



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

DISPOSICIÓN N°

- 10952

BUENOS AIRES

05 OCT. 2016

VISTO, el expediente n° 1-47-3110-557/16-8 del Registro de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica y,

CONSIDERANDO:

Que por las presentes actuaciones la firma BIOSYSTEMS S.A. solicita la modificación de presentación del producto para Diagnóstico de uso "In Vitro" denominado HPV Direct Flow CHIP Kit (e-BRID) , autorizado por Certificado N° 008081.

Que a fojas 114 consta el informe técnico producido por el Servicio de Productos para Diagnóstico que establece que los productos reúnen las condiciones de aptitud requeridas para su autorización.

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

Que la presente se dicta en virtud de las facultades conferidas por los Decretos N° 1490/92 y por el Decreto N° 101 de fecha 16 de diciembre del 2015.

Por ello;

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

DISPONE:

ARTÍCULO 1º.- Autorízase a la firma BIOSYSTEMS S.A. la modificación de presentación del producto para Diagnóstico de uso "In Vitro" denominado HPV.



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

DISPOSICIÓN N° 1 0 9 5 2

Direct Flow CHIP Kit (e-BRID) que en lo sucesivo se expenderá en envases por 30 DETERMINACIONES, CONTENIENDO: a) *PCR Reagents*: Mix PCR (1800 µl), Hot Start DNA Polymerase (20 µl), Uracil-DNA Glycosylase (40 µl); b) *Hybridization Reagents*: Solución de hibridización (Reactivo A: 80 ml), Solución de bloqueo (Reactivo B: 35 ml), Complejo Estreptavidina-Fosfatasa Alcalina (Reactivo C: 18 ml), Solución de lavado I (Reactivo D: 65 ml), Sustrato NBT (Reactivo E-1: 15 ml), Cromógeno BCIP (Reactivo E-2: 15 ml), Solución de lavado II (Reactivo F: 50 ml), Membranas con array de sondas (HPV CHIP-HS: 30 unidades) y el agregado del nuevo componente **Uracil-DNA Glycosylase (40 µl)**, cuya composición de detalla a fojas 03 .

ARTÍCULO 2º.- Acéptense los nuevos proyectos de Rótulos y Manual de Instrucciones a fojas 16 a 84. Desglosándose fojas 54 a 76 .

ARTICULO 3º.- Practíquese la atestación correspondiente en el Certificado N° 008081, cuando el mismo se presente acompañado de la fotocopia autenticada de la presente Disposición.

ARTÍCULO 4º.- Regístrese; gírese a la Dirección de Gestión de Información Técnica a sus efectos, por el Departamento de Mesa de Entradas notifíquese al interesado y hágasele entrega de la copia autenticada de la presente Disposición junto con los nuevos proyectos de Rótulos y Manual de Instrucciones. Cumplido, archívese.-

Expediente n°: 1-47-3110-557/16-8

DISPOSICIÓN N°:

1 0 9 5 2

Fd


Dr. ROBERTO LEBE  
Subadministrador Nacional  
A.N.M.A.T.

# HPV Direct Flow Chip Kit (e-BRID)

Screening y genotipado del virus del papiloma humano mediante amplificación e hibridación específica

Compatible con e-BRID

REF Ref. MAD-003930MU-E-30

 30 tests

  
Lic. Alejandro Díez  
Aprobado  
BioSystems S.A.

For in vitro diagnostic use  
Directive 98/79/CE and ISO 18113-2

  
Dra. SILVINA ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
MN 14.421  
BIOSYSTEMS S.A.



Tabla de Contenidos

1	USO PREVISTO .....	3
2	PRINCIPIO DEL MÉTODO .....	3
3	COMPONENTES .....	4
	3.1 Reactivos para la PCR múltiple .....	4
	3.2 Reactivos para la hibridación reversa .....	4
4	MATERIAL ADICIONAL REQUERIDO NO SUMINISTRADO.....	5
	4.1 Reactivos y material .....	5
	4.2 Equipos .....	5
5	CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD.....	5
6	ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES .....	5
7	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA .....	6
	7.1 Tomas citológicas .....	6
	7.2 Citologías líquidas.....	7
	7.3 Medio de Transporte de Digene (STM ) .....	7
	7.4 Secciones de tejido parafinadas .....	8
8	PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS .....	9
	8.1 Reacción de amplificación por PCR múltiple .....	9
	8.2 Preparación de los reactivos de hibridación .....	9
	8.3 Hibridación reversa por flow-through.....	10
9	PROCEDIMIENTO DE CONTROL DE CALIDAD .....	11
10	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS .....	12
11	CARACTERÍSTICAS DEL FUNCIONAMIENTO .....	14
	11.1 Analítico.....	14
	11.2 Clínico .....	17
12	LIMITACIONES .....	17
13	PROBLEMAS Y SOLUCIONES.....	18
14	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	19
15	SÍMBOLOS DE LA ETIQUETA .....	19

Lic. Alejandro Díez  
Acreditado  
Biosystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
MN 14.421  
BIOSYSTEMS S.A.



## 1 USO PREVISTO

HPV Direct Flow CHIP es un kit de diagnóstico *in vitro* del virus del papiloma humano (HPV). La infección con HPV es un factor esencial en carcinogénesis cervical y anogenital (zur Hausen et al, 1974; Walboomer et al, 1999; zur Hausen, 1996; zur Hausen 2002).

En base a su asociación con distintos grados de lesiones, el HPV se clasifica (Muñoz 2003) en genotipos de alto riesgo u oncogénicos, que pueden inducir carcinogénesis; y HPVs de bajo riesgo, que causan verrugas genitales y colaboran con los HPVs de alto riesgo.

El sistema **HPV Direct Flow CHIP** permite la detección cualitativa del virus HPV y el genotipado de 36 tipos de HPV (Alto riesgo- HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82, y bajo riesgo- HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 81, 84, y 89 (=CP6108)) mediante reacción de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), seguida de hibridación en fase reversa, basada en la tecnología DNA-Flow con el equipo automático e-BRID. Además, en este protocolo, las muestras clínicas pueden amplificarse directamente, sin necesidad de una extracción previa de ADN.

Estado Microbiológico: Producto no estéril.

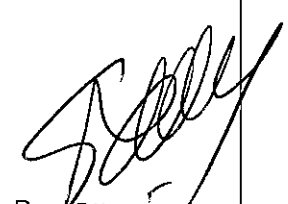
## 2 PRINCIPIO DEL MÉTODO

La metodología de **HPV Direct Flow CHIP** kit se basa en la amplificación de un fragmento de la región vírica L1 del papilomavirus mediante PCR, seguido de una hibridación sobre una membrana de nylon que contiene las sondas de ADN específicas mediante la tecnología DNA-Flow. La plataforma de hibridación automática e-BRID, basada en la tecnología DNA-Flow, permite una unión muy rápida entre el producto de PCR y su sonda específica en un ambiente tridimensional poroso, en contraste con la hibridación en superficie convencional. Una vez producida la unión entre los amplicones específicos y sus sondas correspondientes, la señal se visualiza mediante una reacción inmunoenzimática colorimétrica con Estreptavidina-Fosfatasa y un cromógeno (NBT-BCIP), que genera precipitados insolubles en la membrana en aquellas posiciones en las que se ha producido la hibridación. Esta señal es capturada y analizada de forma automática mediante el software *hybriSoft*.

**HPV Direct Flow CHIP** no requiere la extracción previa de ADN de las muestras, sino que directamente se puede proceder a la amplificación por PCR a partir de suspensiones celulares, células fijadas o secciones de tejido parafinado, con la consecuente reducción de tiempo en manipulación de muestras y obtención de resultados.



Lic. Alejandro Díez  
Responsable  
Biosystems S.A.



Dra. SILVINA ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
MN 14.421  
BIOSYSTEMS S.A.



### 3 COMPONENTES

El kit proporciona todos los reactivos necesarios para procesar 30 muestras mediante amplificación por PCR múltiple y posterior hibridación.

#### 3.1 Reactivos para la PCR múltiple

- 30 tests (MAD-003930MU-P-E-30):

Descripción	Formato	Referencia
HPV PCR mix	1 vial x 1800 µl	MAD-003930MU-MIX-E-30
Hot Start DNA Polymerase	1 vial x 20 µl	MAD-POL-2
Uracil-DNA Glycosylase	1 vial x 40 µl	MAD-UNG-1

Tabla 1: Reactivos de PCR suministrados en el kit.

La mezcla de PCR de HPV contiene el tampón de PCR, dNTPs (U/T), agua libre de DNAsas/RNAsas y cebadores biotinilados. Los cebadores incluidos son específicos para la amplificación de un fragmento de la región L1 de HPV y pueden detectar al menos 36 genotipos de HPV. Además, se incluyen cebadores para la amplificación de un fragmento de ADN genómico humano (gen de beta-globina) usado como control interno de la reacción de PCR.

#### 3.2 Reactivos para la hibridación reversa

- 30 tests (MAD-003930M-H-E-30):

Nombre	Formato	Referencia
Hybridization Solution (Reagent A)	90 ml	MAD-003930MA-E-30
Blocking Solution (Reagent B)	35 ml	MAD-003930MB-E-30
Streptavidin-Alkaline Phosphatase (Reagent C)	18 ml	MAD-003930MC-E-30
Washing Buffer I (Reagent D)	65 ml	MAD-003930MD-E-30
Substrate (Reagent E1)	15 ml	MAD-003930ME1-E-30
Chromogen (Reagent E2)	15 ml	MAD-003930ME2-E-30
Reagent E	--	MAD-003930ME
Washing Buffer II (Reagent F)	50 ml	MAD-003930MF-E-30
HPV Chip (e-BRID)	1x 30 unidades	MAD-003930M-CH-E-30

Tabla 2: Reactivos de hibridación suministrados en el kit.

**IMPORTANTE:** Todos los reactivos se suministran en formato listo para uso, excepto los reactivos E-1 y E-2 que deben mezclarse en proporción 1:1 justo antes de su uso, en el vial vacío proporcionado para tal fin y etiquetado como "Reactivo E".

Lic. Alejandro Díez  
Apoderado  
BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
MN 14.421  
BIOSYSTEMS S.A.



## 4 MATERIAL ADICIONAL REQUERIDO NO SUMINISTRADO

### 4.1 Reactivos y material

- Guantes desechables
- Tubos eppendorf de 0.2/0.5/1.5 ml libres de DNasa/RNasa
- Puntas de pipeta con filtro
- Solución salina (tampón PBS) 1X (libre de DNasas/RNasas)
- Agua destilada
- Paraffin Tissue Processing Kit, Ref: MAD-003952M (30 tests)

**10952**

### 4.2 Equipos

- Microcentrífuga
- Micropipetas automáticas: P1000, P200, P20 y P2
- Termociclador
- Baño termostatzado o bloque térmico
- Bloque hielo o placa de frío (4º C)
- Equipo automatizado para hibridación e-BRID
- HybriSoft Software

## 5 CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Reactivos de PCR. Envío a 2-8 °C\*. Una vez recibido se debe conservar almacenado a -20 °C, siendo estable hasta la fecha de caducidad especificada. Descongelar en hielo justo antes de usar. Los reactivos de PCR deben ser conservados en zonas libres de contaminación por ADN o productos de PCR. Evitar ciclos múltiples de congelación y descongelación.

Reactivos de hibridación. Envío y conservación a 2-8 °C\*. No congelar. Tanto los reactivos como los HPV CHIPs son estables hasta la fecha de caducidad especificada. La solución de revelado se debe preparar justo antes de usar. El reactivo de hibridación (Reagent A) debe estar a 41°C antes de ser usado y el resto de reactivos deben usarse a temperatura ambiente.

\* Se incluye un indicador de temperatura con el embalaje. En caso de que la cadena de frío se rompa se recomienda contactar con el fabricante antes de utilizar los reactivos.

## 6 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Lea las instrucciones de uso antes de utilizar este producto.
- Recomendaciones de seguridad:

Las precauciones de seguridad se describen en la ficha de seguridad. Este producto está destinado únicamente para uso profesional en un laboratorio, y no como fármaco, para uso doméstico ni otros fines. La versión actual de la ficha de seguridad de este producto se puede descargar del sitio web [www.vitro.bio](http://www.vitro.bio) o puede solicitarse a [regulatory.md@vitro.bio](mailto:regulatory.md@vitro.bio).

- Consideraciones generales para evitar la contaminación con producto de PCR:

La mayor fuente de contaminación suele ser el propio producto de PCR amplificado, por lo cual es recomendable llevar a cabo la manipulación de los productos amplificados en una zona libre de AEBEA

Lic. Alejandro Díez  
Apodado  
Biosystems S.A.

Dona ZOLA ALBA AEBEA  
DIRECTORA TÉCNICA  
MN 10421  
BIOSYSTEMS S.A.



donde se realiza la reacción de PCR. Es recomendable trabajar en áreas diferenciadas de pre-PCR y post-PCR en donde se realice la manipulación del ADN problema y preparación de tubos de PCR (pre-PCR) y la manipulación e hibridación de los productos amplificados (post-PCR). Estas áreas deben estar separadas físicamente y debe emplearse material distinto de laboratorio (batas, pipetas, puntas, etc) para evitar la contaminación de las muestras con el ADN amplificado, lo que podría conducir a falsos diagnósticos positivos. El flujo de trabajo debe ir siempre en una única dirección, desde la zona de pre-PCR hasta la zona de post-PCR y nunca en dirección opuesta. Se debe evitar el flujo de material y personal desde la zona post-PCR a la zona pre-PCR.

De forma adicional, para evitar contaminaciones con productos de PCR, el kit incluye la enzima Uracil-DNA Glycosylase que degrada productos de PCR que contengan dUTP.

**Se recomienda incluir controles negativos en la amplificación que contengan todos los reactivos de PCR a excepción de la muestra de ADN.**

## 7 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

HPV Direct Flow CHIP está optimizado para el uso directo de muestras clínicas, sin previa extracción de ADN.

El sistema también se ha validado con ADN purificado a partir de muestras clínicas usando los siguientes métodos de extracción:

- Maxwell® 16 FFPE Tissue LEV DNA Purification Kit (Promega): para la purificación de ADN de muestras en fresco o incluidas en parafina.
- MagNa Pure (Roche): para la purificación de ADN de muestras en fresco.


Nota: El sistema no se ha validado con otros métodos de extracción de ADN, por lo tanto, el uso de cualquier otro método debe de ser previamente verificado.

**Preparación de muestras para PCR directa:**


### 7.1 Tomas citológicas

Tomas en torunda o cepillo (se recomienda que no contengan medio de transporte).

- Colocar la torunda o cepillo en **400 µl de tampón PBS 1X**. Agitar la torunda dentro del tubo para que las células pasen al líquido.
- Centrifugar **1 min a 2000 rpm**, retirar el sobrenadante con cuidado.
- Resuspender el botón celular resultante en **25-50 µl de tampón PBS 1X** (dependiendo del tamaño del botón celular obtenido) para obtener una suspensión homogénea de células.
- Mezclar la muestra mediante pipeteo y tomar **6 µl** de la suspensión homogénea como templado de ADN para la reacción de PCR. El volumen restante de muestra se puede almacenar a **4 ° C** o congelado a **-20 ° C**, siendo estable a **4 ° C** durante una semana y a **-20 ° C** durante 2 meses.



Lic. Alejandro Díez  
Abogado  
BioSystems S.A.



Dra. SILVIA ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
M.N. 14.421  
BIOSYSTEMS S.A.





1 0952

## 7.2 Citologías líquidas

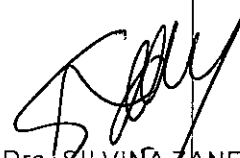
- Decantar las células (dejar que se depositen por gravedad en el fondo del tubo), recuperar **150-200 µl** de suspensión celular (del fondo del tubo) en un tubo de 1.5-2 ml.
- Centrifugar **1 min 2000 rpm** y descartar sobrenadante con cuidado.
- Lavar el botón celular con **400 µl de tampón PBS 1X**. Centrifugar **1 min 2000 rpm** y descartar sobrenadante con cuidado.
- Resuspender el botón resultante en **25-50 µl de tampón PBS 1X** (dependiendo del tamaño del botón celular obtenido) para obtener una suspensión homogénea de células.
- Mezclar la muestra mediante pipeteo y tomar **6 µl** de la suspensión homogénea como templado de **ADN** para la reacción de PCR. El volumen restante de muestra se puede almacenar a **4 ° C** o congelado a **-20° C**, siendo estable a **4 ° C** durante una semana y a **-20 ° C** durante 2 meses.

*El Sistema se ha validado para PCR directa (sin extracción previa de ADN) con los siguientes medios de transporte:*

- *Thinprep (Hologic)*
- *Surepath (Becton Dickinson)*
- *Novaprep (Novacyt)*
- *CellPrep (Biodyne)*

## 7.3 Medio de Transporte de Digene (STM )

- Colocar **500-1000 µl** de la suspensión celular en un tubo de 1.5- 2 ml.
- Centrifugar **1 min 2000 rpm** y descartar sobrenadante con cuidado.
- Lavar el botón celular con **400 µl de tampón PBS 1X**. Centrifugar **1 min 2000 rpm** y descartar sobrenadante con cuidado.
- Resuspender el botón resultante en **25-50 µl de tampón PBS 1X** (dependiendo del tamaño del botón celular obtenido) para obtener una suspensión homogénea de células.
- Mezclar la muestra mediante pipeteo y tomar **6 µl** de la suspensión homogénea como templado de **ADN** para la reacción de PCR. El volumen restante de muestra se puede almacenar a **4 ° C** o congelado a **-20° C**, siendo estable a **4 ° C** durante una semana y a **-20 ° C** durante 2 meses.

  
Lic. Alejandro Díez  
Apoderado  
Biosystems S.A.  
Dra. SILVANA ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
MN 14/421  
BIOSYSTEMS S.A.


#### 7.4 Secciones de tejido parafinadas

Aunque el sistema funciona correctamente con PCR directa de muestras de tejido en parafina, con objeto de evitar posibles contaminaciones ligadas a la inclusión y manipulación de los bloques de parafina, es recomendable trabajar con ADN purificado.

- Para la extracción de ADN a partir de secciones incluidas en parafina se recomienda seguir métodos estándar de purificación para tejidos parafinados (ver apartado 7). Tomar **6 µl** de ADN purificado para la PCR
- Para preparar las muestras de tejido fijadas en formalina tamponada e incluidas en parafina para su uso en PCR directa, se recomienda utilizar los reactivos incluidos en PARAFFIN TISSUE PROCESSING KIT (Ref: MAD-003952M) y trabajar con el siguiente protocolo:
  - Tomar con unas pinzas **1-3 secciones de tejido** incluido en parafina (dependiendo del tamaño de la biopsia) de 10 µm de grosor y colocarlas en un tubo Eppendorf de 0.5 ml. *Nota: es conveniente retirar el máximo posible de parafina de los bordes de las secciones de tejido.*
  - Añadir **400 µl** de **aceite mineral**.
  - Calentar a **95°C** durante **2 min**
  - Centrifugar a **2000 rpm** durante **1 min** y eliminar los restos de aceite mineral.
  - Añadir **60 µl** de **Tampón de extracción** y **1.5 µl** de **DNARElease** al tubo.
  - Incubar durante **30 min** a **60 °C** seguido de **10 min** a **98 °C** (se puede usar para calentar un bloque térmico o un termociclador).
  - Centrifugar a **2000 rpm** durante **1 min**.
  - Usar **6 µl** del sobrenadante (evitando coger restos de tejido del fondo del tubo) como templado de **ADN** para la reacción de PCR. El volumen restante de muestra se puede almacenar a 4 °C o congelado a -20 °C, siendo estable a 4 °C al menos durante una semana y a -20 °C durante 2 meses.

#### Notas:

- *Para secciones de tejido mayores de 1 cm<sup>2</sup> se recomienda incrementar el volumen de Tampón de extracción y DNARElease proporcionalmente, hasta asegurarse de que el tejido queda completamente sumergido.*
- *Si después de la incubación se observa que el tejido no ha sido completamente digerido se recomienda añadir de nuevo el volumen proporcional de Tampón de extracción y DNARElease y repetir la incubación durante otros 30 min a 60 °C y 10 min a 98 °C.*
- *El protocolo de PCR directa no ha sido ensayado para otro tipo de muestras clínicas de partida (extensiones citológicas o secciones de tejido teñidas) sobre las que también es posible realizar el test de HPV, por lo que se recomienda seguir un procedimiento de purificación de ADN sobre dichas muestras.*

  
Lic. Alejandro Díez  
Aprobado  
BioSystems S.A.  
Dra. SILVINA ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
MN 14.421  
BIOSYSTEMS S.A.

## 8 PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

### 8.1 Reacción de amplificación por PCR múltiple

Se recomienda hacer alícuotas de la mezcla de PCR la primera vez que se use para evitar así repetidos ciclos de congelación y descongelación:

- Descongelar el tubo HPV PCR mix en hielo.
- Añadir al tubo de PCR mix el volumen completo de Hot Start DNA Polymerase y Uracil-DNA Glycosylase, mezclar bien la mezcla invirtiéndola varias veces y centrifugar brevemente.
- Realizar alícuotas de **54 µl** en 30 tubos de PCR y conservar a **-20°C** (estable durante 6 meses)..

Descongelar un tubo de PCR y añadir **6 µl** de la muestra problema, preparada según protocolo detallado en el apartado 7.

Si la mezcla de PCR se prepara justo antes de usarla, hacerlo siguiendo las siguientes instrucciones:

Componente	Volumen por reacción
HPV PCR Mix	52.2 µl
Hot Start DNA Polymerase	0.6 µl
Uracil-DNA Glycosylase	1.2 µl
Muestra problema	6 µl

Tabla 3: Reactivos y volúmenes necesarios para la preparación de una reacción de PCR.

*Nota: Para evitar la degradación de las enzimas contenidas en la mezcla de PCR se recomienda realizar el protocolo entero en hielo.*

Colocar los tubos de PCR en el termociclador y programar las condiciones de amplificación que figuran a continuación:

1 ciclo	25°C	10 min
1 ciclo	94°C	3 min
15 ciclos	94°C	30 s
	42°C	30 s
	72°C	30 s
35 ciclos	94°C	30 s
	60°C	30 s
	72°C	30 s
1 ciclo	72°C	5 min
	8°C	∞

Tabla 4: Programa de PCR

Mantener los tubos refrigerados a 8-10 °C cuando finalice la reacción. Si no se van a procesar las muestras en el momento, se pueden almacenar en la zona de post-PCR a 8-10°C durante 1-2 días. Para almacenarlos durante un periodo mayor de tiempo se recomienda hacerlo a -20°C.

### 8.2 Preparación de los reactivos de hibridación

Todos los reactivos son suministrados en formato "listo para uso".

La solución de revelado de la hibridación se suministra como dos reactivos (Reactivos E1 y E2) que deben mezclarse en proporción 1:1 justo antes de su uso en el vial "Reactivo E", con un volumen en función del nº de muestras a procesar (ver tabla 5). **Tras cada uso es necesario limpiar el vial con agua destilada para evitar el acúmulo de precipitados por usos sucesivos.**

Las membranas son de un solo uso y se deben manejar con guantes.

Lic. Alejandro Díez  
Alejandro  
Biosystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
MN 14.427  
BIOSYSTEMS S.A.



### 8.3 Hibridación reversa por flow-through

Todo el proceso de hibridación se realiza de forma automática en e-BRID. La gestión de la muestra, la captura de las imágenes y el análisis e informe de los resultados se realizan a través del software **hybriSoft**.

Nota: Configurar el instrumento siguiendo las instrucciones del manual de usuario (proporcionadas con el instrumento).

Antes de comenzar el proceso de hibridación:

1. Desnaturalizar los productos de PCR calentando a **95 °C durante 10 min** en un termociclador y **enfriar rápidamente en hielo** durante al menos **2 min**.
2. Abrir los tubos de PCR y ponerlos en la posición correcta en la plataforma e-BRID.
3. Seleccionar el programa de hibridación y el número de muestras a procesar.
4. Identificar las muestras en el programa.
5. Verificar los volúmenes de cada reactivo. Situar cada reactivo en la posición correspondiente.
6. Precalear el **Reactivo A** (Reagent A) a 41 °C.
7. Situar cada **HPV Chip** en la posición indicada en la plataforma e-BRID.
8. Preparar el **Reactivo E** (Reagent E) en el momento de usar, mezclando en proporción 1:1 los componentes 1 y 2 suministrados en el kit. En la siguiente tabla se indican los volúmenes requeridos de reactivo E1 y E2 en función del número de tests:

	vol (µl)/3 test	vol (µl)/6 test	vol (µl)/9 test	vol (µl)/12 test	vol (µl)/15 test
E1	1500	2400	3200	4000	5000
E2	1500	2400	3200	4000	5000

Tabla 5: Volúmenes de reactivos E1-E2 que se deben mezclar en el vial E en función del nº de test a procesar.

Protocolo de hibridación automático:

- a) Establecer la temperatura del equipo a 41 °C. Añadir **500 µl de Reactivo A (Solución de Hibridación)** precalentada a 41 °C a cada Chip e incubar durante **3 min a 41 °C**.
- b) Eliminar el **reactivo A (Solución de Hibridación)** activando la bomba de vacío.
- c) Mezclar **40 µl** cada muestra de PCR (previamente desnaturalizada y mantenida en hielo) con **500 µl de Reactivo A (Solución de Hibridación)** (41 °C) y dispensar la mezcla sobre el **HPV Chip** correspondiente.
- d) Incubar a **41 °C durante 5 min**.
- e) Activar la bomba para eliminar el reactivo.
- f) Lavar **3 veces con 500 µl con Reactivo A (Solución de Hibridación)** (41 °C).
- g) Fijar la temperatura en **30 °C**.
- h) Realizar 2 incubaciones con **500 µl de Reactivo B (Solución de Bloqueo)** cada una e incubar durante **2 min a 30 °C**.
- i) Activar la bomba para eliminar el reactivo B.
- j) Cuando la temperatura haya alcanzado **30 °C**, añadir **500 µl de Reactivo C (Streptavidin-Alkaline Phosphatase)** a cada Chip
- k) Incubar durante **3 min a 30 °C**.
- l) Activar la bomba para eliminar el reactivo.
- m) Fijar la temperatura en **36 °C**.
- n) Lavar las membranas **4 veces con 500 µl con reactivo D (Washing buffer I)**.

Lic. Alejandro Diez  
Acreditado  
Biosystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
MN 14.421  
BIOSYSTEMS S.A.



- o) Cuando la temperatura alcance los **36 °C**, añadir **500 µl** de **reactivo E (Solución de revelado)** a cada Chip. Incubar durante **4 min** a **36 °C**.
- p) Activar la bomba para eliminar el reactivo.
- q) Lavar las membranas con **3 veces** con **500 µl** de **reactivo F (Washing buffer II)**.
- r) Activar la bomba para eliminar el reactivo.
- s) Realizar la captura de imágenes, análisis e informe de resultados siguiendo instrucciones del manual de usuario de hybriSoft.

**1 0952**

## 9 PROCEDIMIENTO DE CONTROL DE CALIDAD

HPV Flow Chip kit contiene varios controles necesarios para evaluar la calidad de los resultados.

Sonda	Control
B	Control de hibridación
C	Control de amplificación endógeno

Tabla 6: Sondas control incluidas en HPV Flow Chip.

**Control de hibridación:** Tras el revelado de las membranas debe aparecer una señal intensa en las cinco posiciones de control de hibridación (B) que sirve como control de calidad. Esta señal indica que los reactivos de hibridación y revelado han funcionado correctamente. Si no aparece señal indicará que se ha producido un error durante el proceso de hibridación o que algún reactivo no se ha usado correctamente. Además, esta señal permite que el software pueda orientar correctamente el panel de sondas para su posterior análisis.

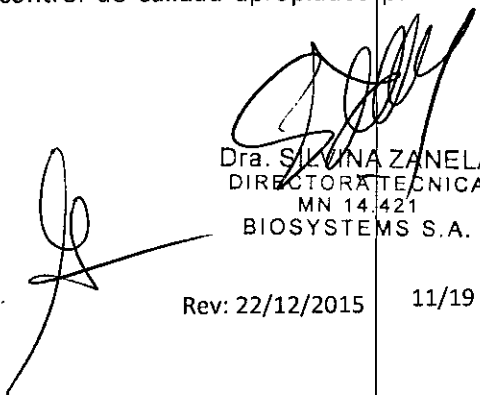
**Control de amplificación endógeno (C):** Sonda para la detección del gen de la beta-globina humana contenido en la muestra problema, que es co-amplificado durante la PCR. Todas las muestras donde el ADN problema se haya amplificado correctamente tendrán una señal positiva en el Control de amplificación endógeno (C). Esta señal es indicativa de la calidad/cantidad del ADN empleado en la amplificación. Una señal positiva indica que la amplificación ha funcionado correctamente y que la calidad y cantidad del ADN de partida han sido óptimas. La ausencia de señal para este control nos indica fallos durante la amplificación, baja calidad/ cantidad del ADN utilizado en la amplificación o ausencia de ADN humano en la muestra. Este último caso es posible cuando la cantidad de células humanas presentes en la muestra problema esté por debajo del límite de detección. Si además no se detectan señales positivas para ningún genotipo de HPV el software hybriSoft incluirá el siguiente mensaje en el informe: "Ausencia de ADN humano/Presencia de inhibidores de PCR".

Cuando la muestra es positiva para cualquiera de los HPVs incluidos en el kit, pero no hay señal para el control de amplificación endógeno, el software hybriSoft incluirá el siguiente mensaje en el informe: "Ausencia de ADN humano". El usuario debe de verificar el proceso y la calidad de las muestras antes de validar los resultados.

El usuario es responsable de determinar los procedimientos de control de calidad apropiados para su laboratorio y cumplir con la reglamentación aplicable.



Lic. Alejandro Díez  
Aprobado  
BioSystems S.A.



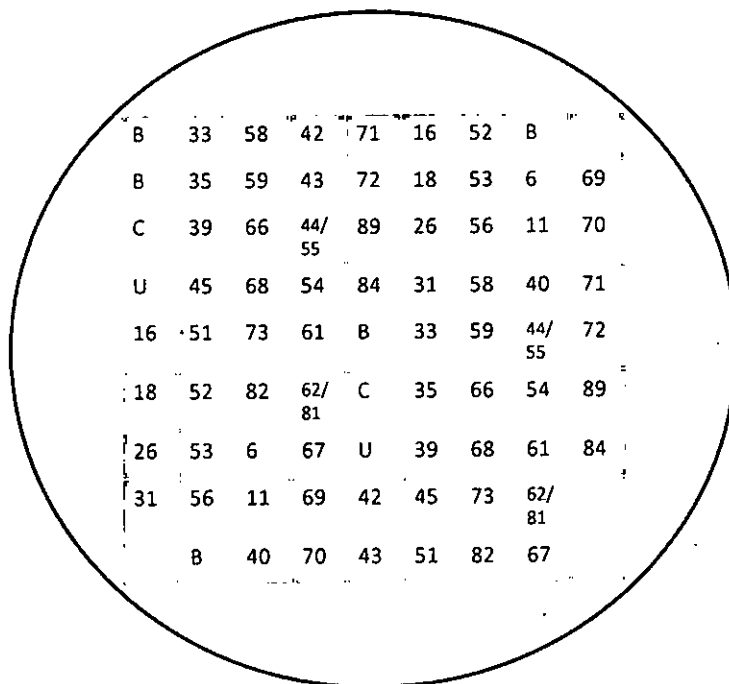
Dra. SILVANA ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
MN 14.421  
BIOSYSTEMS S.A.



**10 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

En el siguiente esquema se muestra la disposición de las sondas en el Chip de HPV:

10952



- "B": Control de hibridación
- "C": Control de amplificación endógeno (gen de  $\beta$ -globina humano)
- "U": Sonda Universal HPV
- "X": Sondas específicas para cada genotipo de HPV

Todas las sondas están duplicadas para garantizar la fiabilidad en el análisis automático de los resultados. El control de hibridación (B) está repetido en 5 posiciones y permite que el software pueda orientar correctamente el panel de sondas para su posterior análisis.

Las siguientes tablas indican las posiciones de las sondas en el Chip y la interpretación de los resultados.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	B	33	58	42	71	16	52	B	
B	B	35	59	43	72	18	53	6	69
C	C	39	66	44/55	89	26	56	11	70
D	U	45	68	54	84	31	58	40	71
E	16	51	73	61	B	33	59	44/55	72
F	18	52	82	62/81	C	35	66	54	89
G	26	53	6	67	U	39	68	61	84
H	31	56	11	69	42	45	73	62/81	
I		B	40	70	43	51	82	67	

Table 7a: Posición de las sondas incluidas en HPV Direct Flow Chip

Lic. Alejandro Díez  
Biosystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
MN 14.421  
BIOSYSTEMS S.A.



Resultados esperados	Sonda/posiciones (columna-fila) 1 0 9 5 2			
	Sonda genotipo HPV	B	C	U
HPV 16	1E-6A	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 18	1F-6B	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 26	1G-6C	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 31	1H-6D	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 33	2A-6E	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 35	2B-6F	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV39	2C-6G	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 45	2D-6H	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 51	2E-6I	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 52	2F-7A	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 53	2G-7B	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 56	2H-7C	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 58	3A-7D	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 59	3B-7E	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 66	3C-7F	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 68	3D-7G	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 73	3E-7H	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 82	3F-7I	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 6	3G-8B	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 11	3H-8C	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 40	3I-8D	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 42	4A-5H	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 43	4B-5I	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 44/55	4C-8E	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 54	4D-8F	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 61	4E-8G	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 62/81	4F-8H	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 67	4G-8I	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 69	4H-9B	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 70	4I-9C	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 71	5A-9D	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 72	5B-9E	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 89	5C-9F	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV 84	5D-9G	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	-- / 1D-5G
HPV POSITIVO GENOTIPO NO DETERMINADO	--	1A-1B-2I-5E-8A	1C-5F	1D-5G
RESULTADO NEGATIVO	--	1A-1B-2K-6F-10A	1C-5F	--
RESULTADO NO VÁLIDO/AUSENCIA DE ADN HUMANO/PRESENCIA DE INHIBIDORES DE PCR	--	1A-1B-2K-6F-10A	--	--
ERROR EN LA HIBRIDACIÓN	--	--	--	--

Tabla 7b: Posición de las sondas incluidas en HPV Direct Flow Chip e interpretación de resultados.

\*La sensibilidad de la sonda universal para HPV (U) es diferente para cada genotipo de HPV, por lo que en algunos casos se observa una señal débil o negativa en esta sonda cuando la muestra es positiva para alguno de los genotipos de HPV. Este resultado no invalida el análisis; la sonda "U" está diseñada para cubrir un amplio espectro de genotipos HPV de la mucosa, además de los específicos contenidos en este kit.

Lic. Alejandro Díez  
Aprobado  
BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
N.º 14.421  
BIOSYSTEMS S.A.



## 11 CARACTERÍSTICAS DEL FUNCIONAMIENTO

### 11.1 Analítico

#### 11.1.1 Repetitividad

La repetitividad del método se realizó analizando al menos cuatro veces cada uno de los genotipos incluidos en el panel. El test fue realizado por el mismo operador, en la misma localización, el mismo día, y usando el mismo lote de reactivos.

Genotipo HPV	Equivalentes de genoma (GE)/reacción	Positivos/total	% positivos
HPV 16	5	4/4	100%
HPV 18	5	4/4	100%
HPV 26	50	2/4	50%
	500	4/4	100%
HPV 31	50	4/4	100%
HPV 33	50	3/4	75%
	500	4/4	100%
HPV 35	500	4/4	100%
HPV 39	50	4/4	100%
HPV 45	500	4/4	100%
HPV 51	50	4/4	100%
HPV 52	50	4/4	100%
HPV 53	50	0/4	0%
	500	4/4	100%
HPV 56	500	4/4	100%
HPV 58	50	4/4	100%
HPV 59	500	4/4	100%
HPV 66	50	4/4	100%
HPV 68	500	4/4	100%
HPV 73	50	4/4	100%
HPV 82	50	4/4	100%
	500	4/4	100%
HPV 6	50	4/4	100%
HPV 11	50	4/4	100%
HPV 40	50	4/4	100%
HPV 42	50	4/4	100%
HPV 43	50	4/4	100%
HPV 55	50	4/4	100%
HPV 54	50	4/4	100%
HPV 61	50	2/4	50%
	500	4/4	100%
HPV 62	50	4/4	100%
HPV 67	50	4/4	100%
	500	4/4	100%
HPV 69	NT		
HPV 70	50	4/4	100%
HPV 81	50	4/4	100%
HPV 71	50	4/4	100%
HPV 72	50	4/4	100%
HPV 89	50	0/4	0%
	500	4/4	100%
HPV 84	50	4/4	100%

Tabla 8: Ensayo de repetitividad para cada genotipo incluido en el panel. NT: no testado.

Lic. Alejandro Díez  
Asociación  
BioSystems S.A.

Dra. SILVIA CANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
MN 14.421  
BIOSYSTEMS S.A.





### 11.1.2 Reproducibilidad

La reproducibilidad del método se analizó mediante el procesamiento de 10 muestras positivas procedentes tanto de infecciones simples como múltiples, a dos concentraciones de GE distintas, además de 20 muestras negativas para HPV, conteniendo cada una de ellas 10 ng de ADN genómico humano. Estas muestras se procesaron en dos laboratorios distintos, usando diferentes lotes de reactivos, y diferentes equipos y operadores. Cada una de las muestras se ensayó tres veces en días diferentes. No se obtuvo ningún falso positivo (el 100% de las muestras negativas para HPV dieron el resultado esperado). El porcentaje de resultados positivos se indica en la Tabla 9. Solo en la muestra que contiene 5 GE de HPV 18/reacción se obtuvo menos de un 100% de positividad. Concordancia del ensayo (detección de genotipo vs negativos):  $Kappa=0.96$ .

Muestra	GE/reacción	Laboratorio 1		Laboratorio 2	
		Positivos/Válidos	% positivos	Positivos/Válidos	% positivos
HPV 16	50	3/3	100%	3/3	100%
	5	3/3	100%	3/3	100%
HPV 18	50	3/3	100%	3/3	100%
	5	2/3	66%	1/3	33%
HPV 31	500	3/3	100%	3/3	100%
	50	3/3	100%	3/3	100%
HPV 35	500	3/3	100%	3/3	100%
	50	3/3	100%	3/3	100%
HPV 6	500	3/3	100%	3/3	100%
	50	3/3	100%	3/3	100%
HPV 11	500	3/3	100%	3/3	100%
	50	3/3	100%	3/3	100%
HPV 16 + HPV 18	500	3/3	100%	3/3	100%
	50	3/3	100%	3/3	100%
HPV 31 + HPV 6	500	3/3	100%	3/3	100%
	50	3/3	100%	3/3	100%
HPV 16 + HPV 45 + HPV 6	500	3/3	100%	3/3	100%
	50	3/3	100%	3/3	100%
HPV 18 + HPV 31 + HPV 42	500	3/3	100%	3/3	100%
	50	3/3	100%	3/3	100%

Tabla 9: Reproducibilidad inter-laboratorio para el kit HPV Direct Flow Chip

### 11.1.3 Especificidad analítica

Se analizó la especificidad de cada genotipo de HPV incluido en el panel usando  $5 \times 10^6$  GE/reacción como material de partida para cada reacción de PCR. No se observaron reacciones cruzadas entre los genotipos de HPV del panel, a excepción de los genotipos 44 y 55 y de los genotipos 62 y 81. Por esta razón, las sondas 62 y 81 y las sondas 44 y 55 están localizadas en la misma posición en el Chip, y el software de análisis, no es capaz de discriminar entre los genotipos 44-55 y 62-81.

No se observaron reacciones cruzadas con otras bacterias y virus analizados: *Herpesvirus simple 1 y 2*, *Neisseria gonorrhoeae*, y *Chlamydia trachomatis*.

Lic. Alejandro Diez  
Moderador  
BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
MN 14.421  
BIOSYSTEMS S.A.



**11.1.4 Sensibilidad analítica**

El límite de sensibilidad de cada genotipo de HPV fue calculado usando diluciones seriadas de plásmidos o genes sintéticos de cada genotipo junto con 10 ng de ADN humano genómico por reacción. Cada muestra fue repetida diez veces con el objeto de calcular la sensibilidad, especificidad e intervalos de confianza del kit. Se estableció como punto de corte (valor de gris) de positividad un valor de 10.

Genotipo	GE/ reacción PCR	Positivos/testa dos	Sensibilidad %	Intervalo de confianza 95%	Especificidad %	Intervalo de confianza 95%
16	5	10/10	100	72.3-100	100	97.1-99.8
18	5	10/10	100	72.3-100	100	96.1-99.4
26	50	5/10	50	29.9-70.1	100	98.5-100
	500	10/10	100	72.3-100	100	98.6-100
31	50	10/10	100	72.3-100	100	98.6-100
33	50	10/10	100	72.3-100	100	98.6-100
35	50	10/10	100	72.3-100	100	98.5-100
39	50	10/10	100	72.3-100	100	98.5-100
45	50	10/10	100	72.3-100	100	98.5-100
51	50	10/10	100	72.3-100	100	98.5-100
52	50	10/10	100	72.3-100	100	98.5-100
53	50	0/10	0	0-27.8	100	98.5-100
	500	10/10	100	72.3-100	100	98.6-100
56	50	5/10	50	29.9-70.1	100	98.5-100
	500	10/10	100	72.3-100	100	98.5-100
58	50	10/10	100	72.3-100	100	98.5-100
59	50	10/10	100	72.3-100	100	98.5-100
66	50	4/10	40	16.8-68.8	100	98.5-100
	500	10/10	100	72.3-100	100	98.5-100
68	50	10/10	100	72.3-100	100	98.5-100
73	50	10/10	100	72.3-100	100	98.6-100
82	50	10/10	100	72.3-100	100	98.6-100
6	50	10/10	100	72.3-100	100	98.6-100
11	50	10/10	100	72.3-100	100	98.6-100
40	50	10/10	100	72.3-100	100	98.6-100
42	50	10/10	100	72.3-100	100	98.6-100
43	50	10/10	100	72.3-100	100	98.6-100
44/55	50	10/10	100	72.3-100	100	98.6-100
54	50	10/10	100	72.3-100	100	98.6-100
61	50	5/10	50	29.9-70.1	100	98.5-100
	500	10/10	100	72.3-100	100	98.6-100
62/81	50	10/10	100	72.3-100	100	98.6-100
67	50	10/10	100	72.3-100	100	98.6-100
69	NT					
70	50	10/10	100	72.3-100	100	98.6-100
71	50	10/10	100	72.3-100	100	98.6-100
72	50	10/10	100	72.3-100	100	98.6-100
89	50	0/10	0	0-27.8	100	98.5-100
	500	10/10	100	72.3-100	100	98.6-100
84	50	10/10	100	72.3-100	100	98.6-100

Tabla 10: Sensibilidad analítica (LoD): número de equivalentes genómicos de cada genotipo por reacción de PCR con el que se obtiene un 100% de positividad cuando se analizan con hybriSoft, estableciendo como punto de corte el valor de 10. NT: no testado.

Lic. Alejandro Díez  
Acreditado  
BioSystems S.A.

Dra. SILVIA LAMELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
M.N. 4.42  
BIOSYSTEMS S.A.



### 11.1.5 Evaluación del funcionamiento del protocolo directo

Se comparó el funcionamiento de HPV Direct Flow Chip con los dos tipos de protocolo de ensayo, protocolo directo (sin extracción previa de ADN) vs uso de ADN purificado. Se analizaron 225 casos clínicos de forma simultánea con los dos tipos de protocolos. Se obtuvo una concordancia de resultados positivos del 100% ( $Kappa=0.99$ ) entre los dos métodos analizados. Los resultados obtenidos para los tres tipos de muestras, torunda citológica, citología líquida y secciones parafinadas, se resumen en la siguiente tabla:

	HPV+ (casos positivos/casos totales)		
	HPV Direct-Flow Chip test		concordancia muestra directa vs ADN purificado
	ADN purificado	Muestra directa	
<b>Torunda citológica (n=94)</b>	45,7 % (43/94)	43,6 % (41/94)	95,4 % ( $Kappa=0.957$ )
<b>Citología líquida (n=78)</b>	69,2% (54/78)	70,5% (55/78)	99 % ( $Kappa=0.97$ )
<b>Biopsias parafinadas (n=53)</b>	71.7% (38/53)	71.7% (38/53)	100 % ( $Kappa=1$ )

Tabla 11: Funcionamiento de HPV Direct Flow Chip Kit con muestras directas y con ADN purificado.

### 11.2 Clínico

Se analizaron 552 muestras cervicales de rutina para evaluar el funcionamiento clínico del test. Estas muestras incluían torundas citológicas (n= 440), citologías líquidas (n= 76) y secciones de tejido parafinado (n=36). Se detectaron 249 muestras positivas para HPV, de las cuales 232 fueron genotipadas correctamente, mientras que 17 fueron positivas para la sonda universal de HPV y negativas para las sondas específicas de genotipo.

Muestras	HPV+	HR HPV+
Total (n=552)	45%	29.3%
NILM (n= 388)	33.7%	22.3%
ASCUS (n=71)	59.1%	33.8%
LSIL (n= 59)	84.7%	61%
ASC-H (n= 5)	40%	40%
HSIL/CIN II (n=8)	100%	100%
CIN I (n=21)	76.2%	23.8%

Tabla 12: Distribución de grupos diagnósticos y positividad para HPV. HR: high risk, alto riesgo.

## 12 LIMITACIONES

HPV Direct Flow CHIP ha sido validado con torundas citológicas, citologías líquidas y secciones de tejido parafinado (ver apartado 7). El empleo de cualquier otro tipo de muestra puede generar resultados erróneos y debe de ser previamente verificado su funcionamiento.

Lic. Alejandro Díaz  
Aprobado  
BioSystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
MN 14.421  
BIOSYSTEMS S.A.



**13 PROBLEMAS Y SOLUCIONES**

Problema	Causas	Soluciones
No se observa ninguna señal/ no hay señal de hibridación.	<p>Error durante el protocolo de hibridación.</p> <p>Reactivos de hibridación caducados o almacenados de forma errónea.</p> <p>Sondas del Chip degradadas por restos de reactivos descontaminantes (ej. Lejía) en los pocillos.</p>	<p>Comprobar que todos los reactivos se han añadido correctamente durante el proceso de hibridación.</p> <p>Comprobar el funcionamiento correcto de e-BRID. Repetir el ensayo.</p> <p>Comprobar la fecha de caducidad y las condiciones de almacenamiento de los reactivos y los Chips. Repetir el ensayo.</p> <p>Limpiar con agua destilada abundante y repetir el experimento.</p>
Presencia de HPV en control negativo.	Problemas de contaminación en las zonas de pre-PCR y post-PCR.	Limpiar bien las zonas de trabajo y repetir el experimento.
Ausencia de señales en el control de amplificación endógeno.	<p>Cantidad insuficiente de ADN en la muestra clínica.</p> <p>Presencia de inhibidores de PCR.</p>	<p>Repetir la PCR aumentando la cantidad de muestra de partida. Repetir el ensayo.</p> <p>Purificar el ADN de la muestra y repetir el ensayo.</p>
Presencia de precipitados del cromógeno en el Chip después de la finalización del protocolo de hibridación.	<p>El reactivo E no está recién preparado.</p> <p>El vial de preparación de Reactivo E tiene restos de Reactivo E de usos anteriores.</p>	<p>Preparar una nueva mezcla de sustrato mezclando los reactivos E1 y E2 (1:1) justo antes de su uso. Repetir el ensayo.</p> <p>Lavar bien el vial de Reactivo E con agua destilada antes de cada uso para evitar el acúmulo de precipitados de usos consecutivos. Repetir el ensayo.</p>
Señales débiles en la hibridación.	<p>Reactivos de PCR y/o hibridación caducados o almacenados de forma incorrecta.</p> <p>Error durante el protocolo de hibridación.</p> <p>El producto de PCR no se ha desnaturalizado de forma adecuada antes de la hibridación.</p> <p>Baja calidad/cantidad de ADN en la muestra</p>	<p>Comprobar la fecha de caducidad de todos los reactivos y las condiciones de almacenamiento. Repetir el ensayo.</p> <p>Comprobar el correcto funcionamiento de e-BRID y el protocolo de hibridación. Repetir el ensayo.</p> <p>Comprobar que el paso previo de desnaturalización del producto de PCR se ha realizado de forma correcta. Repetir el ensayo.</p> <p>Aumentar la cantidad de muestra o de ADN en la reacción de PCR. Repetir el ensayo.</p>

Lic. Alejandro Díez  
Abogado  
BioSystems S.A.

Dr. BCS/LIVIA MANUELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
M.N. 4424  
BIO SYSTEMS S.A.









**14 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**
**10952**

- zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm GW (1974). Attempts to detect virus specific ADN in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer* 13: 650-6.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV *et al* (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189: 12-9.
- zur Hausen H (1996). Papillomavirus infections-a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1288: F55-78.
- zur Hausen H (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2: 342-50.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348 (6): 518-27
- Elsa Herraéz-Hernandez, Martina Alvarez-Perez, Gloria Navarro-Bustos, Javier Esquivias, Sonia Alonso, Jose Aneiros-Fernandez, Cesar Lacruz-Pelea, Magdalena Sanchez-Aguera, Javier Saenz Santamaria, Jesus Chacon de Antonio, Jose Luis Rodriguez-Peralto. HPV Direct Flow CHIP: A new human papillomavirus genotyping method based on direct PCR from crude-cell extracts. *Journal of Virological Methods* 193 (2013) 9–17.
- Herraéz-Hernandez E, Preda O, Alonso S, Pardo RS, Olmo A. Detection and Genotyping of Human Papillomavirus DNA in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Specimens with the HPV Direct Flow CHIP System. *Open Virol J.* 2013 Oct 18;7:91-5.

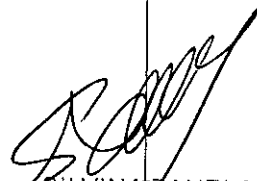
**15 SÍMBOLOS DE LA ETIQUETA**

Explicación de los símbolos de la etiqueta del producto:

<b>IVD</b>	Producto sanitario para diagnóstico in vitro		Fecha de caducidad
<b>REF</b>	Número de catálogo		Límite de temperatura
<b>LOT</b>	Código de lote		Fabricante
	Consúltese las instrucciones de uso		Contenido suficiente para <n> ensayos

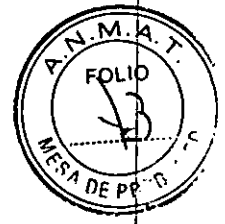


Lic. Alejandro Diez  
Abogado  
Biosystems S.A.



Dra. SILVANA ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
MN 14.421  
BIOSYSTEMS S.A.





# Proyecto de rótulos de HPV

✓ PCR

10952

## Rótulos Externos

**masor** diagnóstica HPV Direct-Flow Chip Kit (e-BRID) (PCR Reagents) **CE**  
Avda. Conocimiento 100 P. T. Ciencias de la Salud 18018 Granada (Spain) **IVD**

**REF** MAD-003930MU-P-E-30(30 tests)  
**LOT** Sin Lote

**X** -20 °C Shipping (2-8) °C

EAN: 8435421209657

(01)08435421209657(17)(10)Sin Lote

Importado por:  
**BioSystems S.A**  
Domicilio: **Av. Dorrego 673**  
Tel. **54-011-4854-7775**  
Directora Técnica: **Farm. Silvina Zanela**  
**USO PROFESIONAL EXCLUSIVO**  
**AUTORIZADO POR ANMAT Certificado N°:**

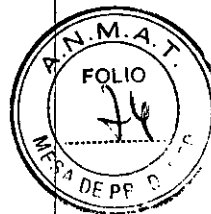
## Rótulos Internos

**masor** diagnóstica HPV-PCR mix **CE**  
**REF** MAD-003930MU-MIX-E-36(1000 µl) **IVD**  
**LOT** Sin Lote  
**X** -20 °C

**masor** diagnóstica Hot Start DNA polymerase **CE**  
**REF** MAD-POL-2(20 µl) **IVD**  
**LOT** Sin Lote  
**X** -20 °C

Lic. Alejandro Diez  
Aprobado  
BioSystems S.A.

*[Signature]*  
Dra. SILVINA ZANELA  
DIRECTORA TECNICA  
MN 14.421  
BIOSYSTEMS S.A.



Uracil-DNA-Glycosylase

master  
diagnóstica

REF MAD-UNG-1(40 µl)  
LOT Sin Lote

20 °C.

CE

IVD

10952

✓ HYBRIDIZACION

## Rótulos Externos

master  
diagnóstica

Avda. Conocimiento 100  
P. T. Ciencias de la Salud  
18016 Granada (Spain)

HPV Direct-Flow Chip Kit (e-  
BRID) (Hybridization Reagents)

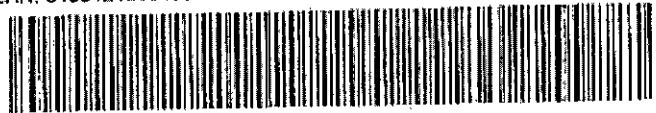
CE

IVD

REF MAD-003930M-H-E-30(30 tests)  
LOT Sin Lote

2-8 °C

EAN: 8435421209459



(01)08435421209459(17)(10)Sin Lote

Importado por:  
**BioSystems S.A**  
Domicilio: **Av. Dorrego 673**  
Tel. **54-011-4854-7775**  
Directora Técnica: **Farm. Silvana Zanela**  
**USO PROFESIONAL EXCLUSIVO**  
**AUTORIZADO POR ANMAT Certificado N°:**

Lic. Alejandro Diez  
Aprobado  
BioSystems S.A.

Dra. SILVANA ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
MN 14.421  
BIOSYSTEMS S.A.

## Rótulos Internos

10952

Hybridization Solution (Reagent A)

REF MAD-003930/HA-E-30(30 tests)  
LOT Sin Lote  
(2-8) °C

CE  
IVD

Blocking Solution (Reagent B)

REF MAD-003930/MB-E-30(30 tests)  
LOT Sin Lote  
(2-8) °C

CE  
IVD

Streptavidin-Alkaline Phosphatase (Reagent C)

REF MAD-003930/AC-E-20(30 tests)  
LOT Sin Lote  
(2-8) °C

CE  
IVD

Washing Buffer I (Reagent D)

REF MAD-003930/WD-E-30(30 tests)  
LOT Sin Lote  
(2-8) °C

CE  
IVD

Substrate (Reagent E1)

REF MAD-003930/VE1-E-30(30 tests)  
LOT Sin Lote  
(2-8) °C

CE  
IVD

Chromógen (Reagent E2)

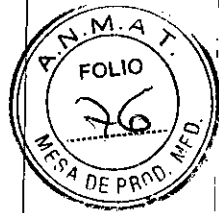
REF MAD-003930/VE2-E-30(30 tests)  
LOT Sin Lote  
(2-8) °C

CE  
IVD

Lic. Alejandro Díez  
Rodríguez  
BioSystems S.A.


Dra. SILVINA ZANELA  
DIRECTORA TÉCNICA  
MN 14.421  
BIOSYSTEMS S.A.





10952

Reagent E

 **diagnostica**


REF	MAD-003930ME
LOT	5th Lots

(2-8) °C

CE

IVD

Washing Buffer II (Reagent F)

 **diagnostica**


REF	MAD-003930MF-E-50(50 tests)
LOT	5th Lots

(2-8) °C

CE

IVD

HPV Chip (e-BRID)

 **diagnostica**

REF	MAD-00393021-CH-E-50(50 uds)
LOT	5th Lots

(2-8) °C

CE

IVD

C

Lic. Alejandro Diez  
Abogado  
Biosystems S.A.

Dra. SILVINA ZANELA  
DIRECTORA TECNICA  
MN 14.421  
BIOSYSTEMS S.A.