

1 Descripción del método

Papitype es un kit de reactivos que permite la detección y el tipado de los papilomavirus humanos (VPH) en muestras clínicas. El sistema *Papitype* consiste en:

- 1) **Extracción del ADN vírico:** se realiza mediante digestión de las proteínas celulares y víricas mediante incubación con proteinasa K en un tampón adecuado.
- 2) **Amplificación:** se realiza mediante un protocolo que utiliza unos oligonucleótidos genéricos que permiten obtener un producto del ORF L1 común a todos los tipos de papilomavirus. La longitud de este producto es 450 pares de bases (pb) aproximadamente dependiendo del tipo de VPH. La mezcla de amplificación permite la amplificación de un control interno (CI) de 590 pb. Este producto debe aparecer en todas las muestras y permite descartar los falsos negativos. Debido a su tamaño y a la ausencia de dianas de restricción no interfiere en la interpretación de los resultados.
- 3) **Análisis de restricción del producto de amplificación:** se realiza mediante 2 digestiones simultáneas utilizando las enzimas EnzI y EnzII. Cada digestión es analizada electroforéticamente en un gel de agarosa.
- 4) **Identificación del patrón de restricción:** se realiza por comparación con los patrones teóricos incluidos en la tabla adjunta. El análisis permite la identificación del tipo de papilomavirus de forma inequívoca.

2 Componentes

El sistema *Papitype* incluye los siguientes componentes. Todos los reactivos están listos para su uso sin añadir ni reconstituir ningún componente.

Componente	Viales	Volumen	Conservación
Proteinasa K	2	1000 µL	-15 / -25 °C
Solución digestión 2X	2	1000 µL	-15 / -25 °C
AmpliMix VPH	2	896 µL	-15 / -25 °C
Enz I (20 U/µL)	1	20 µL	-15 / -25 °C
Enz II (5 U/µL)	1	80 µL	-15 / -25 °C
Marcador peso molecular	1	25 µL	-15 / -25 °C

* Después del primer uso, mantener la proteinasa K a 2-8 °C.

* Proteinasa K: Irritante y Sensibilizante. Irrita los ojos, las vías respiratorias y la piel. Posibilidad de sensibilización por inhalación y en contacto con la piel. No respirar los vapores. Evítense el contacto con la piel. En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico. Xn, R36/37/38-42/43, S23-24-26-36/37

* Reactivos necesarios no suministrados: Agua destilada, Cloruro sódico 0,9 %, Taq polimerasa, agarosa, TBE, bromuro de etidio, tampón de carga de electroforesis 5X.

3 Procedimiento

3.1 Preparación de muestras cervicales, uretrales y anales tomadas con escobillones sin medio

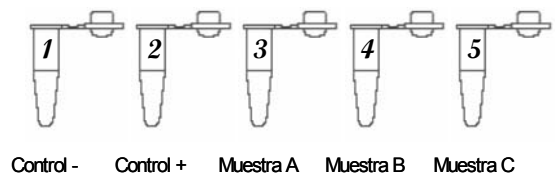
- 1 Añadir 1,5 mL de cloruro sódico 0,9 % al tubo que contiene la torunda.
- 2 Agitar en el vortex durante 1 min.
- 3 Decantar el sobrenadante en un tubo de 1,5 mL autoclavado.
- 4 Centrifugar durante 5 min a 13000 rpm.
- 5 Descartar el sobrenadante con la pipeta, con cuidado de no arrastrar el pellet de células.

3.2 Extracción del ADN vírico

- 1 Añadir 50 µL de Solución de Digestión 2X y 50 µL de Proteinasa K a la preparación de células.
- 2 Incubar a 55 °C durante 2 h.
- 3 Incubar a 95 °C durante 10 min para inactivar la Proteinasa K.
- 4 Centrifugar a 13000 rpm durante 10 min.
- 5 Conservar a -15/-25 °C hasta su uso en la reacción de amplificación.

3.3 Preparación de la reacción de amplificación

- 1 Preparar y rotular los tubos de 0,2 mL necesarios para la amplificación de muestras y controles. Se recomienda seguir el siguiente esquema:



- 2 Descongelar la **AmpliMix VPH** y el ADN de muestras y controles.
- 3 En un tubo de 1,5 mL, tomar el volumen de **AmpliMix VPH** necesario para todas las reacciones (por cada muestra 44,8 µL).
- 4 Añadir el volumen necesario de Taq polimerasa (0,4 µL por reacción). Mezclar fuertemente.
- 5 Pipetear 45 µL de la mezcla anterior en cada tubo de amplificación. Descartar el volumen restante.
- 6 Añadir 5 µL del sobrenadante de cada extracción de ADN vírico al tubo correspondiente (mezclar sin resuspender el precipitado).
- 7 Colocar los tubos en el termociclador y someterlos al siguiente perfil térmico:

Tiempo	Temperatura	Ciclos
4:00	94 °C	1
0:30	94 °C	
0:45	52 °C	40
0:30	72 °C	
4:00	72 °C	1
	4 °C	

* Todos los componentes deben mantenerse en frío mientras se están manipulando.

* Los tubos con la mezcla de amplificación deben colocarse rápidamente en el termociclador después de añadir la Taq polimerasa y el ADN.

3.4 Detección y tipado de VPHs

- 1 Preparar 2 alícuotas de 20 µL con el producto de amplificación.
- 2 Añadir a uno de los tubos 0,5 µL de EnzI y al otro 2 µL de EnzII.
- 3 Incubar a 37 °C durante 2 horas.
- 4 Añadir 3 µL de tampón de carga de electroforesis 5X a cada tubo.
- 5 Cargar el volumen de las 2 digestiones en pocillos adyacentes de un gel de agarosa al 3% y realizar la electroforesis.

* Opcionalmente puede realizarse un análisis electroforético del producto de amplificación sin digerir para evitar digerir los negativos. En este caso mezclar 10 µL del producto de amplificación con 2 µL del tampón de carga de electroforesis 5X (no suministrado) y correr la electroforesis en las condiciones habituales.

* Se recomienda cargar las digestiones junto al marcador de peso molecular.

4 Interpretación de los resultados

- 1 Anotar el tamaño de los fragmentos de restricción obtenidos en la digestión con EnzI y Enz II (excepto la banda del control interno).
- 2 Comprobar que la suma de los tamaños de los fragmentos en ambos casos es 450 pb aprox. (en caso de una muestra portadora de 2 VPHs la suma debería ser 900 pb aprox.).
- 3 Interpretar el resultado según la siguiente tabla:

Resultado	Interpretación
A) NO se observan bandas de restricción de VPHs. SI se observa la banda del C.I. (590 pb)	NO SE DETECTA VPH
B) NO se observan bandas de restricción de VPHs*. Distinguir entre una de las siguientes opciones:	
B1) Se identifican los patrones de restricción de EnzI y EnzII con algún VPH	POSITIVO VPH X
B2) Se identifican los patrones de restricción de EnzI y EnzII con varios VPHs	POSITIVO VPHs X y Z
B3) No se identifican los patrones de restricción con los de ningún VPH	POSITIVO VPH INDETERMINADO
C) NO se observan bandas de restricción de VPHs. NO se observa la banda del C.I.	NO VALORABLE (prueba no válida)

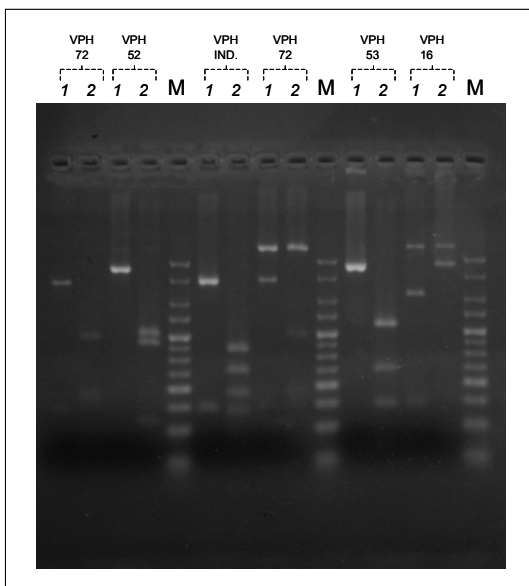
* En las muestras con alta carga viral el producto de amplificación del control interno podría no aparecer por competición con el de VPH.

* Las bandas de menor tamaño no suelen ser visibles en el gel, excepto en las muestras con alta carga viral.

* Algunas muestras son portadoras de dos o más virus. En este caso los patrones de restricción de ambos virus se superponen dificultando su identificación.

* Algunas muestras clínicas presentan inhibidores de la reacción de amplificación que impiden la obtención del producto del control interno (banda de 592 pb). En este caso se recomienda repetir todo el proceso utilizando el sistema de purificación de ADN *QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit de Qiagen[®]*. Si se obtuviera el mismo resultado habría que informar resultado NO VALORABLE y solicitar una nueva muestra.

5 Ejemplo de resultado



Resultados obtenidos con diferentes muestras clínicas.