatum, Gardnerella vaginalis, Hafnia alvei, Kingella denitrificans, Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumoniae, Lactobacillus casei, Lactobacillus crispatus, Lactobacillus gasseri, Lactobacillus iners, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus vaginalis, Mogibacterium timidum, Morganella morganii, Mycoplasma hominis, Mycoplasma buccale, Mycoplasma faucium, Mycoplasma fermentans, Mycoplasma genitalium, Mycoplasma orale, Mycoplasma pirum, Mycoplasma salivarium, Mycoplasma pneumoniae, Neisseria elongata, Neisseria gonorrhoeae, Peptoniphilus asaccharolyticus, Peptostreptococcus anaerobius, Peptostreptococcus micros, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Prevotella nigrescens, Proteus hauseri, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas putida, Serratia marcescens, Staphylococcus aureus ssp. aureus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus haemolyticus, Staphylococcus saprophyticus, Stenotrophomonas maltophilia, Streptococcus agalactiae, Streptococcus constellatus, Streptococcus criceli, Streptococcus cristatus, Streptococcus gordonii, Streptococcus intermedius, Streptococcus mitis, Streptococcus mutans, Streptococcus oralis, Streptococcus parasanguinis, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus salivarius, Streptococcus sanguinis, Streptococcus sobrinus, Tannerella forsythensis (antes: Bacteroides forsythus), Treponema denticola, Ureaplasma urealyticum, Veillonella parvula


Daniela Croce
Farmacéutica
M.P.:20070


GONZALO GOUK
GERENTE GENERAL
NIPRO MEDICAL S.A.
SUC. ARG.



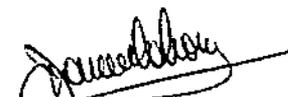
11.2 Repetibilidad

Como evaluación de la repetibilidad del ensayo, se analizaron cinco muestras, cada una con copias de plantillas de referencia de VPH diferentes y ADN genómico humano con PapilloCheck®. Se variaron los números de copias de los diferentes objetivos de VPH presentes en las muestras, así como el ADN humano de fondo (consulte la tabla 9). Cada muestra se analizó con PapilloCheck® en cinco réplicas independientes. Las réplicas las analizó el mismo técnico en un plazo de tres días.

Tabla 9: Composición de las muestras para el análisis de repetibilidad

Id. de muestra	Tipo de VPH	Cantidad de ADN mensajero	Múltiplo del límite de detección
muestra 1	VPH 16	180 copias	3
	VPH 18	1.500 copias	10
	VPH 31	1.400 copias	30
	ADN genómico humano	1 ng	
muestra 2	VPH 16	180 copias	3
	VPH 18	1.500 copias	10
	VPH 31	1.400 copias	30
	ADN genómico humano	5 ng	
muestra 3	VPH 16	1.800 copias	30
	VPH 18	450 copias	3
	VPH 45	300 copias	10
	ADN genómico humano	5 ng	
muestra 4	VPH 16	10.000 copias	-
	VPH 18	5.000 copias	-
	VPH 45	20.000 copias	-
	ADN genómico humano	2,5 ng	-
muestra 5	VPH 18	4.500 copias	30
	VPH 31	500 copias	10
	VPH 45	90 copias	3
	ADN genómico humano	2,5 ng	

Para las cinco muestras y cada análisis repetido, se detectaron los tres tipos de VPH correctos y el análisis fue negativo para el tipo no incluido. Por tanto, 75 de los 75 resultados de análisis individuales (5 muestras x 5 réplicas x 4 plantillas de VPH diferentes usadas) fueron correctos.


 Daniela Croce
 Farmacéutica
 M.P.:20070


 GONZALO GÓIK
 GERENTE GENERAL
 NIPRO MEDICAL CORP.
 SUC. ARG.

11.3 Reproducibilidad

La reproducibilidad del equipo de ensayo PapilloCheck® se determinó usando 22 muestras clínicas (consulte la tabla 10) con concentraciones de VPH próximas al límite de detección. La determinación se realizó mediante el mismo método, con material de muestra idéntico, por diferente personal en diferentes laboratorios con instrumental diferente. Los resultados se clasificaron de acuerdo con las muestras positivas, si se detectaron tipos de VPH idénticos en infecciones únicas o dobles, o bien si se detectaron dos o tres tipos de VPH idénticos en infecciones múltiples con tres o cuatro tipos, respectivamente.

Tabla 10: Resultados de los análisis de reproducibilidad

N.º de muestra	Resultado de laboratorio 1	Resultado de laboratorio 2	Concordancia
1	VPH 33	VPH 33	+
2	VPH 35	VPH 35	+
3	negativo	negativo	+
4	VPH 45	VPH 45	+
5	VPH 51, VPH 52	VPH 51, VPH 52	+
6	VPH 51, VPH 56	VPH 51, VPH 56	+
7	VPH 16, VPH 39, VPH 68	VPH 16, VPH 39, VPH 68 VPH 82	+
8	VPH 39, VPH 68	VPH 39, VPH 68	+
9	VPH 16	VPH 16	+
10	negativo	negativo	+
11	VPH 56, VPH 44/55	VPH 56, VPH 44/55	+
12	negativo	negativo	+
13	VPH 11, VPH 18, VPH 56	VPH 11, VPH 18, VPH 56	+
14	VPH 51, VPH 44/55	VPH 51, VPH 44/55	+
15	VPH 53, VPH 58, VPH 43	VPH 53, VPH 58, VPH 68, VPH 43	+
16	negativo	negativo	+
17	VPH 16	VPH 16	+
18	VPH 16	VPH 16	+
19	VPH 45	VPH 45	+
20	VPH 16	VPH 16	+
21	VPH 53, VPH 58	VPH 53, VPH 58	+
22	VPH 31	VPH 31	+

Se obtuvieron resultados concordantes para todas las muestras clínicas. Las señales de tipos adicionales detectados por el laboratorio 2 para muestras con infecciones múltiples 7 (VPH 82) y 15 (VPH 68) quedaron justo por encima del umbral definido y los resultados discordantes se clasificaron como no problemáticos.

11.4 Solidez

Con el fin de evaluar la solidez del sistema de ensayo PapilloCheck®, se consideraron variaciones de los siguientes parámetros:

- Temperatura de hibridación
- Tiempo de hibridación
- Temperatura de lavado
- Tiempo de lavado

Todos los análisis se realizaron en réplicas de 3 con concentraciones elevadas de plantilla (1 ng de plásmido de referencia de VPH o aproximadamente 200×10^4 copias por muestra). Los intervalos de valores de parámetros determinados en los que es posible una detección robusta de VPH con PapilloCheck® se resumen en la tabla 11.

Tabla 11: Solidez de PapilloCheck®

Parámetro	Intervalo
Temperatura de hibridación	20-25 °C
Tiempo de hibridación	13-17 minutos
Temperatura de lavado	48-52 °C
Tiempo de lavado	Primer paso de lavado 10-15 segundos
	Segundo paso de lavado 60-75 segundos
	Tercer paso de lavado 10-15 segundos


 Daniela Croce
 Farmacéutica
 M.P.:20070


 GONZALO GOUK
 GERENTE GENERAL
 NIPRO MEDICAL CORP.
 SDC ARG.



11.5 Rendimiento clínico de PapilloCheck®

3809



Para determinar el rendimiento clínico del ensayo PapilloCheck® en lo que respecta a especificidad y sensibilidad clínicas, se realizó un estudio comparativo con PapilloCheck® y el ensayo GP5+/6+-PCR-EIA.⁷ Para este estudio, se analizaron muestras de 1.437 mujeres representativas con citologías normales (grupo de control) de más de 40 años de edad (mediana de edad, 49 años; intervalo de edades, entre 40 y 60 años) y de 192 mujeres representativas (mediana de edad, 34 años; intervalo de edades, entre 30 y 60 años) con lesiones CIN3+ confirmadas mediante histología (grupo de caso). Todas las muestras usadas en este estudio se tomaron originariamente durante la ronda de referencia a mujeres en el grupo de intervención del ensayo de implementación controlado aleatorizado basado en población POBASCAM.⁸

Después de restringir el análisis PapilloCheck® a los 14 tipos de VPHAR objetivo de GP5+/6+-PCR-EIA, PapilloCheck® tenía una sensibilidad clínica para \geq CIN3 del 95,8 % (184/192; IC del 95 %: 92,8-98,8) y una especificidad clínica para \geq CIN2 del 96,7 % (IC del 95 %: 95,7-97,7). En comparación, estas cifras fueron 96,4 % (185/192; IC del 95 %: 93,9-98,9) y 97,7 % (IC del 95 %: 96,9-98,5), respectivamente, para GP5+/6+-PCR-EIA (consulte las tablas 5 y 6).

Tabla 5: Comparación de los resultados de PapilloCheck® (14 tipos de VPHAR) y GP5+/6+-PCR-EIA estratificados para controles y casos.

	PapilloCheck® (14 tipos de VPHAR)	GP5+/6+-PCR-EIA	Total	
Controles	-	1.386 (96,5 %)	4 (0,3 %)	1.390 (96,7 %)
	+	18 (1,3 %)	29 (2,0 %)	47 (3,3 %)
	total	1.404 (97,7 %)	36 (2,3 %)	1.437
Casos	-	4 (2,1 %)	4 (2,1 %)	8 (4,2 %)
	+	3 (1,6 %)	181 (94,3 %)	184 (95,8 %)
	total	7 (3,6 %)	185 (96,4 %)	192

Tabla 6: Especificidad y sensibilidad clínicas de PapilloCheck® y GP5+/6+-PCR-EIA (resultados de uno o varios de los 14 tipos de VPHAR VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 o 68).

14 VPHAR	PapilloCheck®	GP5+/6+
Sensibilidad clínica para \geq CIN3	95,8 %	96,4 %
Especificidad clínica para \geq CIN2	96,7 %	97,7 %

Daniela Croce
Daniela Croce
Farmacéutica
M.P.:20070

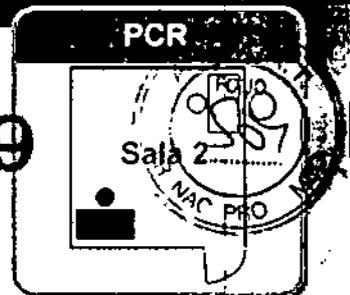
Gonzalo Gouk
GONZALO GOUK
GERENTE GENERAL
NIPRO MEDICAL CORP.
SUC. ARG.

7 Comparison of the clinical performance of PapilloCheck® human papillomavirus detection with that of the GP5+/6+-PCR-enzyme immunoassay in population-based cervical screening. Hesselink AT, Heideman DA, Berkhof J, Topal F, Pol RP, Meijer CJ, Snijders PJ. J Clin Microbiol. 2010 Mar;48(3):797-801. Epub 2009 Dec 30.

8 Bulkman, N. W., L. Rozendaal, P. J. Snijders, F. J. Voorhorst, A. J. Boeke, G. R. Zandwijken, F. J. van Kemenade, R. H. Verheijen, K. Groningen, M. E. Boon, H. J. Keuning, M. van Ballegooijen, A. J. van den Brule, and C. J. Meijer. 2004. POBASCAM, a population-based randomized controlled trial for implementation of high-risk HPV testing in cervical screening: design, methods and baseline data of 44,102 women. Int. J. Cancer 110:94-101.

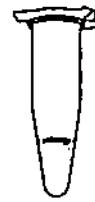
12. PROTOCOLO BREVE DE PAPILOCHECK®

12.1 Sala 2: PCR - Preparación de la mezcla de reacción



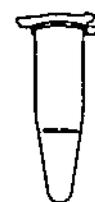
3809

- ➔ Diluya la uracil-N-glucosilasa 1:200 en agua grado PCR
- ➔ Mezcle la dilución de UNG con cuidado



- ➔ Prepare la mezcla de reacción para la cantidad necesaria de reacciones PCR

	1 reacción	13 reacciones (1 microchip)	26 reacciones (2 microchips)	39 reacciones (3 microchips)	52 reacciones (4 microchips)
PapilloCheck® PCR MasterMix	19,8 µl	257,4 µl	514,8 µl	772,2 µl	1029,6 µl
Polimerasa HotStar Taq® (5 U/µl)	0,2 µl	2,6 µl	5,2 µl	7,8 µl	10,4 µl
Uracil-N- glucosilasa (dilución de 1:200, 0,005 U/µl)	1 µl	13µl	26 µl	39 µl	52 µl
Volumen total antes de añadir el ADN de muestra	21 µl	273 µl	546 µl	819 µl	1092 µl



- ➔ Mezcle con cuidado la mezcla de reacción

- ➔ Divida en alcuotas la mezcla de reacción: añada 21 µl de la mezcla de reacción para cada reacción PCR en un microtubo para PCR de 0,2 ml de una banda PCR



Daniela Croce
Daniela Croce
Farmacéutica
M.P.:20070

Gonzalo Gouk
GONZALO GOUK
GERENTE GENERAL
NIPRO MEDICAL CORP.
SUC. ARG.

P
R
O
T
O
C
O
L
O
B
R
E
V
E

12.2 Sala 2: PCR - Adición de ADN mensajero /
reacción PCR

3809

PCR

Sala 2 N.M.A.

FOLIO

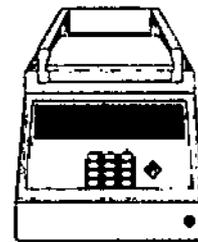
570

- Añada 5 µl de ADN mensajero para cada reacción PCR
- Mézclelo bien



- Inicie la reacción PCR con el programa del termociclador preparado

Tiempo	Temp. °C	N.º de ciclos
20 min	37 °C	1
15 min	95 °C	1
30 s	95 °C	40
25 s	55 °C	
45 s	72 °C	
30 s	95 °C	15
45 s	72 °C	
Espera	10 °C	



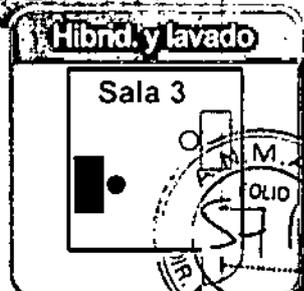
P
R
O
T
O
C
O
L
O
B
R
E
V
E

Daniela Croce
Daniela Croce
Farmacéutica
M.P.:20070

Conzalo Gouk
CONZALO GOUK
GERENTE GENERAL
NIHRO MEDIC'AL CORP.
SUC. ARG.

12.3 Sala 3: Hibridación - Preparación / Reacción de hibridación

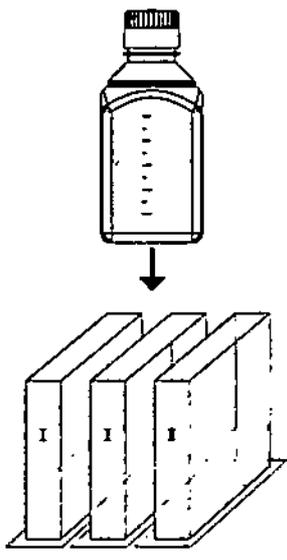
3809



Comience los preparativos al menos 30 minutos antes de la hibridación.

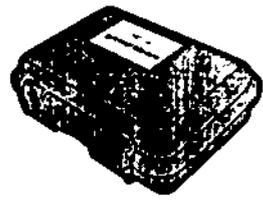
- Disuelva los posibles precipitados en los tampones de lavado e hibridación y mezcle bien
- Prepare la mezcla de solución de lavado para la cantidad de microchips PapilloCheck® que se vayan a analizar

Componentes	Número de microchips PapilloCheck®			
	1	2	3	4
Agua destilada o desionizada	140 ml	280 ml	420 ml	560 ml
Tampón A PapilloCheck®	14 ml	28 ml	42 ml	56 ml
Tampón B PapilloCheck®	1,75 ml	3,5 ml	5,25 ml	7 ml
Volumen total	155,75 ml	311,50 ml	467,25 ml	623 ml



- Divida alcuotas de la mezcla de solución de lavado en tres recipientes de lavado oCheck®
- Precaliente la solución de lavado II en un baño María a 50 °C

- Incube la cantidad de microchips PapilloCheck® que se vayan a analizar en la cámara de hibridación preparada a temperatura ambiente



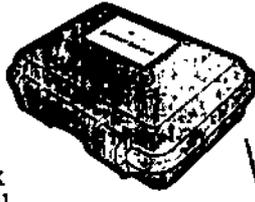
- Mezcle los productos de la PCR y centrifúguelos brevemente
- Mezcle el tampón de hibridación y centrifúguelo brevemente
- Mezcle 30 µl de tampón de hibridación PapilloCheck® con 5 µl de producto de PCR
- Mézclelo bien y centrifúguelo brevemente



- Transfiera 25 µl de la mezcla de hibridación a cada pocillo del microchip PapilloCheck® usando una multipipeta
- Evite la formación de burbujas de aire



- Incube el microchip PapilloCheck® durante exactamente 15 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C)



Daniela Cruce
Daniela Cruce
Farmacéutica
M.P.:20070

Gonzalo Gouk
GONZALO GOUK
GERENTE GENERAL
NIPRO-MEDICAL CORP.

P
R
O
T
O
C
O
L
O
B
R
E
V
E

12.4 Sala 3: Lavado y secado /
Escaneo y evaluación

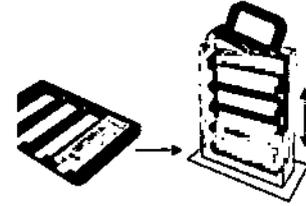
3809

Hibnd. y lavado

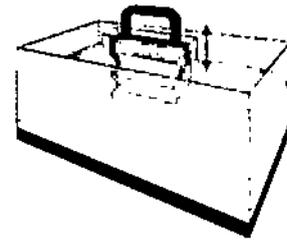
Sala 3

A.N.M.A.
FOLIO
DIR. NAC. RES. MED.

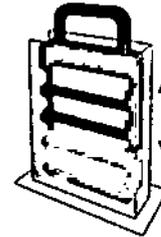
- ➔ Retire el soporte de portaobjetos magnético de la cámara de hibridación
- ➔ Coloque el soporte de portaobjetos en el recipiente de lavado oCheck® con la solución de lavado I
- ➔ Encaje el asa oCheck®
- ➔ Lave el microchip o los microchips PapilloCheck® en la solución de lavado I a temperatura ambiente durante 10 segundos



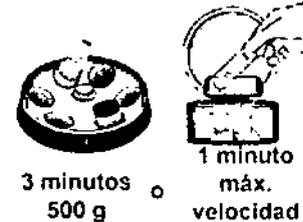
- ➔ Lave el microchip o los microchips PapilloCheck® en la solución de lavado II precalentada en un baño María a 50 °C durante 60 segundos



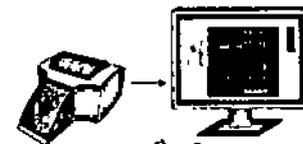
- ➔ Lave el microchip o los microchips PapilloCheck® en la solución de lavado III a temperatura ambiente durante 10 segundos



- ➔ Retire el líquido de la superficie del microchip PapilloCheck® mediante centrifugado



- ➔ Escanee el microchip o los microchips PapilloCheck® con CheckScanner™
- ➔ Realice el escaneo y el análisis según lo descrito en el manual del usuario del software CheckReport™
- ➔ Cree los informes



Daniela Croce
Daniela Croce
Farmacéutica
M.P.:20070

[Signature]
GERENTE GENERAL
INPROMEDICAL CORP.

P
R
O
T
O
C
O
L
O
B
R
E
V
E



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

CERTIFICADO DE AUTORIZACIÓN DE VENTA DE
PRODUCTOS PARA DIAGNOSTICO DE USO IN VITRO

Expediente nº 1-47-11672/13-8

Se autoriza a la firma NIPRO MEDICAL CORPORATION Sucursal Argentina a importar y comercializar el Producto para diagnóstico de uso in vitro denominado

1) PapilloCheck®/ DISEÑADO PARA LA DETECCIÓN CUALITATIVA Y LA GENOTIPIFICACIÓN DE 24 TIPOS DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN PREPARACIONES DE ADN A PARTIR DE CITOLOGÍAS CERVICOUTERINAS HUMANAS; 2) PapilloCheck® Collection Kit/ PARA LA EXTRACCIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS CERVICALES QUE SE ANALIZARÁN CON PapilloCheck®. Envases conteniendo: 1) Envases por 60 determinaciones conteniendo: PapilloCheck® PCR MasterMix (5 x 300 µl), PapilloCheck® Slidebox (5 x 12 matrices), PapilloCheck® BUF A conc. (2 x 40 ml), PapilloCheck® BUF B conc. (1 x 15 ml) y PapilloCheck® Buffer de Hibridación (2 x 1000 µl); 2) Envases conteniendo 10 o 50 kits de recolección (kit de recolección: 1 cepillo cervical y 1 vial con 5 ml de medio de transporte). Vida útil: 1) DIEZ (10) meses, desde la fecha de elaboración conservado entre 4 y 8 °C y 2) DOS (2) años, desde la fecha de elaboración conservado entre 15 y 30 °C. Se le asigna la categoría: venta a Laboratorios de análisis clínicos por hallarse en las condiciones establecidas en la Ley N° 16.463 y Resolución Ministerial N° 145/98. Lugar de elaboración: 1) GREINER BIO-ONE DIAGNOSTICS GMBH. Gewerbepark 2, 4261 Rainbach im Muhlkreis (AUSTRIA) para GREINER BIO-ONE GMBH. Maybachstraße 2, D-72636 Frickenhausen (ALEMANIA) y 2) BLISPAC S.A.S. Rue de la Gare

60250 Balagny/ Thérain. (FRANCIA) PARA GREINER BIO-ONE GMBH.
Maybachstraße 2, D-72636 Frickenhausen (ALEMANIA). En las etiquetas de los
envases, anuncios y prospectos deberá constar PRODUCTO PARA DIAGNOSTICO
USO IN VITRO AUTORIZADO POR LA ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE
MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA MEDICA. Certificado nº

008166

ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGIA
MEDICA

Buenos Aires, 12 MAY 2015



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

