

- **¿Cómo puedo ser más eficiente al momento de realizar los ensayos? R:** Puede colocar los reactivos que comparten todos en vez de uno por uno como sucede con el reactivo diluyente del **paso tres**, pero no mezcle ya que eso lo hará cuando al final coloque la muestra o control con su respectivo cambio de punta de micropipeta para evitar reactividad cruzada.
- **¿Qué pasa si dejo mis tubos por más de 30 minutos o una mayor temperatura de la indicada en el termobloque, baño seco o incubador? R:** El ensayo LAMP es sensible, en caso de que ocurra esto los resultados obtenidos pueden verse afectados, por lo que el ensayo debe de repetirse y descartar esos tubos.
- **¿Puedo saber cuál de los genotipos 16, 18, 31, 33 o 45 fue el detectado en un resultado positivo? R:** No, el resultado de la detección es únicamente cualitativo así que en caso de que uno o más de esos genotipos se encuentren presentes no se podrá saber de forma específica cual se detectó.

Referencias

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J and Jemal A: Global cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin. 65:87–108. 2015.
2. López Rivera, M. G., Flores, M. O., Villalba Magdaleno, J. D., & Sánchez Monroy, V. (2012). Prevalence of human papillomavirus in women from Mexico City. Infectious diseases in obstetrics and gynecology, 2012, 384758.
3. Joura EA, Ault KA, Bosch FX, Brown D, Cuzick J, Ferris D, et al. Attribution of 12 high-risk human papillomavirus genotypes to infection and cervical disease. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2014;23(10):1997-2008.
4. Zaravinos A, Mammas IN, Sourvinos G and Spandidos DA: Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV). Int J Biol Marker. 24:215–222. 2009.
5. Kumvongpin, R., Jearanaikoon, P., Wilailuckana, C., Sae-Ung, N., Prasongdee, P., Daduang, S. ... Daduang, J. (2017). Detection assay for HPV16 and HPV18 by loop-mediated isothermal amplification with lateral flow dipstick tests. Molecular Medicine Reports, 15, 3203-3209.
6. Instituto Nacional del Cáncer. (2020). Explicación de las recomendaciones de la sociedad Americana contra el Cáncer sobre los exámenes de detección del cáncer d cuello uterino. Cancer.gov.
7. Sambrook J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU.
8. Dundass N., N. K. Leos, M. Mitui, P. Revell y B. B. Rogers. 2008. Comparison of automated nucleic acid extraction methods with manual extraction. Journal of Molecular Diagnostics 10: 311-316.

Índice de símbolos

	Consultar el instructivo de uso		Caducidad
	Solo para análisis <i>in vitro</i>		Número de catálogo
	Rango de almacenamiento 2 – 8 °C		Número de lote
	No utilizar si el paquete está dañado		No reutilizar



VPH-NET

REF DLVPH01

Registro Sanitario 2328R2024 SSA

Versión 3.2

Almacene según su etiqueta individual

Almacene los controles incluidos a -20 °C ±5 °C



ESQUEMA SIMPLIFICADO DE TODO EL PROCESO

PASO UNO:

Obtención de la muestra



Ver página 4

PASO DOS:

Extracción del ADN de la muestra



Ver página 4-6

PASO TRES:

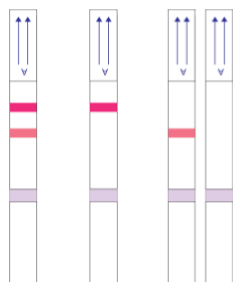
Detección de los genotipos de VPH



Ver página 6-7

PASO CUATRO:

Visualización del resultado



Ver página 7-8

Consideraciones adicionales

- Asegúrese de utilizar la cantidad indicada de muestra para la prueba, ya que demasiada o muy poca muestra puede conducir a una desviación de los resultados.
- Es necesaria la purificación de ADN previo al análisis para obtener mejores resultados.
- No intercambie reactivos de diferentes lotes ni use reactivos de otras pruebas disponibles comercialmente. Los componentes de esta prueba se combinan con precisión para un rendimiento óptimo.
- Las micropipetas y consumibles deben ser estériles. Se recomienda irradiar con luz UV por 15 minutos antes de su uso, las micropipetas previamente limpiadas con cloro y etanol asegúrese de no dejar residuos.
- Se recomienda el uso de equipo de protección al trabajar muestras.
- PRECAUCIÓN:** Permita que los reactivos y las muestras se descongelen completamente antes de su uso. Mezcle el reactivo suavemente antes de usar teniendo la precaución de no generar espuma. Regrese a su temperatura de almacenamiento después de su uso.
- PRECAUCIÓN:** No deje abierto el contenedor de las pruebas Bionet multi, solo ábrala hasta su uso, la presencia de humedad puede afectar el desempeño de la prueba.
- Evite interrupciones prolongadas de los pasos del ensayo. Asegure las mismas condiciones de trabajo para todos los tubos.
- Calibre las micropipetas con frecuencia para asegurar la precisión de la distribución de muestras/reactivos. Use puntas diferentes de micropipeta en cada muestra y reactivo para evitar contaminación cruzada.
- La prueba podría verse afectada por el polvo, reactivos químicos y/o sustancias como hipoclorito de sodio, ácidos, álcalis, etanol, etc. No realice el ensayo en presencia de estas sustancias y utilice puntas nuevas de preferencia con filtro.
- Todas las muestras de origen humano deben considerarse potencialmente infecciosas. El cumplimiento estricto de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) puede garantizar la seguridad del personal.
- Todos los productos de desecho generados por esta prueba deben disponerse de acuerdo a la NOM-087 vigente sobre el manejo de Residuos Biológico infecciosos.
- Coloque un tubo de 1.5-2 mL con 1 mL de agua destilada en el termobloque, baño seco o incubadora con la temperatura deseada a usar, espere 10 minutos y coloque un termómetro en el interior del tubo, si el termómetro indica la temperatura deseada a utilizar proceda a emplearlo para su ensayo. En caso contrario ajuste, espere y vuelva a medir hasta alcanzar la temperatura deseada.

Dudas, preguntas y consejos

- **¿Puedo utilizar muestras de ADN purificado con otros kits?** **R:** No, el ensayo LAMP puede verse inhibido por determinadas sustancias presentes en algunos buffers de elución incluidos en dichos kits, solo si puede eluir el ADN en el paso final en agua grado biología molecular o o Tris-HCl 10 mM pH 8 es que será posible usar ese ADN independientemente del método utilizado.
- **¿Cuánto tiempo es viable si guardo a -20°C el ADN purificado con el producto MagnetiDNA?** **R:** Puede ser viable hasta dos años como máximo, si desea que sea viable por tiempo indefinido debe almacenarlo a -80°C. Evite realizar muchos ciclos de congelamiento y descongelamiento.
- **¿La toma del hisopado/cepillado de la muestra debe realizarse por un profesional de la salud?** **R:** Sí, el profesional debe estar debidamente capacitado para la toma de este tipo de muestra. De lo contrario los resultados pueden ser falsos negativos.
- **¿Por qué no debo llevarme las perlas magnéticas?** **R:** Las perlas magnéticas mantienen la unión de forma directa con el ADN que se desea extraer, si durante el proceso se llevan dichas perlas causará que el ADN obtenido sea muy poco y puede no ser funcional para el ensayo.
- **¿Cuándo puedo retirar el tubo de la gradilla magnética durante el proceso de extracción de ADN?** **R:** El imán de la gradilla magnética tiene la función de aglomerar todas las perlas magnéticas para hacer más sencilla la tarea de retirar el sobrenadante en cada uno de los pasos, por lo tanto, puede retirar el tubo una vez que haya retirado el sobrenadante indicado para agregar el siguiente reactivo.
- **¿Debo incluir controles cada vez que analizó una muestra?** **R:** Sí, los controles aseguran que el proceso llevado a cabo fue el correcto. Es por ello que puede esperar hasta obtener más muestras e ir extrayendo su ADN hasta su posterior uso en el ensayo LAMP.

Inter-Ensayo

La reproducibilidad de la prueba utilizada para la detección se determinó realizando 20 réplicas de 3 lotes diferentes de la prueba en dos días diferentes por cada concentración incluyendo una libre de ADN viral de VPH, se utilizó solución de corrimiento como muestra. Las muestras fueron correctamente identificadas el 99% de las veces.

Reactividad cruzada

La prueba VPH-NET se ha probado con muestras positivas a 72 cepas de bacterias y virus correspondientes a los microorganismos del microbiota frecuente en uretra, cérvix u oral, algunos patógenos relacionados, además de ADN sintético con las secuencias características de los genotipos 6, 11, 26, 30, 34, 40, 42, 53, 54, 55B, 61, 62, 64, 67, 69, 70, 71, 72, 73, 82, 83, 84, 85 y 89 de VPH. Los resultados no mostraron reacción cruzada a excepción del genotipo 81 de VPH.

Sustancias interferentes

Se analizaron muestras cervicales positivas y negativas enriquecidas con sangre total hasta el 2%, células mononucleares de sangre periférica hasta 10⁶ células/mL y moco cervical consideradas como interferentes endógenos que podrían estar presentes en las muestras cervicales; de la misma manera se probó con productos de higiene femenina y contracepción entre ellos geles y espumas anticonceptivas, duchas vaginales, cremas antifúngicas con 1% de clotrimazol, hidrocortisona al 1%, nitrato de miconazol al 2%, ungüento de tioconazol y benzocaína al 20%. No se encontró ninguna interferencia con alguna de las sustancias antes mencionadas.

Desempeño

Se evaluaron un total de 400 muestras entre hisopado cervical y uretral procedentes de pacientes con y sin lesiones características por VPH tanto de alto como de bajo riesgo con la prueba rápida VPH-NET y PCR en tiempo real (qPCR). Las muestras fueron procesadas y analizadas según lo establecido por cada fabricante, al finalizar los resultados fueron agrupados por genotipo (s) detectado (s) que comparten ambas pruebas para poder compararlos. A continuación, se reportan los resultados obtenidos:

MÉTODO	qPCR			
	Resultados	Positivo	Negativo	Total
VPH-NET	Positivo	225	11	236
	Negativo	6	158	164
	Total	231	169	400

Sensibilidad Relativa: 97.40% (95% IC: 95.34% - 98.57%)

Especificidad Relativa: 93.49% (95% IC: 90.64% - 95.52%)

Precisión Global: 95.75% (95% IC: 93.30% - 97.33%)

IC: Intervalo de confianza

Beneficios

- **Rapidez:** Mayor ahorro de tiempo con una alta reproducibilidad.
- **Simple:** Fácil operación con procesos cortos y escalable.
- **Eficiencia:** Una sola metodología que engloba el procesamiento, detección y visualización de los resultados.
- **Seguridad:** Ningún producto químico de este kit es tóxico.
- **Versatilidad:** El ADN purificado con este kit es funcional no solo para su propio ensayo (LAMP) sino también para una gran variedad de aplicaciones como: PCR convencional y variantes, RPA, NGS, secuenciación con bisulfito entre otros.

Uso deseado

VPH-NET incluye lo necesario para a partir de muestras de hisopado cervical/uretral o lesiones sospechosas del virus del papiloma humano (VPH) extraer su ADN usando MagnetiDNA, detectar la presencia de los genotipos 16, 18, 31, 33 y 45 para su posterior visualización de los resultados mediante las tiras de Bionet multi.

Introducción

El cáncer cérvico uterino (CCU) es el cuarto tipo de cáncer que más causa decesos en mujeres en todo el mundo y el segundo en México, donde se estima que aproximadamente el 18% están infectadas [1, 2]. Se estima que el 99% de los casos de CCU están asociados con la infección por el virus de papiloma humano (VPH) específicamente por los genotipos de alto riesgo (VPH-HR). Hasta ahora se han identificado más de 200 genotipos, aunque algunos son de bajo riesgo (6 y 11) que se asocian con verrugas genitales y otros cambios celulares benignos, sin embargo, los genotipos 16, 18, 31, 33 y 45 tienen una prevalencia del 80% pues se asocian con lesiones precancerosas y cáncer cervical [3]. Existen diferentes tipos de pruebas para la detección de CCU como el Papanicolaou y la colposcopia, siendo las pruebas más populares de tamizaje. Cuando hay presencia de lesiones sospechosas se busca la presencia de VPH mediante métodos de amplificación de ADN como el PCR o las pruebas de captura de híbridos, no obstante, la PCR en tiempo real es la más utilizada debido a su alta sensibilidad y especificidad [4], por otro lado, existen otros métodos capaces de detectar o amplificar el ácido nucleico mediante temperatura constante permitiendo identificar la presencia de los genotipos más frecuentes de VPH [5]. La Sociedad Americana contra el cáncer recomienda realizarse una prueba de VPH cada 5 años a partir de los 25 hasta los 65 años [6].

Principio

Extracción de ADN: Este kit incluye el producto MagnetiDNA (REF BMPUR01), el cual tiene la función de obtener ADN aprovechando la carga de este, una propiedad química de los ácidos nucleicos, ya que estos poseen una carga negativa debido a los grupos fosfato presentes en su estructura, lo que permite capturar dicho material utilizando moléculas cargadas positivamente [7]. Las perlas magnéticas consisten en un centro de hierro recubierto por resina que confiere una carga positiva en su superficie, éstas se encuentran suspendidas en un buffer con cierto pH para mantener las cargas tanto de la superficie de las perlas magnéticas como la de los ácidos nucleicos, con ayuda del buffer de lisis celular (contiene agentes desnaturantes de proteínas y lípidos) tendrá la función de lisar las células presentes en la muestra, de esta forma facilitará a las perlas magnéticas capturar los ácidos nucleicos, una vez realizado dicho proceso con ayuda de un imán o magneto se atraerán los núcleos de hierro permitiendo la separación de las perlas del resto de componentes de la muestra (proteínas, lípidos entre otros) para luego eliminar dichos componentes por pipeteo. Mientras las perlas son retenidas en la pared del microtubo por el imán/magneto se realizará un proceso de lavado con el buffer de lavado, el cual, tiene la función de eliminar todos los componentes no deseados posteriormente se elimina todo el buffer de lavado para finalmente eluir las perlas magnéticas en una solución acuosa con pH básico con el fin de neutralizar el pH de las perlas liberando los ácidos nucleicos capturados [8].

Detección de los genotipos de VPH: La prueba VPH-NET (REF DLVPH01), es un ensayo para la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP por sus siglas en inglés) que permiten detectar la presencia de ADN correspondiente a los genotipos 16, 18, 31, 33 y 45 del VPH. La reacción de LAMP se realiza mezclando la muestra (ADN purificado) en dos tubos con reactivo seco (punto rojo/azul), luego se incuban a 65 °C en condiciones isotérmicas, si la muestra de ADN contiene ADN viral correspondiente a los genotipos 16, 18, 31, 33 y 45 del VPH en una concentración mayor al límite de detección se llevará a cabo el proceso de amplificación durante el cual se incorporan las marcas biotina-FAM.

En caso contrario, de no estar presente o se encuentre por debajo del límite de detección no se realizará el proceso de amplificación ni tampoco el marcaje (etiquetado).

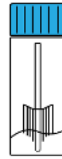
Visualización del resultado: Una vez concluido la detección, se utiliza el producto BIONET MULTI (REF DLBIO01) incluido en este kit. Para ello el producto de las amplificaciones son diluidos por separado en solución de corrimiento en el cual se colocará la prueba para que la muestra migre a través de ésta por acción capilar. Si la muestra contenía ADN de VPH de algunos de los genotipos 16, 18, 31, 33 o 45 las marcas biotina-FAM reaccionarán con las partículas recubiertas de anticuerpos anti-fluoresceína presentes en el conjugado, luego continuará migrando hasta encontrarse con los anticuerpos anti-biotina en la región de prueba (T), estos reaccionarán formando una línea de color en dicha región T, esto indica un resultado positivo debido a que fue detectado alguno de los genotipos (16, 18, 31, 33 o 45) de VPH. Por el contrario, si no hay alguno de los genotipos (16, 18, 31, 33 o 45) de VPH no habrá marcas de biotina-FAM y por lo tanto no se formará la línea de color en la región T, esto indica un resultado negativo. La prueba posee un control (C) que indica que se ha agregado la cantidad de muestra correcta y el procedimiento se ha realizado con éxito.

INSTRUCCIONES DE USO

PASO UNO: OBTENCIÓN DE MUESTRA

Recolecte la muestra siguiendo las técnicas estándar para obtención de muestras con hisopo o cepillo de cérvix/uretra para diagnóstico de VPH. Una vez haya sido recolectada debe ser almacenada en la solución contenida en su recipiente y a las condiciones descritas en las siguientes secciones.

Nota: Se recomienda encarecidamente que asegure la temperatura requerida en cada ensayo antes de emplear el termobloque, baño seco o incubadora para mayor información consulte el **inciso m** la sección 'Consideraciones adicionales' pág. 11.

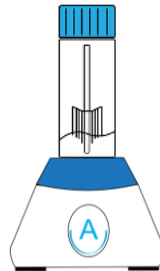


PASO DOS: EXTRACCIÓN DEL ADN DE LA MUESTRA

PRECAUCIÓN: Previo a la realización de este procedimiento es fundamental que la muestra **NO** haya estado por más de 2 horas a temperatura ambiente después de haber sido recolectada o que haya permanecido más de 7 días en refrigeración (2-8 °C), de lo contrario los resultados pueden no ser ciertos.

A continuación, siga cada uno de los pasos que se describen, recuerde no modificar y/o alterar ninguno de los pasos o cantidades que se indican.

- I. Identifique cada uno de los materiales provistos por el producto MagnetidNA y asegúrese de contar con todo lo necesario, consulte la pág. 8, sección **Contenido**.
- II. Tome el recipiente con la muestra y mezcle con ayuda de un vortex por al menos 15 segundos.



Estabilidad y almacenamiento de los reactivos

- Almacene cada componente según lo indicado su etiqueta impresa.
- La prueba es estable hasta la fecha de caducidad impresa en la bolsa.
- No utilice los reactivos después de la fecha de caducidad.

Control de calidad

Un control interno está incluido en cada prueba de Bionet multi. Una línea de color aparece en la región control (C), este es el control interno del procedimiento, su función es confirmar que hubo suficiente cantidad de muestra y el procedimiento fue correcto.

Esta prueba incluye controles, por lo que, se recomienda emplearlos en cada análisis de muestra como buena práctica de laboratorio.

Limitaciones

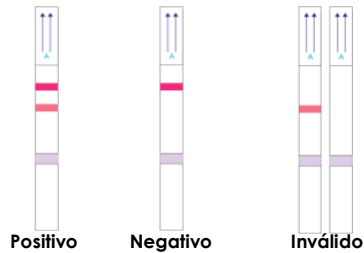
- La recolección de la muestra debe ser realizada por profesional de salud o con previa capacitación sobre la toma de muestra de hisopado cervical/uretral o lesiones sospechosas de VPH, de lo contrario esto podría llevar a resultados imprecisos.
- Los resultados deben ser interpretados por personal calificado.
- La prueba VPH-NET (producto) es solo para uso profesional *in vitro*. Esta prueba cualitativa no puede determinar el valor cuantitativo ni la tasa de aumento en la concentración de ADN viral de VPH.
- La prueba VPH-NET solo proporciona un resultado positivo o negativo a los genotipos 16, 18, 31, 33 y 45, esto no descarta la infección por cualquier otro genotipo de VPH.
- Esta prueba únicamente detecta los genotipos 16, 18, 31, 33 y 45 de ADN viral de VPH y no debe usarse como único criterio para el diagnóstico o exclusión de la infección por VPH o para informar el estado de la infección, así como para la detección de otros patógenos.
- Como con todas las pruebas de tamizaje, los resultados deben considerarse con toda información clínica disponible para el médico o personal calificado.
- Si el resultado de la prueba es negativo y los síntomas clínicos persisten se sugieren pruebas de seguimiento adicionales con otras pruebas diagnósticas como la PCR en tiempo real, los resultados deben ser interpretados por un médico.
- La tonalidad que adquiera la tira no interfiere en el resultado, mientras la línea de color en la región control (C) se visualice el resultado es válido.
- Los resultados negativos no descartan la infección por VPH ya que la mayor sensibilidad esperada es de 500 copias/mL (Límite de detección).
- Particularmente en aquellos pacientes que han estado en contacto con el virus, se deben de utilizar pruebas de diagnóstico molecular para descartar la infección en estos individuos.
- El desempeño de la prueba se ha evaluado bajo las condiciones y características mencionadas en este manual. Se recomienda seguir las instrucciones para asegurar la precisión de los resultados.

Características de presentación

Precisión Intra-ensayo

La repetibilidad de la prueba utilizada para la detección se determinó realizando 20 réplicas con diferentes concentraciones 0 copias/mL, 750 copias/mL, 1000 copias/mL de ADN viral del VPH utilizando solución de corrimiento como muestra. Las muestras fueron correctamente identificadas el 99% de las veces.

V. Una vez hayan pasado los **3 minutos**, saque la prueba del tubo y colóquela sobre una superficie plana y limpia (limpie el excedente si es necesario) e interprete los resultados.



Resultados

Control positivo (C+)	Resultado: Se visualiza una línea de color en la región de control (C) y otra línea de color en la región de prueba (T). Un resultado positivo indica que se siguió de manera correcta el procedimiento.
Control negativo (C-)	Resultado: Únicamente se visualiza una línea de color en la región de control (C). Un resultado negativo indica que se siguió de manera correcta el procedimiento.
Muestra	Positivo: Se visualiza una línea de color en la región de control (C) y otra línea de color en la región de prueba (T). Un resultado positivo indica que se detectó uno o más genotipos (16, 18, 31, 33 o 45) del ADN de VPH. Negativo: Se visualiza una línea de color en la región de control (C). No se observa ninguna línea de color en la región de prueba (T). Un resultado negativo indica que se no detectó ninguno de los genotipos (16, 18, 31, 33 o 45) del ADN de VPH.
Inválido	No se visualiza la línea de color en la región control (C).

Contenido

Esta prueba proporciona los reactivos en las cantidades necesarias para procesar 10 muestras con extracción, reacción y revelado. A continuación, se presenta el contenido por separado de los productos:

INCLUIDOS

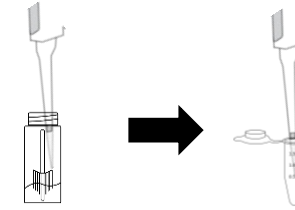
- **MagnefiDNA**
- Buffer de lisis
- Perlas magnéticas
- Buffer de lavado
- Buffer de elución
- Tubos de 1.5-2 mL
- **VPH-NET Reg. Sanitario 2328R2024 SSA**
- Tubo con reactivo seco punto rojo
'Antes tubo con reactivo seco 1'
- Tubo con reactivo seco punto azul
'Antes tubo con reactivo seco 2'
- Reactivo diluyente
- Control negativo (C-)
- Control positivo (C+)
- Gotero con aceite mineral
- **Bionet multi**
- Prueba en tira
- Tubos con solución de corrimiento

REQUERIDOS PERO NO INCLUIDOS

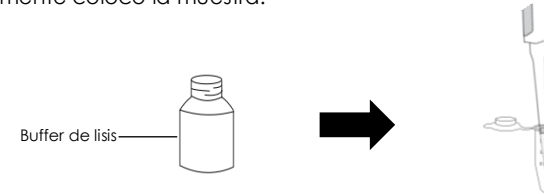
- Micropipetas
- Puntas para micropipetas
- Guantes de nitrilo
- Vortex
- Soporte magnético o imán de alta potencia
- Contenedor de RPBI
- Termobloque, baño seco o incubadora

NOTA: Algunos de los reactivos/equipos pueden ser adquiridos en conjunto o por separado, para ello visite www.amunet.com.mx

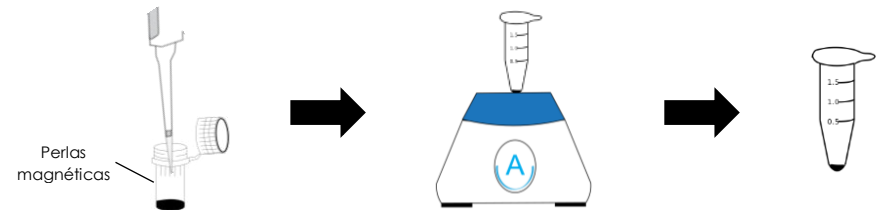
III. Utilizando una micropipeta y puntas (nuevas) tome **250 microlitros (µL)** de la **suspensión de la muestra** y transfírela a un tubo de 1.5-2 mililitros (mL).



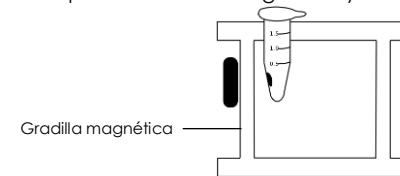
IV. Posteriormente adicione **300 µL** de **buffer de lisis** al tubo de 1.5-2 mL donde previamente colocó la muestra.



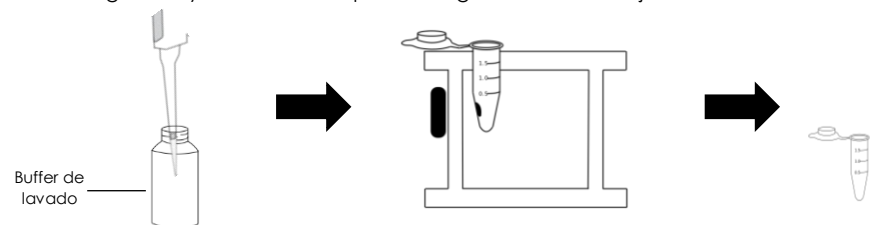
V. Tome y agite el contenedor de perlas magnéticas de forma vertical por 10 segundos o hasta que su contenido sea homogéneo, tome **50 µL** de las **perlas magnéticas** y deposítelas en el tubo con la muestra. Cierre perfectamente y mezcle con ayuda de un vortex por 1 minuto, al finalizar deje reposar el tubo por 5 minutos a temperatura ambiente.



VI. Coloque el tubo en una gradilla magnética, déjelo en esa posición hasta que la mezcla se aclare (aproximadamente 1-2 minutos), posteriormente retire completamente el sobrenadante sin quitar el tubo de la gradilla y sin llevarse las perlas magnéticas.

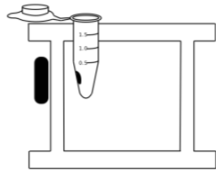


VII. Después agregue **500 µL** de **buffer de lavado** y mezcle por vortex durante 10 segundos luego regrese el tubo a la gradilla magnética y déjelo hasta que la mezcla se aclare (aproximadamente 1-2 minutos), proceda a remover el sobrenadante sin retirar el tubo de la gradilla y sin llevarse las perlas magnéticas. Evite dejar residuos.



VIII. A continuación, deje el tubo abierto en la gradilla para eliminar cualquier residuo del buffer de lavado, esto hasta por 2 minutos.

NOTA: Si no se remueve por completo el buffer de lavado puede inhibir las reacciones posteriores.



IX. Agregue **50 µL** del **buffer de elución** al tubo con las perlas magnéticas, después mezcle por vortex durante 10 segundos, posteriormente incube el tubo a **65 °C** durante **10 minutos**. Al finalizar el tiempo coloque el tubo en la gradilla magnética, espere a que las perlas magnéticas se separen del sobrenadante y únicamente recolecte todo el sobrenadante (ADN purificado) después transfíralo a un tubo nuevo y estéril de 1.5-2 mL, rotúlelo para identificarlo.



PASO TRES: DETECCIÓN DE LOS GENOTIPOS DE VPH

PRECAUCIÓN: El ADN purificado puede ser utilizado inmediatamente luego de su obtención, en caso contrario debe ser almacenado a -20 °C y luego permitir que alcance temperatura ambiente antes utilizarlo.

A continuación, siga cada uno de los pasos que se describen, recuerde no modificar y/o alterar ninguno de los pasos o cantidades que se indican.

I. Identifique cada uno de los materiales provistos por el producto VPH-NET y asegúrese de contar con todo lo necesario, consulte la pág. 8, sección **Contenido**.

ANTES DE CONTINUAR

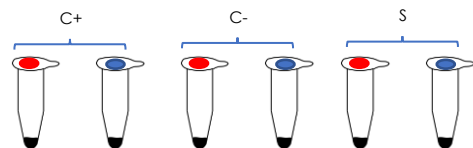
Coloque 50 µL de reactivo diluyente en el control positivo, homogenice por pipeteo y almacene a -20 °C ±5 °C hasta el momento de su uso.

II. Prepare cada tubo por separado como se indica a continuación:

- **Control positivo (C+) del ensayo:** Tome un tubo con reactivo seco punto **rojo** y agregue **20 µL** de **reactivo diluyente**, **5 µL** de **control positivo** y mezcle por pipeteo hasta que la mezcla se vea homogénea. Al finalizar cierre el tubo y rotule con C+. Repita este paso, pero usando un tubo con reactivo seco punto **azul**.
- **Control negativo (C-) del ensayo:** Tome un tubo con reactivo seco punto **rojo** y agregue **20 µL** de **reactivo diluyente**, **5 µL** de **control negativo** y mezcle por pipeteo hasta que se vea homogénea. Al finalizar cierre el tubo y rotule con C-. Repita este paso, pero usando un tubo con reactivo seco punto **azul**.
- **Muestra (S):** Tome un tubo de con reactivo seco punto **rojo** y agregue **20 µL** de **reactivo diluyente**, **5 µL** de **muestra** (ADN purificado) y mezcle por pipeteo hasta que se vea homogénea. Al finalizar cierre el tubo y rotule de tal forma que pueda identificarla. Repita este paso, pero usando un tubo con reactivo seco punto **azul**.

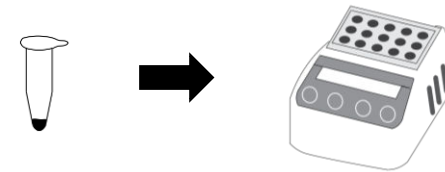
Nota: se recomienda realizar duplicados por cada muestra a analizar.

ANTES DE CONTINUAR: Visualice que cada uno de los tubos haya sido correctamente homogeneizado, es decir que no se vean zonas secas en el interior de los tubos.



6

III. Con ayuda del gotero con aceite mineral, coloque una gota de aceite en el interior de cada uno de los tubos, solo sobre su superficie sin mezclar. Posteriormente, colóquelos a **65 °C** por **30 minutos** en alguno de los siguientes equipos: termobloque, baño seco o incubador. Al finalizar el tiempo saque los tubos del equipo.



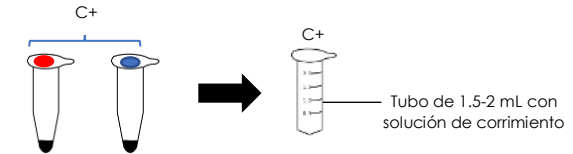
PASO CUATRO: VISUALIZACIÓN DEL RESULTADO

PRECAUCIÓN: Cada uno de los tubos generados del **PASO TRES** pueden ser utilizados inmediatamente, en caso contrario deben ser almacenados a -20 °C y luego permitir que alcance temperatura ambiente antes de utilizarlos.

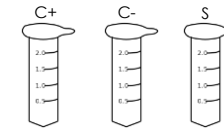
A continuación, siga cada uno de los pasos que se describen, recuerde no modificar y/o alterar ninguno de los pasos o cantidades que se indican.

I. Identifique cada uno de los materiales provistos por el producto Bionet multi y asegúrese de contar con todo lo necesario, consulte la pág. 8, sección **Contenido**.

II. Recolecte **5 µL** del **tubo punto rojo (C+)** después transfíralos a un tubo con solución de corrimiento y mezcle por vortex por 5 segundos, luego recolecte **5 µL** pero del **tubo punto azul (C+)** y transfíralos al mismo tubo con solución de corrimiento, mezcle, cierre perfectamente y rotule con C+.



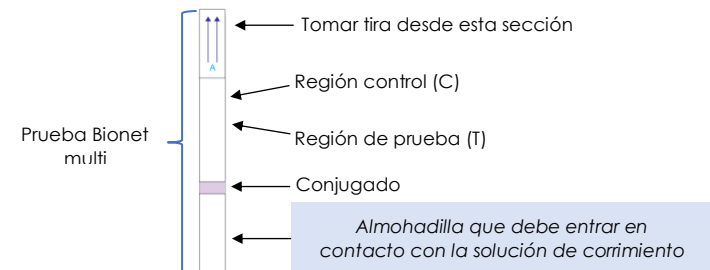
III. Repita el paso anterior para cada uno de los tubos generados restantes por separado según corresponda, al final obtendrá tres tubos con solución de corrimiento (C+, C- y S).



IV. Tome una prueba Bionet multi y rotúlela según la colocará dentro del tubo con solución de corrimiento elaborado en el paso anterior:

- Tira **S** para el tubo con solución de corrimiento que tiene la **muestra**.
- Tira **C+** para el tubo con solución de corrimiento que tiene el **control positivo**.
- Tira **C-** para el tubo con solución de corrimiento que tiene el **control negativo**.

Programa un temporizador por **3 minutos**.



7