

HPV Direct Flow CHIP Kit

**Screening y genotipado del virus del
papiloma humano para diagnóstico *in
vitro***

**mediante amplificación e hibridación
específica**

30 determinaciones

Ref. MAD-003930M

Versión 07. Última revisión Diciembre 2012

(Bajo las regulaciones UNE-EN 375)

Para uso en diagnóstico in vitro

MASTER DIAGNÓSTICA

Avda. Conocimiento 100. P. T. Ciencias de la Salud 18016-Granada (España)
master@vitroweb.com www.masterdiagnostica.com

CONTENIDO

1. OBJETIVO.....	3
2. PRINCIPIO DEL MÉTODO	3
3. MATERIAL SUMINISTRADO	4
4. MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO EN EL KIT	5
4.1. EQUIPOS.....	5
4.2. FUNGIBLES.....	5
5. ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS.....	5
6. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES.....	5
7. PROCEDIMIENTO	6
7.1. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS	6
7.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	6
7.3. REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN DE ADN VÍRICO	8
7.4. HIBRIDACIÓN REVERSA POR FLOW-THROUGH	9
8. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	10
9. REPRODUCIBILIDAD DE HPV Direct Flow CHIP.....	11
10. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD ANALÍTICA DE HPV Direct Flow CHIP	12
11. RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS	12
12. BIBLIOGRAFÍA	13

MASTER DIAGNÓSTICA

Se recomienda leer detenidamente este manual antes de comenzar a realizar el procedimiento.

1. OBJETIVO

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, HPV se clasifica en (Muñoz 2003):

- Alto riesgo u oncogénico (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82). Pueden causar carcinogénesis.
- Bajo riesgo (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 62, 67, 69, 70, 71, 72, 81, 84 y 89 (=CP6108). Causan verrugas genitales y colaboran con los HPV de alto riesgo.

El sistema **HPV Direct Flow CHIP** permite la detección del virus HPV y el genotipado de 36 tipos de HPV de alto riesgo y bajo riesgo. Se basa en la amplificación del ADN vírico seguido de hibridación Flow-Through en membrana mediante dot blot reverso de los productos amplificados.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

HPV Direct Flow CHIP se basa en una metodología que consiste en la amplificación de un fragmento de la región vírica L1 mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) seguido de hibridación en membrana con sondas de DNA específicas mediante la tecnología DNA-Flow. A diferencia de otros métodos, este sistema **no requiere la extracción previa de ADN de las muestras**, sino que se procede directamente a su amplificación a partir de suspensiones celulares, células fijadas o secciones de tejido parafinado, con la consecuente reducción en tiempo de manipulación de muestras y obtención de resultados.

Los amplicones biotilados generados tras la PCR se hibridan en membranas que contienen sondas específicas para el genotipado de HPV, así como una sonda genérica universal para screening de HPV y sondas de control de amplificación e hibridación. 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 ha habido hibridación.

MASTER DIAGNÓSTICA

3. MATERIAL SUMINISTRADO

El kit proporciona reactivos suficientes para procesar 30 muestras. Se incluyen los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación específica de HPV, así como la posterior hibridación en membrana automatizada.

- **Reactivos para PCR directa:**

Mix PCR	1 vial x 1700 µl
Phire® Hot Start II ADN Polimerasa*	1 vial x 30 µl
Tubos de PCR 0,2 ml color verde	30 unidades

La Mix de PCR contiene cebadores para amplificar un fragmento de la región L1 del virus HPV, junto con cebadores para amplificar un fragmento de DNA genómico humano usado como control interno. También incluye los dNTPs y el tampón de reacción.

* Aspectos legales:

El precio de venta de este producto incluye una licencia limitada, no transferible, protegida por patentes de EEUU y otras (5.500.363 y 5.352.778), propiedad de New England Biolabs, Inc., para el uso de este producto. Ninguna otra licencia bajo estas patentes es otorgada al cliente, expresamente o por implicación, por la compra de este producto.

Este producto está protegido por una licencia bajo patente US 5.436.149 propiedad de TaKaRa Shuzo Co. Ltd. EL producto se vende bajo licencia de Affibody AB, Suiza. Phire® es una marca registrada de Finnzymes Oy, una compañía del grupo Thermo Fisher Scientific.

- **Reactivos para dot-blot reverso:**

Reactivo A:	Solución de hibridación	80 ml
Reactivo B:	Solución de bloqueo	35 ml
Reactivo C:	Complejo estreptavidina-fosfatasa alcalina	18 ml
Reactivo D:	Solución de lavado (I)	65 ml
Reactivo E-1:	Sustrato BCIP (componente 1)	10 ml
Reactivo E-2:	Cromógeno NBT (componente 2)	10 ml
Reactivo F:	Solución de lavado (II)	50 ml
HPV CHIP	Membranas con array de sondas	30 unidades

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.

MASTER DIAGNÓSTICA

Avda. Conocimiento 100. P. T. Ciencias de la Salud 18016-Granada (España)
master@vitroweb.com www.masterdiagnostica.com

4. MATERIAL NECESARIO NO PROPORCIONADO EN EL KIT

4.1. EQUIPOS

- Microcentrífuga.
- Micropipetas automáticas: P1000, P200, P20 y P2.
- Termociclador.
- Equipo automatizado para hibridación e-BRID System™.
- Baño termostatzado/estufa.
- Bloque térmico para calentar tubos de PCR (puede ser sustituido por un termociclador).
- Bloque hielo o placa de frío (4° C).
- Pinzas.

4.2. FUNGIBLES

- Guantes desechables
- Tubos eppendorf de 0,2/0,5 ml libres de DNasa/RNasa.
- Puntas de pipeta con filtro.
- Solución salina (tampón PBS).

5. ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS

HPV Direct Flow CHIP se suministra en dos partes:

- Reactivos de PCR. Envío y conservación a 2-8 °C. Una vez recibido se debe conservar almacenado a -20°C, siendo estable hasta la fecha de caducidad especificada.
- Reactivos de hibridación. Envío y conservación a 2-8°C. Tanto los reactivos como los HPV CHIPs son estables hasta la fecha de caducidad especificada. No congelar. La solución de revelado debe prepararse en proporción 1:1 justo antes de su uso y no puede almacenarse una vez se han mezclado los reactivos E-1 y E-2.

6. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Durante todo el desarrollo de amplificación e hibridación es aconsejable el empleo de guantes desechables. 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 diferente a donde se realiza la reacción de PCR. Es recomendable trabajar **en áreas diferenciadas de pre- 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).

MASTER DIAGNÓSTICA

Avda. Conocimiento 100. P. T. Ciencias de la Salud 18016-Granada (España)
master@vitroweb.com www.masterdiagnostica.com

Estas áreas deben estar separadas físicamente y debe emplearse distinto material 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.

Se recomienda incluir controles negativos de amplificación que contengan todos los reactivos manejados en el kit, desde la extracción hasta la amplificación, con excepción de la muestra de ADN, con objeto de detectar y controlar cualquier posible contaminación de los reactivos con ADN tanto procedente de muestras problema como de productos amplificados. La hibridación en membrana de este control debe ser negativa, marcándose solo el *control de hibridación*. De este modo se comprueba que no existe contaminación de ADN de pacientes y/o de ADN amplificado en la zona de pre-PCR.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Todos los reactivos son suministrados en formato “listo para uso”.

Mix de PCR, antes de su primer uso:

- Descongelar el vial de mix de PCR.
- Centrifugar unos segundos el vial de Phire® Hot Start II ADN Polimerasa para decantar todo el volumen al fondo.
- Coger los 30 µl de Phire® Hot Start II ADN Polimerasa y añadir al vial de mix de PCR.
- Mezclar bien invirtiendo varias veces el vial y centrifugar unos segundos.
- Hacer alícuotas de **54 µl** en los viales de 0.2 ml que se suministran en el kit.

Estos viales se pueden almacenar a 4 °C durante una semana o bien a -20 °C durante 3 meses.

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.

7.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

HPV Direct Flow CHIP ha sido ensayado en muestras de tomas citológicas convencionales, citología en medio líquido y biopsias de tejido fresco incluido en parafina. También puede usarse partiendo de ADN purificado, aunque el sistema está optimizado para partir directamente de muestras clínicas sin previa extracción de ADN, siguiendo el protocolo que se indica a continuación para cada espécimen:

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

MASTER DIAGNÓSTICA

Avda. Conocimiento 100. P. T. Ciencias de la Salud 18016-Granada (España)
master@vitroweb.com www.masterdiagnostica.com

- Colocar la torunda o cepillo en **400 µl de tampón PBS**. Agitar la torunda dentro del tubo para que las células pasen al líquido.
- Centrifugar **1 min a 2000 rpm**, retirar el sobrenadante y resuspender el botón resultante en **25-50 µl de tampón PBS** (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 4º C o congelado a -20º C, siendo estable a 4 ºC durante una semana y a -20 ºC durante varios meses.

- **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).
- Centrifugar **1 min 2000 rpm** y descartar sobrenadante.
- Lavar las células con **400 µl de tampón PBS**, centrifugar y retirar el sobrenadante.
- Resuspender el botón resultante en **25-50 µl de tampón PBS** (dependiendo del tamaño del botón celular obtenido) para obtener una suspensión homogénea de células.
- Mezclar la muestra mediante pipeteo y tomar **5 µl** de la suspensión homogénea como templado de **ADN** para la reacción de PCR.

El volumen restante de muestra se puede almacenar a 4º C o congelado a -20º C, siendo estable a 4 ºC durante una semana, y a -20 ºC durante varios meses.

- **Secciones de tejido parafinadas.**

Para preparar las muestras de tejido fijadas en formalina tamponada e incluidas en parafina, para su uso en PCR directa, se recomienda seguir el protocolo descrito en PARAFFIN TISSUE PROCESSING KIT (Ref: MAD-003952M):

- Tomar **1-3 secciones de tejido** incluido en parafina (dependiendo del tamaño de la biopsia) de 5 µm de grosor valiéndose de unas pinzas y colocar en un tubo Eppendorf de 0,6 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 **95ºC 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**. En caso de que la sección de tejido no quede totalmente sumergida en la solución, incrementar proporcionalmente estos volúmenes hasta que el tejido quede en suspensión. Este paso es muy importante para asegurar la completa digestión del tejido.
- Incubar durante **30 min a 60ºC** seguido de **10 min a 98ºC** (se puede usar para calentar un bloque térmico o termociclador).

MASTER DIAGNÓSTICA

Nota: en el caso de muestras de gran tamaño aumentar el volumen de tampón de extracción y DNARElease proporcionalmente, hasta asegurarse de que el tejido queda completamente sumergido. Si se observa que el tejido no ha sido completamente digerido se recomienda añadir de nuevo el volumen proporcional de DNARElease e incubarse durante otros 30 min a 60°C y 10 min a 98°C.

- Centrifugar y tomar **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 4º C o congelado a -20º C, siendo estable a 4 ºC al menos durante una semana y a -20 ºC durante varios meses.

El protocolo de PCR directa no ha sido ensayado para otro tipo de muestras clínicas de partida (extensiones citológicas, biopsias en fresco 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.

7.3. REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN DE ADN VÍRICO

1. Tomar un tubo de PCR (preparado según procedimiento 7.1) por cada muestra problema y mantener en hielo, añadir a cada tubo **6 µl de muestra problema: ADN purificado, suspensión celular o material parafinado** (preparados según procedimiento 7.2).

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

1x ciclo*	98ºC	5´
5x ciclos	98ºC	5´´
	42ºC	5´´
	72ºC	10´´
45x ciclos	98ºC	5´´
	60ºC	5´´
	72ºC	10´´
	72ºC	1´
	8ºC	∞

**Si se parte de muestras de ADN purificado se recomienda reducir el tiempo inicial de desnaturalización a 30 s.*

MASTER DIAGNÓSTICA

Avda. Conocimiento 100. P. T. Ciencias de la Salud 18016-Granada (España)
 master@vitroweb.com www.masterdiagnostica.com

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 -20°C durante 1-2 días.

7.4. HIBRIDACIÓN REVERSA POR FLOW-THROUGH

Todo el proceso de hibridación, la captura de las imágenes y el análisis de los resultados se llevan a cabo automáticamente en el equipo e-BRID System™.

Antes de comenzar el proceso automático:

- Desnaturalizar los productos de PCR calentando a **95 ° C 5 min** (en termociclador) y **enfriar rápidamente en hielo** durante al menos **2 min**.
- Precalentar el **Reactivo A** a 41 °C durante al menos 20 min.
- Encender equipo e-BRID.
- Seguir las instrucciones dadas en el manual del equipo e-BRID para llevar a cabo la introducción de los datos de las muestras y el proceso de hibridación y análisis de resultados.

El protocolo de hibridación consta de los siguientes pasos:

1. Pre-hibridación con **400 µl** de **reactivo A (Solución de Hibridación)** durante **3 min** a **41°C**.
2. Eliminar el **reactivo A (Solución de Hibridación)** mediante vacío.
3. 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.
4. Incubar a **41°C** durante **5 min**.
5. Activar la bomba para eliminar los productos de PCR.
6. Lavar **3x 500 µl** con **reactivo A (Solución de Hibridación)**.
7. Fijar la temperatura en **25°C**.
8. Bloquear las membranas durante **2 min 30 s** a **25°C** con **500 µl** de **reactivo B (Solución de Bloqueo)**.
9. Activar la bomba para eliminar el reactivo.
10. Repetir los pasos 8 y 9.
11. Añadir **500 µl** de **reactivo C (Complejo estreptavidina-fosfatasa alcalina)** e incubar durante **3 min** a **25°C**.
12. Activar la bomba para eliminar el reactivo.
13. Fijar la temperatura en **36°C**.
14. Lavar las membranas **4x 500 µl** con **reactivo D (Solución de lavado I)**.
15. Revelar las membranas añadiendo **500 µl** de **reactivo E* (Solución de revelado)** e incubar **4 min** a **36°C**.
* Debe prepararse en el momento de usar, mezclando en proporción 1:1 los componentes 1 y 2 suministrados en el kit.
16. Lavar las membranas con **2x 500 µl** con **reactivo F (Solución de lavado II)**.
17. Captura automática de imágenes, análisis e informe de resultados.

MASTER DIAGNÓSTICA

Avda. Conocimiento 100. P. T. Ciencias de la Salud 18016-Granada (España)
master@vitroweb.com www.masterdiagnostica.com

8. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

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

B	33	58	42	71	16	52	B	
B	35	59	43	72	18	53	6	69
C	39	66	44/ 55	89	26	56	11	70
U	45	68	54	84	31	58	40	71
16	51	73	61	B	33	59	44/ 55	72
18	52	82	62/ 81	C	35	66	54	89
26	53	6	67	U	39	68	61	84
31	56	11	69	42	45	73	62/ 81	
	B	40	70	43	51	82	67	

"B": control de hibridación

"C": Control interno de PCR

"U": Sonda Universal screening HPV

"X": Sondas específicas para los 36 genotipos de alto y bajo riesgo

Todas las sondas están duplicadas para garantizar la fiabilidad en la interpretación 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.

Control de calidad: Tras el revelado de las membranas debe aparecer una señal intensa en la posición de *control de hibridación (B)* que sirve como control de calidad del proceso de detección, indicando que los reactivos de hibridación y revelado ha funcionado correctamente. Si no aparece señal indicará que ha habido un fallo durante el proceso de hibridación o algún reactivo no se ha usado correctamente.

Además, todas las muestras en donde el ADN problema se haya amplificado correctamente tendrán una señal positiva en el *control interno de PCR (C)*. Si el control no funciona puede deberse a que:

MASTER DIAGNÓSTICA

Avda. Conocimiento 100. P. T. Ciencias de la Salud 18016-Granada (España)
 master@vitroweb.com www.masterdiagnostica.com

- No se ha incluido la muestra problema para realizar la amplificación.
- Se ha partido de una cantidad muy pequeña de muestra. Conviene repetirlo con una mayor cantidad de muestra.
- El tejido no ha sido fijado en condiciones adecuadas, con lo cual el rendimiento así como la calidad del ADN son muy bajas.

Las muestras que sean positivas para HPV deben dar señal para la sonda *HPV Universal (U)* de screening de HPV y para la sonda específica de uno o varios genotipos, además debe aparecer la señal de control de hibridación **(B)** y la señal de control interno de PCR **(C)**.

Algunas muestras positivas podrían mostrar positividad para el control de hibridación, control interno de PCR y HPV universal, pero ninguna señal para los tipos específicos de HPV, indicando que la muestra es positiva para infección por un HPV que no se ha podido identificar el genotipo con el panel de sondas específicas incluidas en el CHIP HPV.

La especificidad de la sonda universal varía para cada genotipo. En el caso de algunos subtipos de los genotipos detectados (como en el caso del HPV 6) se ha observado que la señal de la sonda universal puede aparecer más débil que en otros subtipos, debiendo considerarse en cualquier modo como positivo para HPV.

Cuando las muestras sean negativas para HPV presentarán una señal positiva para el control de hibridación y para el control interno de PCR.

9. REPRODUCIBILIDAD DE HPV Direct Flow CHIP

Negatividad de las muestras. Se tomaron muestras de pacientes que se habían analizado mediante PCR directa con el sistema **HPV Direct Flow CHIP** y que habían resultado negativas para infección de HPV. Se repitieron los ensayos con el mismo método **HPV Direct Flow CHIP** y se demostró un 100% de reproducibilidad, resultando todas las muestras nuevamente negativas. Además, se analizaron casos que habían resultado negativos para HPV utilizando los dos tipos de ADN de partida posible (PCR directa y PCR con previa extracción y purificación del ADN), comprobándose también la reproducibilidad en resultados negativos con o sin extracción y purificación del ADN de partida.

Positividad de las muestras. Se comprueba que la reproducibilidad de los ensayos es del 100%. Para ello se llevaron a cabo ensayos independientes de muestras positivas para HPV 16 o 18. Además, se tomó una mezcla de muestras con los HPVs 16, 18, 31, 52, 45, 59, 73, 6, 40 y 42 y se analizó 135 veces en experimentos independientes, siendo los resultados 100% reproducibles.

MASTER DIAGNÓSTICA

10. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD ANALÍTICA DE HPV Direct Flow CHIP

Sensibilidad analítica: se calculó el límite de detección del kit para cada uno de los HPV analizados. La determinación del número mínimo de copias víricas detectadas se realizó mediante diluciones seriadas de amplicones específicos de cada genotipo en un background de 20 ng de ADN genómico. De este modo se concluye que el test tiene una sensibilidad de 1-10 copias víricas.

Especificidad analítica: se comprobó que las señales obtenidas son específicas, no cruzan con otros tipos de HPV. También se ensayó la ausencia de reacciones cruzadas con Herpes genitales, *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis* con las sondas del panel HPV CHIP.

11. RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Problemas	Soluciones
No se observa ninguna señal/ no hay señal de hibridación	Comprobar que se han añadido todos los reactivos de hibridación en el orden correcto. Si se ha descontaminado las superficies con lejía puede haberse destruido el ADN. Limpiar con agua destilada abundante y repetir el experimento.
No hay señal de control de amplificación	Insuficiente cantidad de muestra y/o presencia de inhibidores de PCR. Repetir la PCR variando la cantidad de muestra. En el caso de parafinas, si la muestra de partida es muy grande puede haber resultado insuficiente la digestión realizada. Añadir de nuevo DNA release a la muestra e incubar 30 min a 60°C y 10 min a 98°C.
Presencia de HPV en control negativo	Problemas de contaminación en la zona pre-PCR o cambio de muestras en la zona post-PCR. Descontaminar (lejía 1%) las áreas de trabajo y repetir PCR e hibridación.
Formación de precipitados durante la hibridación	Preparar una nueva mezcla de sustrato mezclando los reactivos E1 y E2 (1:1) justo antes de su uso.
Señales débiles en la hibridación	Comprobar la caducidad de los reactivos, la conservación de mezcla de PCR y reactivos, temperaturas y tiempos de hibridación y calidad de las muestras. En el caso de parafinas, si la muestra de partida es muy grande puede haber resultado insuficiente la digestión realizada. Añadir de nuevo DNA release a la muestra e incubar 30 min a 60°C y 10 min a 98°C.

MASTER DIAGNÓSTICA

12. BIBLIOGRAFÍA

- 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.