

# Prueba *digene*<sup>®</sup> HC2 HPV DNA

## Instrucciones de uso

IVD



Ensayo de hibridación de ácidos nucleicos *in vitro* con amplificación de la señal que utiliza la quimioluminiscencia en microplaca para la detección cualitativa del ADN de 18 tipos de bajo riesgo y de alto riesgo del virus del papiloma humano (VPH) en muestras cervicouterinas

### Para utilizar con:

Dispositivo *digene* HC2 DNA Collection Device

*digene* Specimen Transport Medium

Solución Hologic PreservCyt<sup>®</sup>

Solución conservante BD SurePath<sup>®</sup>



5196-1330



QIAGEN

19300 Germantown Road  
Germantown, MD 20874  
Estados Unidos



QIAGEN GmbH  
QIAGEN Strasse 1  
40724 Hilden  
ALEMANIA

L2126es Rev. 4





## ÍNDICE

<b>NOMBRE Y USO PREVISTO</b> .....	<b>1</b>
<b>RESUMEN Y EXPLICACIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO</b> .....	<b>4</b>
<b>REACTIVOS Y MATERIALES SUMINISTRADOS</b> .....	<b>5</b>
<b>MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO</b> .....	<b>6</b>
<b>ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES</b> .....	<b>8</b>
PRECAUCIONES DE SEGURIDAD .....	8
FRASES SOBRE SEGURIDAD Y RIESGO EN RELACIÓN CON LOS COMPONENTES .....	8
PRECAUCIONES DE USO.....	10
<b>PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS REACTIVOS</b> .....	<b>12</b>
<b>RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE LAS MUESTRAS</b> .....	<b>16</b>
MUESTRAS CERVICOUTERINAS EN STM .....	16
BIOPSIAS CERVICOUTERINAS.....	16
MUESTRAS CERVICOUTERINAS RECOGIDAS EN SOLUCIÓN PRESERVCYT .....	16
MUESTRAS CERVICOUTERINAS RECOGIDAS EN SOLUCIÓN CONSERVANTE SUREPATH .....	17
<b>PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA</b> .....	<b>18</b>
ANÁLISIS DE VOLÚMENES ALTOS DE MUESTRAS CON EL SISTEMA RAPID CAPTURE SYSTEM .....	18
MÉTODO MANUAL .....	18
DESNATURALIZACIÓN .....	19
AGITACIÓN VORTICIAL Y DESNATURALIZACIÓN .....	23
HIBRIDACIÓN: MÉTODOS DE CÓCTEL DE SONDAS COMBINADAS (CPC) Y DE DOS SONDAS.....	26
CAPTURA DE LOS HÍBRIDOS .....	29
DETECCIÓN DE LOS HÍBRIDOS .....	30
LAVADO .....	30
AMPLIFICACIÓN DE LA SEÑAL.....	31
<b>CRITERIOS PARA VERIFICAR LA CALIBRACIÓN DEL ENSAYO</b> .....	<b>33</b>
<b>CÁLCULO DEL VALOR DE CORTE</b> .....	<b>36</b>
<b>CONTROL DE CALIDAD</b> .....	<b>37</b>
<b>INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LAS MUESTRAS</b> .....	<b>38</b>
<b>CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO</b> .....	<b>39</b>
DATOS QUE RESPALDAN LA INDICACIÓN PARA EL VPH DE BAJO RIESGO Y DE ALTO RIESGO.....	39
DATOS QUE RESPALDAN LA INDICACIÓN PARA EL CRIBADO PRIMARIO DEL VPH DE ALTO RIESGO ...	43
SENSIBILIDAD ANALÍTICA.....	46
RENDIMIENTO DEL CÓCTEL DE SONDAS COMBINADAS (CPC) .....	47
EQUIVALENCIA ENTRE LAS MUESTRAS RECOGIDAS EN STM Y LAS MUESTRAS RECOGIDAS EN SOLUCIÓN PRESERVCYT .....	47
CORRELACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LAS MUESTRA RECOGIDA EN SUREPATH CON LOS RESULTADOS DE LAS MUESTRAS RECOGIDAS EN STM EN UNA POBLACIÓN CLÍNICA.....	47
REPRODUCIBILIDAD .....	48
SONDA DE VPH DE ALTO RIESGO.....	49
<b>REACTIVIDAD CRUZADA</b> .....	<b>50</b>
PANEL DE REACTIVIDAD CRUZADA.....	50
HIBRIDACIÓN CRUZADA .....	51
EFECTO DE LA SANGRE Y DE OTRAS SUSTANCIAS SOBRE LAS MUESTRAS RECOGIDAS EN STM .....	51
EFECTO DE LA SANGRE Y DE OTRAS SUSTANCIAS EN LAS MUESTRAS RECOGIDAS EN SOLUCIÓN PRESERVCYT .....	51
REPRODUCIBILIDAD DE LA PRUEBA <i>DIGENE</i> HC2 HPV DNA CON MUESTRAS CLÍNICAS RECOGIDAS EN STM.....	52
RLU/CO .....	52
REPRODUCIBILIDAD DE LA PRUEBA <i>DIGENE</i> HC2 HPV DNA CON MUESTRAS CLÍNICAS RECOGIDAS EN SOLUCIÓN PRESERVCYT .....	53
RLU/CO .....	53
REPRODUCIBILIDAD DE LA PRUEBA <i>DIGENE</i> HC2 HIGH-RISK HPV DNA CON MUESTRAS RECOGIDAS EN SOLUCIÓN CONSERVANTE SUREPATH .....	54

REPRODUCIBILIDAD DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON MUESTRAS RECOGIDAS EN SUREPATH CUANDO SE UTILIZA EL RAPID CAPTURE SYSTEM PARA EL PROCESAMIENTO DEL ENSAYO.....	54
<b>LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO .....</b>	<b>56</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>58</b>
<b>GUÍA PARA LA RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS.....</b>	<b>61</b>
COMPROBACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN .....	65
<b>INFORMACIÓN DE CONTACTO DE QIAGEN .....</b>	<b>67</b>

## NOMBRE Y USO PREVISTO

Para uso diagnóstico *in vitro*.

La prueba *digene* HC2 HPV DNA con la tecnología Hybrid Capture<sup>®</sup> 2 (HC2) es un ensayo de hibridación de ácidos nucleicos mediante amplificación de la señal y uso de quimioluminiscencia en microplaca para la detección cualitativa del ADN de 18 tipos de bajo riesgo y de alto riesgo del VPH en muestras cervicouterinas.

Las muestras cervicouterinas que pueden analizarse con la prueba *digene* HC2 HPV DNA son las siguientes:

- Muestras recogidas con el dispositivo *digene* HC2 DNA Collection Device.
- Muestras recogidas con un dispositivo de recogida de tipo cepillo o con una combinación de escobillón/espátula y colocadas en la solución PreservCyt (consulte las instrucciones de uso del kit *digene* HC2 Sample Conversion si desea obtener información completa).
- Muestras recogidas en solución conservante SurePath (solamente para el análisis de ADN de VPH de alto riesgo).
- Biopsias recogidas en *digene* Specimen Transport Medium (STM, medio de transporte de muestras).

Cuando se utilizan las sondas de VPH de bajo riesgo y de alto riesgo, la utilización de esta prueba está indicada:

- Para facilitar el diagnóstico de las infecciones de transmisión sexual por los tipos de VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68.
- Para diferenciar entre dos grupos de ADN del VPH: los tipos de bajo riesgo del VPH 6, 11, 42, 43 y 44 y los tipos de alto riesgo del VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68; sin embargo, no puede determinarse el tipo de VPH específico presente.

Cuando se utiliza la sonda de VPH de alto riesgo, la utilización de esta prueba está indicada:

- Para la detección de los tipos de alto riesgo del VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68, que se ha comprobado que son el principal factor causal para el desarrollo de cáncer de cuello uterino.
- Como prueba de cribado inicial para la población general, con o sin una citología cervicovaginal (prueba de Papanicoláu), para identificar a las mujeres que presentan un mayor riesgo de desarrollo de cáncer de cuello uterino o de presencia de enfermedad cervicouterina de alto grado. A medida que aumenta la edad, el diagnóstico del VPH es progresivamente indicativo de enfermedad cervicouterina.
- Como prueba de seguimiento para pacientes con resultados anormales en una citología cervicovaginal previa o con enfermedad cervicouterina, para determinar la necesidad de solicitar una colposcopia u otros procedimientos de seguimiento.
- Como prueba de seguimiento para pacientes con resultados de lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LSIL, *low-grade squamous intraepithelial lesion*) o lesión intraepitelial escamosa de alto grado (HSIL, *high-grade squamous intraepithelial lesion*) en la citología cervicovaginal antes de la colposcopia. En estas pacientes, el resultado de la prueba *digene* HC2 HPV DNA ayudará al médico en el tratamiento de la paciente al facilitar la evaluación del riesgo para determinar la ausencia de enfermedad de alto grado.

La prueba *digene* HC2 HPV DNA debe utilizarse junto con la información clínica obtenida por medio de otras pruebas diagnósticas y de cribado, las exploraciones físicas y los antecedentes médicos completos de acuerdo con los procedimientos de atención al paciente adecuados. Los resultados de la prueba

*digene* HC2 HPV DNA **no deben** utilizarse de forma aislada para la evaluación clínica y el tratamiento de las pacientes.

## RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La presencia de ciertos tipos de VPH en el aparato genital femenino se asocia a diversas enfermedades, tales como el condiloma, la papulosis bowenoide y los carcinomas y neoplasias intraepiteliales cervicouterinos, vaginales y vulvares<sup>1-3</sup>. Generalmente se acepta que estos virus se transmiten principalmente por contacto sexual y que los tipos de alto riesgo del VPH son el factor de riesgo conocido principal del desarrollo de cáncer cervicouterino<sup>4-8</sup>.

El virus del papiloma humano está formado por una partícula viral icosaédrica (virión) que contiene una molécula circular de ADN de doble cadena con 8000 pares de bases, cubierta por una cápside de proteínas. Tras la infección de las células epiteliales, el ADN viral se establece en todo el espesor del epitelio, aunque únicamente hay viriones intactos en las capas superiores del tejido. Por tanto, el ADN viral puede encontrarse en viriones o en forma de secuencias episómicas o integradas del VPH, según el tipo y el grado de la lesión.

Hasta la fecha no se puede cultivar el VPH *in vitro*, y las pruebas inmunológicas son insuficientes para determinar la presencia de infección cervicouterina por el VPH. Pueden obtenerse datos indirectos de infección anogenital por el VPH mediante la exploración física y por la presencia de alteraciones celulares características asociadas a replicación viral en muestras de biopsia o para la citología cervicovaginal. También pueden analizarse las muestras de biopsia mediante hibridación de ácidos nucleicos para detectar directamente la presencia de ADN del VPH.

Históricamente se ha considerado que los tipos 16 y 18 del VPH se asocian a un riesgo alto de cáncer y que los tipos 6 y 11 del VPH se asocian a un riesgo bajo de cáncer<sup>8-10</sup>. Posteriormente se ha demostrado que los tipos 31, 33 y 35 del VPH tienen una asociación intermedia con el cáncer<sup>2,11-14</sup>. A pesar de esta útil base conceptual, estos 7 tipos del VPH únicamente son responsables de aproximadamente el 70% de las neoplasias cervicouterinas<sup>9-11</sup>. Se han identificado otros tipos de VPH, tales como los tipos 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68, como los principales tipos de VPH detectables en las lesiones restantes<sup>15-20,32-36</sup>. Estos tipos de VPH también pueden clasificarse en grupos de riesgo bajo, riesgo intermedio y riesgo alto según su distribución relativa en diversas categorías de diagnóstico histopatológico<sup>21, 32-37</sup>.

Se ha demostrado la presencia de ADN del VPH en aproximadamente el 10% de las mujeres que tienen un epitelio cervicouterino normal, pero la prevalencia real en grupos específicos de mujeres depende en gran medida de la edad y de otras variables demográficas<sup>2,10,21,31</sup>. Estudios prospectivos han demostrado que en el 15-28% de las mujeres con un resultado positivo en el análisis de ADN del VPH se desarrollaron lesiones intraepiteliales escamosas (SIL, *squamous intraepithelial lesions*) en los 2 años siguientes en comparación con únicamente el 1.3% de las mujeres con un resultado negativo en dicho análisis<sup>22,23</sup>. En particular, el riesgo de progresión fue mayor para los tipos 16 y 18 del VPH (aproximadamente el 40%) que para otros tipos del VPH<sup>22</sup>.

## PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

La prueba *digene* HC2 HPV DNA, que utiliza la tecnología HC2, es un ensayo de hibridación con captura de anticuerpos y amplificación de la señal que utiliza la detección por quimioluminiscencia en microplaca. Las muestras que contienen el ADN diana se hibridan con una sonda específica de ARN del VPH. Los híbridos de ADN:ARN resultantes se capturan en la superficie de los pocillos de una microplaca, recubiertos con anticuerpos específicos para los híbridos de ADN:ARN. A continuación, los híbridos inmovilizados reaccionan con anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina, específicos para los híbridos de ADN:ARN, y se detectan mediante un sustrato quimioluminiscente. Cada anticuerpo se conjuga con varias moléculas de fosfatasa alcalina. Múltiples anticuerpos conjugados se unen a cada híbrido capturado, lo cual da lugar a una amplificación sustancial de la señal. A medida que la fosfatasa alcalina unida degrada el sustrato, se emite luz que se mide en unidades relativas de luz (RLU, *relative light units*) en un luminómetro. La intensidad de la luz emitida indica la presencia o ausencia del ADN diana en la muestra.

Una determinación de RLU igual o superior al valor de corte indica la presencia de secuencias de ADN del VPH en la muestra. Una determinación de RLU inferior al valor de corte indica la ausencia de las secuencias específicas de ADN del VPH analizadas o la presencia de niveles de ADN del VPH inferiores al límite de detección del ensayo.

Puede realizarse un análisis de un volumen alto de muestras con la prueba *digene* HC2 HPV DNA utilizando el sistema Rapid Capture<sup>®</sup> System (RCS). Este instrumento puede procesar hasta 352 muestras en ocho horas. Para poder analizar un volumen elevado de muestras, el sistema RCS realiza todas las etapas del ensayo excepto la desnaturalización de la muestra, la detección de la señal quimioluminiscente y la generación del informe de los resultados.



## REACTIVOS Y MATERIALES SUMINISTRADOS

El kit *digene* HC2 HPV DNA (ref. 5196-1330) permite realizar 96 pruebas. El número de resultados de paciente variará en función del número de usos del kit:

1 uso = 40 resultados de paciente (bajo riesgo y alto riesgo)

2 usos = 32 resultados de paciente (bajo riesgo y alto riesgo)

1 x 0,35 ml **Tinte indicador**

Contiene azida sódica al 0,05% p/v.

1 x 50 ml **Reactivo de desnaturalización**

Solución diluida de hidróxido de sodio (NaOH).

1 x 5 ml **Diluyente de sonda**

Solución tamponada con azida sódica al 0,05% p/v.

1 x 150 µl **Sonda de VPH de bajo riesgo**

Sonda de ARN del VPH 6/11/42/43/44 en solución tamponada (tapa verde).

1 x 100 µl **Sonda de VPH de alto riesgo**

Sonda de ARN del VPH 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68 en solución tamponada (tapa roja).

1 x 1 ml **Control de calidad para VPH de bajo riesgo**

5 pg/ml (500.000 copias/ml) de ADN del VPH 6 clonado y ADN transportador en medio STM con azida sódica al 0,05% p/v.

1 x 1 ml **Control de calidad para VPH de alto riesgo**

5 pg/ml (500.000 copias/ml) de ADN del VPH 16 clonado y ADN transportador en medio STM con azida sódica al 0,05% p/v.

1 x 2,0 ml **Calibrador negativo**

ADN transportador en medio STM con azida sódica al 0,05% p/v.

1 x 1,0 ml **Calibrador para VPH de bajo riesgo**

1 pg/ml de ADN del VPH 11 clonado y ADN transportador en medio STM con azida sódica al 0,05% p/v.

1 x 1,0 ml **Calibrador para VPH de alto riesgo**

1 pg/ml de ADN del VPH 16 clonado y ADN transportador en medio STM con azida sódica al 0,05% p/v.

1 x 1 **Microplaca de captura**

Recubierta con anticuerpos anti-híbridos de ARN:ADN.

1 x 12 ml **Reactivo de detección 1**

Anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina contra los híbridos de ARN:ADN en solución tamponada con azida sódica al 0,05% p/v.

1 x 12 ml **Reactivo de detección 2**

CDP-Star<sup>®</sup> con Emerald II (sustrato quimioluminiscente).

1 x 100 ml **Tampón de lavado concentrado**

Contiene azida sódica al 1,5% (p/v)

## MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

### Equipo y accesorios para diagnóstico *in vitro* con el sistema Hybrid Capture System<sup>A</sup>

*digene* Hybrid Capture 2 System ("sistema *digene* HC2"), formado por un luminómetro aprobado por QIAGEN ("instrumento DML"), un ordenador personal y dispositivos periféricos informáticos (monitor, teclado, ratón, impresora y cable de la impresora) aprobados por QIAGEN, software del sistema *digene* HC2 ("software de análisis de ensayos *digene*"), protocolos de ensayo para el VPH para el sistema *digene* HC2, software LumiCheck Plate y el manual del usuario del software del sistema *digene* HC2 (*digene HC2 System Software User Manual*)

Hybrid Capture System Rotary Shaker I  
Hybrid Capture System Microplate Heater I  
Hybrid Capture System Automated Plate Washer  
Hybrid Capture System Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 (opcional)<sup>B</sup>  
Gradilla de conversión con tapa de gradilla (opcional)  
Gradilla de muestras con tapa de gradilla *digene* (opcional)  
Pipeta EXPAND-4 y soporte (opcional)<sup>C</sup>  
Dispositivo *digene* HC2 DNA Collection Device<sup>D</sup>  
Dispensador de láminas selladoras de tubos y dispositivo de corte (opcional, se utiliza con el MST Vortexer 2)

Rapid Capture System (opcional para análisis de volúmenes altos de muestras)<sup>E</sup>  
Aparato de lavado  
Microplacas de hibridación  
Tapas para microplacas  
Tiras de microplaca vacías (distribuidas por Costar, modelo 2581); opcional para uso con el Automated Plate Washer  
Puntas de pipeta extralargas para extracción de muestras  
Tubos de recogida de muestras  
Gradilla para tubos de recogida de muestras  
Tapas de rosca para tubos de recogida de muestras  
Depósitos desechables para reactivos  
Lámina selladora de tubos DuraSeal<sup>TM</sup>  
Microtubos de hibridación  
Gradilla para microtubos  
Selladores de placas

### Equipo y accesorios de uso general en el laboratorio

Baño María a  $65 \pm 2$  °C de tamaño suficiente para admitir una gradilla de conversión (36 x 21 x 9 cm) o gradillas de muestras  
Microcentrifugadora (opcional, para centrifugar los viales de sonda con el fin de obtener el máximo volumen de la sonda)  
Mezclador vorticial con accesorio cóncavo  
Micropipeta monocal; ajustes variables para volúmenes de 20-200  $\mu$ l y de 200-1.000  $\mu$ l  
Pipeta repetidora de desplazamiento positivo, como la pipeta Eppendorf<sup>®</sup> Repeater<sup>®</sup> o una pipeta equivalente  
Pipeta de 8 canales; ajustes variables para volúmenes de 25-200  $\mu$ l  
Reloj temporizador  
Solución de hipoclorito sódico al 5% v/v (o lejía de uso doméstico)  
Parafilm<sup>®</sup> o equivalente  
Puntas de pipeta desechables resistentes a aerosoles para pipeta monocal (volúmenes de 20-200  $\mu$ l y de 200-1.000  $\mu$ l)  
Puntas desechables para pipeta Eppendorf Repeater (de 25 y 500  $\mu$ l)  
Puntas desechables para pipeta de 8 canales (de 25 a 200  $\mu$ l)  
Toallitas Kimtowels<sup>®</sup> u hojas de papel absorbente sin pelusa equivalentes  
Funda desechable para la mesa de trabajo  
Guantes sin talco  
Tubos de polipropileno de fondo redondeado y cierre por presión de 5 ml y/o 15 ml (para la dilución de la sonda)  
Tubos de polipropileno de 2,0 ml para microcentrifugadora con tapas

### Equipo y accesorios adicionales para el procesamiento de muestras recogidas en solución PreservCyt

Centrifugadora de rotor basculante con capacidad para alcanzar  $2.900 \pm 150$  x g y alojar tubos cónicos de polipropileno de 10 ml o 15 ml para centrifugadora  
Pipetas serológicas o de transferencia de 5 ml  
Kit *digene* HC2 Sample Conversion<sup>A</sup>  
Puntas desechables para pipeta Eppendorf Repeater (de 50 y 100  $\mu$ l)

#### Para el procedimiento de agitación vorticial manual:

Tubos *digene* HC2 Sample Conversion (tubos cónicos de 15 ml)<sup>F</sup>, tubos cónicos Sarstedt de 10 ml con tapas o tubos de polipropileno de fondo cónico de 15 ml para centrifugadora con tapas de las marcas VWR<sup>®</sup> o Corning<sup>®</sup>  
Gradilla para tubos cónicos de 10 ml o 15 ml

#### Para el procedimiento del Multi-Specimen Tube Vortexer 2

Tubos *digene* HC2 Sample Conversion (tubos cónicos de 15 ml)<sup>F</sup>  
Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2  
Gradilla de conversión con tapa (específicas para tubos cónicos de 15 ml)  
Dispensador de láminas selladoras de tubos y dispositivo de corte  
Lámina selladora de tubos DuraSeal (se utiliza con el MST Vortexer 2)

### Equipo y accesorios adicionales para el procesamiento de muestras recogidas en solución conservante SurePath

Centrifugadora de rotor basculante con capacidad para alcanzar  $800 \pm 15$  x g y alojar tubos cónicos de polipropileno de 15 ml para centrifugadora  
Tubos *digene* HC2 Sample Conversion (tubos cónicos de 15 ml)<sup>F</sup>  
Pipetas de transferencia de punta convencional de 7 ml o equivalentes  
Medio Specimen Transport Medium de QIAGEN  
Puntas desechables para pipeta Eppendorf Repeater (de 100  $\mu$ l)

<sup>A</sup> QIAGEN únicamente pone a su disposición equipos y accesorios validados con la prueba *digene* HC2 HPV DNA.

- <sup>B</sup> Necesario también si se realiza la aplicación RCS semiautomática.
- <sup>C</sup> Elemento personalizado. Pueden utilizarse otras pipetas multicanal expansibles personalizadas siempre que pueda conseguirse una separación de las puntas de 3,2 cm en expansión. También puede utilizarse una pipeta monocanal capaz de dispensar 75 µl.
- <sup>D</sup> Las características de rendimiento de la prueba *digene* HC2 HPV DNA se establecieron únicamente con los kits de recogida indicados.
- <sup>E</sup> Consulte el manual del usuario del Rapid Capture System (*Rapid Capture System User Manual*) si desea ver instrucciones específicas para el uso de ese sistema para el análisis de volúmenes altos de muestras con este ensayo.
- <sup>F</sup> Deben utilizarse los tubos *digene* HC2 Sample Conversion (de las marcas VWR o Corning<sup>®</sup>) que QIAGEN pone a su disposición para garantizar un rendimiento adecuado del ensayo si se utiliza el procedimiento del Multi-Specimen Tube Vortexer 2.

## ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

LEA DETENIDAMENTE TODAS LAS INSTRUCCIONES ANTES DE UTILIZAR LA PRUEBA.

### PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

TODAS LAS MUESTRAS deben considerarse potencialmente infecciosas. Ningún método de análisis conocido puede ofrecer una garantía completa de que las muestras no transmitirán ninguna infección. Se recomienda manipular las muestras humanas conforme a las directrices nacionales y locales pertinentes en materia de bioseguridad. Siga estas directrices sobre bioseguridad con los materiales que contengan o que se sospeche que contienen agentes infecciosos. Estas precauciones son, entre otras, las siguientes:

1. No use la boca para pipetear.
2. No fume, coma ni beba en áreas en las que se manipulen reactivos o muestras.
3. Use guantes desechables sin talco al manipular reactivos o muestras. Lávese bien las manos después de realizar la prueba.
4. Limpie y desinfecte todos los derrames de muestras con un desinfectante para tuberculosis, como hipoclorito sódico al 0,5% v/v u otro desinfectante adecuado.<sup>42,43</sup>
5. Descontamine y deseche todas las muestras, reactivos y otros materiales potencialmente contaminados de acuerdo con las normativas nacionales y locales.

Algunos reactivos contienen azida sódica. Se ha informado de que la azida sódica forma azida de plomo o de cobre en las tuberías de los laboratorios. Estas azidas pueden explotar si son sometidas a percusión, como al martillar. Para impedir la formación de azida de plomo o de cobre, vierta abundante agua en los desagües después de desechar por ellos soluciones que contengan azida sódica. Para eliminar la contaminación de tuberías antiguas que se sospeche que acumulan azidas, la US Occupational Safety and Health Administration recomienda lo siguiente: (1) extraiga el líquido utilizando un tubo de goma o plástico como sifón, (2) llene la tubería con una solución de hidróxido de sodio al 10% v/v, (3) deje el hidróxido de sodio en la tubería durante 16 horas y (4) aclare con abundante agua.

### Análisis automatizado con el sistema RCS

Consulte el manual del usuario del Rapid Capture System (*Rapid Capture System User Manual*) si desea ver advertencias y precauciones específicas adicionales sobre el uso de ese sistema para el análisis de volúmenes altos de muestras con este ensayo.

### FRASES SOBRE SEGURIDAD Y RIESGO EN RELACIÓN CON LOS COMPONENTES

Las siguientes frases sobre riesgo y seguridad son aplicables a los componentes del kit *digene* HC2 HPV DNA Test:

#### Tampón de lavado concentrado



Contiene: Azida sódica. ¡Advertencia! Nocivo por ingestión. Peligroso para la vida acuática con efectos duraderos. Evítese su liberación al medio ambiente. Deséchese el contenido/recipiente en un centro de eliminación de residuos autorizado.

#### Reactivo de desnaturalización



Contiene: hidróxido de sodio. ¡Peligro! Provoca quemaduras graves en la piel y daños en los ojos. Puede ser corrosivo para los metales. Deséchese el contenido/recipiente en un centro de eliminación de residuos autorizado. EN CASO

DE AFECTACIÓN DE LOS OJOS: Lávense con cuidado con agua durante varios minutos. Si se llevan lentes de contacto, quítense si resulta sencillo. Continúese el lavado de los ojos. EN CASO DE AFECTACIÓN DE LA PIEL (o del cabello): Quítense inmediatamente la ropa manchada o salpicada. Lávese la piel con agua o dúchese. Llámese inmediatamente a un CENTRO DE INTOXICACIONES o a un médico. Guárdese bajo llave. Úsense indumentaria y guantes protectores y protección para los ojos/la cara.

#### **Diluyente de sonda**



Contiene: ácido acético, ácido poliacrílico. ¡Peligro! Provoca quemaduras graves en la piel y daños en los ojos. Deséchese el contenido/recipiente en un centro de eliminación de residuos autorizado. EN CASO DE AFECTACIÓN DE LOS OJOS: Lávense con cuidado con agua durante varios minutos. Si se llevan lentes de contacto, quítense si resulta sencillo. Continúese el lavado de los ojos. EN CASO DE AFECTACIÓN DE LA PIEL (o del cabello): Quítense inmediatamente la ropa manchada o salpicada. Lávese la piel con agua o dúchese. Llámese inmediatamente a un CENTRO DE INTOXICACIONES o a un médico. Guárdese bajo llave. Úsense indumentaria y guantes protectores y protección para los ojos/la cara.

#### **Calibrador para VPH de alto riesgo**

¡Advertencia! Causa irritación leve de la piel. En caso de irritación de la piel: Acúdase a un médico.

#### **Calibrador para VPH de bajo riesgo**

¡Advertencia! Causa irritación leve de la piel. En caso de irritación de la piel: Acúdase a un médico.

#### **Control de calidad para VPH de alto riesgo**

¡Advertencia! Causa irritación leve de la piel. En caso de irritación de la piel: Acúdase a un médico.

#### **Control de calidad para VPH de bajo riesgo**

¡Advertencia! Causa irritación leve de la piel. En caso de irritación de la piel: Acúdase a un médico.


#### **Calibrador negativo**

¡Advertencia! Causa irritación leve de la piel. En caso de irritación de la piel: Acúdase a un médico.

#### **Información adicional**


Fichas de datos de seguridad: [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)

## PRECAUCIONES DE USO

1. Para uso diagnóstico *in vitro*.
2. El cepillo cervicouterino está indicado para utilizarse exclusivamente en mujeres que no estén embarazadas.
3. No use los reactivos después de la fecha de caducidad indicada junto al símbolo  en la etiqueta de la caja externa.
4. Si se realiza el ensayo fuera de los plazos de tiempo y de los intervalos de temperatura indicados, pueden obtenerse resultados no válidos. Los ensayos no realizados dentro de los plazos de tiempo y de los intervalos de temperatura establecidos no son válidos y deben repetirse.
5. Deben seguirse meticulosamente el procedimiento, los criterios de verificación de la calibración del ensayo, el control de calidad y la interpretación de los resultados de las muestras de la prueba *digene* HC2 HPV DNA para obtener resultados fiables.
6. Es importante pipetear el volumen exacto de reactivos indicado y mezclar bien después de añadir cada reactivo. De lo contrario, los resultados de la prueba podrían ser erróneos. Comprobar que tienen lugar los cambios de color señalados confirmará que se han cumplido estas condiciones.
7. Los componentes del kit se han comprobado como conjunto. **No** intercambie componentes de otras fuentes o de lotes diferentes.
8. Los ácidos nucleicos son muy sensibles a la degradación por las nucleasas ambientales. Las nucleasas están presentes en la piel humana y en superficies y materiales manipulados por el ser humano. Limpie y cubra las superficies de trabajo con una funda desechable para la mesa de trabajo **y use guantes sin talco al realizar todos los pasos del ensayo**.
9. Asegúrese de prevenir la contaminación de la microplaca de captura y del reactivo de detección 2 con fosfatasa alcalina exógena durante la realización del ensayo. Las sustancias que pueden contener fosfatasa alcalina son, entre otras, el reactivo de detección 1, bacterias, la saliva, el pelo y la grasa de la piel. **Es especialmente importante cubrir la microplaca de captura después del paso de lavado y durante la incubación con el reactivo de detección 2 debido a que la fosfatasa alcalina exógena puede reaccionar con el reactivo de detección 2 y producir resultados positivos falsos.**
10. Proteja el reactivo de detección 2 de una exposición prolongada a la luz directa. Use el reactivo de detección 2 justo después de dispensar las alícuotas y evite su exposición a la luz directa del sol.
11. La pipeta repetidora debe cebarse antes de dispensar el reactivo y se debe comprobar periódicamente que no haya burbujas de aire grandes. Una cantidad excesiva de burbujas grandes de aire en la punta de la pipeta repetidora podría causar una dispensación incorrecta; esto puede evitarse llenando la pipeta, dispensando todo el líquido y llenándola de nuevo. Consulte las instrucciones de uso específicas en el manual de instrucciones suministrado por el proveedor de la pipeta.
12. El pipeteo multicanal debe realizarse utilizando la técnica de pipeteo inverso (consulte *Detección de los híbridos*) para dispensar los reactivos de detección 1 y 2. Compruebe que el ajuste y el llenado de todas las puntas de pipeta de la pipeta multicanal son correctos.
13. Asegúrese de lavar minuciosamente cada pocillo de la microplaca según se indica en las instrucciones para el lavado manual. Un lavado inadecuado causará un aumento del fondo y podría provocar resultados positivos falsos. La presencia de tampón de lavado residual en los pocillos puede causar una reducción de la señal o una reproducibilidad deficiente.
14. Deje transcurrir al menos 60 minutos para que el Hybrid Capture System Microplate Heater I se estabilice a  $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  desde un inicio en frío. Si no se respeta este período de calentamiento, podría producirse la desnaturalización de la microplaca de hibridación. Consulte el manual del

usuario del Microplate Heater I (*Microplate Heater I User Manual*) si desea obtener información detallada.

## PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS REACTIVOS

1. Al recibir el kit, guárdelo a una temperatura de 2 °C a 8 °C. El tampón de lavado concentrado, el reactivo de desnaturalización y el tinte indicador pueden conservarse a una temperatura de 2 °C a 30 °C, según se desee.
2. No utilice el kit después de la fecha de caducidad indicada junto al símbolo  en la etiqueta de la caja o de la fecha de caducidad de los reactivos preparados (véase más adelante).
3. Todos los reactivos están listos para usar, con excepción del reactivo de desnaturalización, las sondas de VPH de alto y bajo riesgo y el tampón de lavado concentrado.

Para determinar la presencia de cualquiera de los 18 tipos del VPH en las muestras se ha proporcionado un método de cóctel de sondas combinadas (CPC, *Combined-Probe Cocktail*). Para realizar la prueba con esta opción, debe prepararse un cóctel de sondas combinadas mezclando la mezcla de la sonda de VPH de bajo riesgo diluida y la mezcla de la sonda de VPH de alto riesgo diluida antes de realizar la prueba *digene* HC2 HPV DNA. El método de dos sondas usa las mezclas de sondas de VPH de alto y bajo riesgo por separado. Véanse las instrucciones a continuación.

**Para el análisis de volúmenes altos de muestras, consulte el manual del usuario del Rapid Capture System (*Rapid Capture System User Manual*) para la preparación de las mezclas de sonda de VPH, el tampón de lavado, el reactivo de detección 1 y el reactivo de detección 2, ya que estas instrucciones son específicas para el uso de ese sistema para el análisis de volúmenes altos de muestras.**

REACTIVO	MÉTODO DE PREPARACIÓN
Reactivo de desnaturalización	<p><b>Prepárelo primero:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Añada 5 gotas de tinte indicador al frasco de reactivo de desnaturalización y mezcle bien. El reactivo de desnaturalización debe tener un color morado oscuro uniforme.</li> <li>• Una vez preparado, el reactivo de desnaturalización es estable durante tres meses si se conserva a una temperatura de 2 °C a 8 °C. Etiquételo con la nueva fecha de caducidad. Si disminuye la intensidad del color, añada 3 gotas más de tinte indicador y mezcle bien antes de usarlo.</li> </ul> <p><b>Advertencia:</b> El reactivo de desnaturalización es corrosivo. Use indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos y la cara. Tenga cuidado al manipularlo.</p>
Mezcla de sonda de VPH de bajo riesgo (preparada a partir de la sonda de VPH de bajo riesgo y del diluyente de sonda)	<p><b>Prepárela durante la incubación de desnaturalización de la muestra:</b></p> <p><b>Importante:</b> En ocasiones, la sonda se queda pegada a la tapa del vial.</p> <p><b>Nota:</b> Asegúrese de prevenir la contaminación de la sonda y de la mezcla de la sonda con ribonucleasa. Utilice puntas de pipeta con barrera contra aerosoles para pipetear la sonda. El diluyente de sonda es viscoso.</p> <p><b>Asegúrese de mezclar bien al preparar las sondas de VPH. Durante el paso de mezclado se debe formar un vórtice visible en el líquido. Un mezclado incompleto puede provocar la reducción de la señal.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Centrifugue el vial de <b>sonda de VPH de bajo riesgo</b> brevemente para llevar el líquido al fondo del vial. Dé unos golpecitos suaves para mezclar.</li> <li>• Determine la cantidad de mezcla de la sonda necesaria (25 µl/prueba). Se recomienda preparar un poco más de mezcla de la sonda para tener en cuenta el volumen que se pierde en las puntas de las pipetas o en las paredes del vial. Véanse a continuación los volúmenes recomendados. El número más pequeño de pocillos recomendado para cada uso es de 24. Si se desea utilizar menos de 24 pocillos por ensayo, puede reducirse el número total de pruebas por kit debido al volumen limitado de la sonda y del diluyente de sonda.</li> <li>• Transfiera la cantidad necesaria de diluyente de sonda a un nuevo recipiente desechable. Según el número de pruebas, se recomienda usar un tubo de polipropileno de fondo redondeado y cierre por presión de 5 ml o de 15 ml. Haga una dilución 1:25 de la sonda de VPH de bajo riesgo en el diluyente de sonda para preparar la mezcla de la sonda.</li> </ul>



		<b>N.º de pruebas/tiras</b>	<b>Volumen de diluyente de sonda*</b>	<b>Volumen de sonda*</b>
		48/6	2,0 ml	80,0 µl
		24/3	1,0 ml	40,0 µl
		Por pocillo	0,045 ml	1,8 µl

\*Estos valores incluyen el volumen adicional recomendado.

- Pipetee la sonda de VPH de bajo riesgo en el diluyente de sonda colocando la punta de pipeta en contacto con la pared interna del tubo justo por encima del menisco y expulsando el contenido. **No sumerja la punta en el diluyente de sonda.**
- Mezcle mediante agitación vorticial durante 5 segundos como mínimo a velocidad máxima para mezclar bien. **Debe generarse un vórtice visible.** Etiquete la mezcla como “Mezcla de la sonda de VPH de bajo riesgo” y consérvela en un recipiente limpio y cerrado hasta el momento de utilizarla. **La mezcla de la sonda que no se haya utilizado debe desecharse.**

<b>Mezcla de la sonda de VPH de alto riesgo</b>	Prepárela igual que la mezcla de la sonda de VPH de bajo riesgo tal como se ha descrito anteriormente. Etiquete la mezcla como “Mezcla de la sonda de VPH de alto riesgo”. <b>La mezcla de la sonda que no se haya utilizado debe desecharse.</b>
<b>Cóctel de sondas combinadas</b>	Prepare las mezclas de sondas de VPH de bajo y alto riesgo tal como se ha descrito anteriormente. Añada el contenido completo de la mezcla de la sonda de VPH de bajo riesgo diluida al tubo de la mezcla de la sonda de VPH de alto riesgo diluida. Mezcle bien mediante agitación vorticial durante 5 segundos como mínimo a velocidad máxima. Debe generarse un vórtice visible. Etiquete la mezcla como “Cóctel de sondas combinadas”. <b>La mezcla de la sonda que no se haya utilizado debe desecharse.</b>

<p><b>Tampón de lavado</b></p>	<p><b>Prepárelo durante el paso de captura:</b></p> <p><b>Para el Hybrid Capture System Automated Plate Washer,</b> prepare el tampón de lavado tal como se describe más adelante y consérvelo en un recipiente tapado o prepare 1 litro por vez y colóquelo en los depósitos de lavado del Automated Plate Washer. Consulte la tabla siguiente para ver los volúmenes de mezcla:</p> <p>Consulte el documento Automated Plate Washer Manual del usuario para obtener las instrucciones relativas al cuidado y al mantenimiento.</p> <p><b>Advertencia:</b> El tampón de lavado concentrado es tóxico por ingestión. Use indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos y la cara. Para minimizar la exposición, añada agua al tampón de lavado concentrado al prepararlo.</p> <table border="1" data-bbox="467 520 1321 688"> <thead> <tr> <th>Cantidad de tampón de lavado concentrado</th> <th>Cantidad de agua destilada o desionizada</th> <th>Volumen final de tampón de lavado</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>33,3 ml</td> <td>966,7 ml</td> <td>1 l</td> </tr> <tr> <td>66,6 ml</td> <td>1.933,4 ml</td> <td>2 l</td> </tr> <tr> <td>100 ml</td> <td>2.900 ml</td> <td>3 l</td> </tr> </tbody> </table> <p><b>Nota:</b> Es muy importante dejar el Automated Plate Washer siempre encendido. Esto permite llevar a cabo el lavado de mantenimiento después de ocho horas de inactividad.</p> <p><b>Antes de cada ensayo, asegúrese de que el depósito de residuos del Automated Plate Washer está vacío y de que el depósito de enjuague está lleno con agua desionizada o destilada.</b></p> <p><b>Para el método de lavado manual de las placas:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mezcle bien el tampón de lavado concentrado.</li> <li>• Diluya 100 ml de tampón de lavado concentrado con 2,9 l de agua desionizada o destilada en el aparato de lavado y mezcle bien (el volumen final debe ser de 3 l).</li> <li>• Selle el recipiente para evitar la contaminación o la evaporación.</li> </ul> <p>Una vez preparado, el tampón de lavado es estable durante tres meses a una temperatura de 2 °C a 30 °C. Etiquételo con la nueva fecha de caducidad. Si el tampón de lavado se ha conservado refrigerado, espere a que se estabilice a una temperatura de 20 °C a 25 °C antes de utilizarlo.</p> <p>Se recomienda limpiar con una solución de hipoclorito sódico al 0,5% el aparato de lavado y los tubos y enjuagarlos bien con agua destilada o desionizada una vez cada tres meses para evitar la posible contaminación con la fosfatasa alcalina presente en bacterias y mohos.</p>	Cantidad de tampón de lavado concentrado	Cantidad de agua destilada o desionizada	Volumen final de tampón de lavado	33,3 ml	966,7 ml	1 l	66,6 ml	1.933,4 ml	2 l	100 ml	2.900 ml	3 l
Cantidad de tampón de lavado concentrado	Cantidad de agua destilada o desionizada	Volumen final de tampón de lavado											
33,3 ml	966,7 ml	1 l											
66,6 ml	1.933,4 ml	2 l											
100 ml	2.900 ml	3 l											

**VOLUMEN DE LOS REACTIVOS LISTOS PARA USAR****Reactivos de  
detección 1 y 2****Inmediatamente antes de utilizarlos:**

Mezcle bien el reactivo y, a continuación, mida con cuidado el volumen adecuado de reactivo de detección 1 o de reactivo de detección 2 y transféralo a un depósito de reactivo limpio conforme a las instrucciones mostradas a continuación. Para evitar la contaminación, estos reactivos **NO DEBEN** devolverse a los frascos originales: **Después de utilizar los reactivos, deseche el material que no se haya usado.** Si no se utiliza una pipeta de 8 canales, puede usarse en su lugar una pipeta repetidora apropiada. En este caso, el reactivo debe dividirse en alícuotas en tubos de polipropileno de un tamaño suficiente para el volumen necesario que se indica a continuación.

<b>N.º de pruebas/tiras</b>	<b>Volumen de los reactivos de detección 1 o 2</b>
96/12	contenido del frasco
72/9	7,0 ml
48/6	5,0 ml
24/3	3,0 ml
1 prueba	0,125 ml

## RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las únicas muestras recomendadas para usar con la prueba *digene* HC2 HPV DNA son muestras cervicouterinas recogidas y transportadas utilizando el dispositivo *digene* HC2 DNA Collection Device (constituido por un cepillo cervicouterino y el medio *digene* Specimen Transport Medium) o muestras recogidas con un dispositivo de recogida de tipo cepillo o con una combinación de escobillón/espátula y colocadas en la solución PreservCyt o muestras cervicouterinas recogidas en solución conservante SurePath. No se han validado para el uso con este ensayo las muestras obtenidas utilizando otros dispositivos de recogida de muestras ni las transportadas en otros medios de transporte. Las características de rendimiento de este kit se han establecido únicamente con los kits de recogida indicados. Las muestras cervicouterinas deben recogerse antes de la aplicación de ácido acético o yodo si se realiza una exploración colposcópica. Consulte las instrucciones de uso del dispositivo *digene* HC2 DNA Collection Device para obtener información sobre procedimientos adicionales para la recogida y la manipulación de las muestras.

### MUESTRAS CERVICOUTERINAS EN STM

Las muestras recogidas en STM pueden conservarse durante un máximo de dos semanas a temperatura ambiente y enviarse sin refrigerar al laboratorio de análisis. Las muestras deben enviarse en un contenedor aislado por medio de un servicio de mensajería que garantice la entrega al día siguiente o como máximo en 2 días. En el laboratorio de análisis, las muestras deben conservarse a una temperatura de 2 °C a 8 °C si el ensayo va a realizarse en el plazo de una semana. Si el ensayo va a realizarse más de una semana después, conserve las muestras a –20 °C durante un máximo de 3 meses (consulte el apartado *Notas* en *Biopsias cervicouterinas* antes de la congelación). Se ha añadido un conservante al STM para retrasar el crecimiento bacteriano y mantener la integridad del ADN. **No está concebido** para preservar la viabilidad de los organismos o de las células. El dispositivo *digene* HC2 DNA Collection Device no debe utilizarse para la recogida de muestras de mujeres embarazadas.

### BIOPSIAS CERVICOUTERINAS

También pueden analizarse con la prueba *digene* HC2 HPV DNA muestras de biopsia cervicouterina recién recogidas con un diámetro de 2-5 mm. La muestra de biopsia debe introducirse inmediatamente en 1,0 ml de STM y conservarse congelada a –20 °C. Las muestras de biopsia pueden enviarse a una temperatura de 2 °C a 30 °C para su entrega al día siguiente al laboratorio de análisis y conservarse a –20 °C hasta su procesamiento. Se recomienda no utilizar muestras de biopsia con un diámetro inferior a 2 mm.

**Notas:** Para evitar que se caigan las tapas de los tubos de muestras transportados o conservados congelados:

- Cubra las tapas con Parafilm antes de enviar tubos de muestras previamente congelados. Las muestras pueden enviarse congeladas o a una temperatura de 20 °C a 25 °C.
- Cuando extraiga las muestras del congelador para el análisis, sustituya inmediatamente las tapas por tapas de rosca para tubos de recogida de muestras.

### MUESTRAS CERVICOUTERINAS RECOGIDAS EN SOLUCIÓN PRESERVCYT

En la prueba *digene* HC2 HPV DNA pueden utilizarse muestras recogidas con un dispositivo de recogida de tipo cepillo o con una combinación de escobillón/espátula y colocadas en la solución PreservCyt para la preparación de extensiones para la citología cervicovaginal ThinPrep®. Las muestras deben recogerse de la manera habitual y las extensiones para la citología cervicovaginal ThinPrep deben prepararse conforme a las instrucciones facilitadas por Hologic.

**Nota:** Deben quedar al menos 4 ml de solución PreservCyt para la prueba *digene* HC2 HPV DNA. Las muestras que tienen menos de 4 ml una vez realizada la preparación para la citología cervicovaginal pueden no contener suficiente material y podrían generar un resultado negativo falso en la prueba *digene* HC2 HPV DNA.

Las muestras recogidas en solución PreservCyt pueden conservarse durante un máximo de tres meses a una temperatura de 2 °C a 30 °C tras su recogida y antes del procesamiento para la prueba *digene* HC2 HPV DNA. Las muestras recogidas en solución PreservCyt no pueden congelarse. Para procesar estas muestras consulte el apartado *Procedimiento de preparación de las muestras recogidas en solución PreservCyt*.

## **MUESTRAS CERVICOUTERINAS RECOGIDAS EN SOLUCIÓN CONSERVANTE SUREPATH**

### **(SOLO para el análisis de ADN de VPH de alto riesgo)**

La preparación manual de las muestras recogidas en solución conservante SurePath se realiza utilizando el sedimento celular de posgradiente resultante de la preparación de las extensiones para la citología cervicovaginal SurePath. Prepare las extensiones para la citología cervicovaginal SurePath conforme a las instrucciones correspondientes para el instrumento BD PrepStain® Slide Processor.

Importante: Inmediatamente después de la preparación de extensiones para la citología cervicovaginal SurePath, deben pipetarse 2,0 ml de solución conservante SurePath en el tubo de centrifugadora que contiene el sedimento celular residual. Esto preserva la integridad del sedimento celular de posgradiente para la realización de la prueba *digene* HC2 HPV DNA.

El sedimento celular de posgradiente con solución conservante SurePath puede conservarse durante un máximo de 4 semanas a una temperatura de 2 °C a 30 °C antes de la preparación de la muestra para la prueba *digene* HC2 HPV DNA.

Las muestras de sedimento celular de posgradiente recogidas en solución conservante SurePath se preparan según se indica en estas instrucciones de uso. El resultado de la preparación manual de las muestras es una muestra desnaturalizada lista para el paso de hibridación de la prueba.

## PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

**Las muestras pueden contener microorganismos infecciosos y deben manipularse en correspondencia.** La prueba *digene* HC2 HPV DNA puede realizarse manualmente tal como se indica en estas instrucciones de uso o utilizando el instrumento Rapid Capture System para el análisis de volúmenes altos de muestras.

### ANÁLISIS DE VOLÚMENES ALTOS DE MUESTRAS CON EL SISTEMA RAPID CAPTURE SYSTEM

El instrumento Rapid Capture System es un sistema de pipeteo y dilución automáticos de uso general que puede usarse con la prueba *digene* HC2 HPV DNA para el análisis de volúmenes altos de muestras. Este sistema procesa un máximo de 352 muestras en ocho horas, incluido un período de 3,5 horas durante el que no es necesaria ninguna intervención por parte del usuario; pueden generarse resultados de un máximo de 704 muestras en 13 horas. La desnaturalización de las muestras en la fase de preparación para el análisis se realiza independientemente del sistema RCS, antes de colocarlas en la plataforma del sistema RCS. Además, la detección de la señal quimioluminiscente y la notificación de resultados se realizan con el instrumento DML sin conexión común para el método manual y para el método del RCS. Los pasos del procedimiento de la prueba *digene* HC2 HPV DNA se realizan en la secuencia exacta del procedimiento de análisis manual. La aplicación RCS permite realizar escalonadamente el procesamiento de un máximo de 4 microplacas, cada una con las muestras, los controles de calidad y los calibradores del ensayo necesarios.

**Si se utiliza el Rapid Capture System, consulte el *Manual de usuario de Rapid Capture System* que se entrega con el instrumento, además de estas instrucciones de uso, para obtener información necesaria relacionada con los procedimientos y descriptiva.**

### MÉTODO MANUAL

#### Preparación

1. Si se utiliza el Microplate Heater I, **deje transcurrir al menos 60 minutos para que se estabilice a  $65 \pm 2$  °C desde un inicio en frío.** Consulte el manual del usuario del Microplate Heater I (*Microplate Heater I User Manual*) si desea obtener información detallada.
2. Asegúrese de que la temperatura del baño María es de 65 °C y de que tiene suficiente agua para cubrir todo el volumen de los tubos de muestras.
3. Extraiga del frigorífico las muestras y **todos** los reactivos necesarios **antes de comenzar el ensayo.** Deje que alcancen una temperatura de 20 °C a 25 °C durante 15 a 30 minutos.  
**Nota:** Prepare las muestras recogidas en solución PreservCyt y las muestras recogidas en SurePath antes de estabilizar a temperatura ambiente los reactivos del kit y las muestras previamente desnaturalizadas.
4. Use el software de análisis de ensayos *digene* para crear el diseño de placa de ensayo. Consulte el manual del usuario correspondiente para obtener instrucciones acerca de cómo crear un diseño de placa.
5. Coloque los calibradores, los controles de calidad y las muestras que desea analizar en una gradilla para tubos de ensayo, en el orden en el que se van a analizar. **El calibrador negativo, el calibrador para VPH de bajo riesgo y el calibrador para VPH de alto riesgo deben analizarse PRIMERO.** El calibrador negativo (NC), el calibrador para VPH de bajo riesgo (LRC), el calibrador para VPH de alto riesgo (HRC), el control de calidad de VPH de bajo riesgo (QC1-LR), el control de calidad de VPH de alto riesgo (QC2-HR) y las muestras deben procesarse en una configuración de columnas de 8 pocillos de la microplaca. Consulte el *Ejemplo de diseño* a continuación.

Ejemplo de diseño para un análisis de 24 pocillos de la microplaca:			
Fila	Columna		
	1	2	3
A	NC	Muestra 1	Muestra 9
B	NC	Muestra 2	Muestra 10
C	NC	Muestra 3	Muestra 11
D	LRC o HRC	Muestra 4	Muestra 12
E	LRC o HRC	Muestra 5	Muestra 13
F	LRC o HRC	Muestra 6	Muestra 14
G	QC1-LR	Muestra 7	Muestra 15
H	QC2-HR	Muestra 8	Muestra 16

- Si se utiliza el método del cóctel de sondas combinadas (CPC), el NC, el LRC y el HRC se analizan por triplicado con el cóctel de sondas combinadas en la misma microplaca. Utilice los pocillos A1, B1 y C1 para el NC, y los pocillos D1, E1, F1, G1, H1 y A2 para el LRC y el HRC, respectivamente. Utilice los pocillos B2 y C2 para los controles de calidad QC1-LR y QC2-HR, respectivamente, y los pocillos a partir de D2 para las muestras. **El procedimiento de CPC no ha sido validado para utilizarse con el Rapid Capture System.**
- Para el método de dos sondas, realice las pruebas de la mezcla de la sonda de VPH de bajo riesgo en el lado izquierdo de la microplaca y las pruebas de la mezcla de la sonda de VPH de alto riesgo en el lado derecho de la microplaca.

PRIMERO, analice el calibrador negativo (NC) y el calibrador de bajo riesgo (LRC) por triplicado con la mezcla de la sonda de VPH de bajo riesgo. A continuación, analice los controles de calidad (QC1-LR y QC2-HR) y las muestras una sola vez, también con la mezcla de la sonda de VPH de bajo riesgo. Coloque los duplicados del NC en A1, B1 y C1, los duplicados del LRC en D1, E1 y F1, el QC1-LR en G1, el QC2-HR en H1 y las muestras a partir de A2.

A CONTINUACIÓN, analice el control negativo (NC) y el calibrador de alto riesgo (HRC) por triplicado con la mezcla de la sonda de VPH de alto riesgo. Después, analice los controles de calidad (QC1-LR y QC2-HR) y las muestras una sola vez, también con la mezcla de la sonda de VPH de alto riesgo. Coloque los duplicados del NC en A7, B7 y C7, los duplicados del HRC en D7, E7 y F7, el QC1-LR en G7, el QC2-HR en H7 y las muestras a partir de A8. Consulte el ejemplo de diseño anterior.

Consulte el manual del usuario correspondiente para obtener instrucciones para la correcta configuración de los calibradores, los controles de calidad y las muestras en el software.

- También se pueden utilizar dos microplacas distintas para analizar los calibradores, los controles de calidad y las muestras con las sondas de VPH de bajo y de alto riesgo. En una microplaca se analizan el NC y el LRC por triplicado y el QC1-LR y el QC2-HR una sola vez con la mezcla de la sonda de VPH de bajo riesgo; en la otra microplaca se analizan el NC y el HRC por triplicado y el QC1-LR y el QC2-HR una sola vez con la mezcla de la sonda de VPH de alto riesgo. Utilice los pocillos A1, B1 y C1 para el NC y los pocillos D1, E1 y F1 para el LRC o el HRC, respectivamente. Utilice los pocillos G1 y H1 para los controles de calidad QC1-LR y QC2-HR, respectivamente.
- Las muestras pueden analizarse una sola vez con el cóctel de sondas combinadas si se utiliza el método del CPC, o una sola vez con la mezcla de la sonda de VPH de bajo riesgo y una sola vez con la mezcla de la sonda de VPH de alto riesgo si se utiliza el método de dos sondas.

## DESNATURALIZACIÓN

### Notas:

- Advertencia:** El reactivo de desnaturalización es corrosivo. Tenga precaución y use guantes sin talco al manipularlo.

- **Importante:** Algunas muestras cervicouterinas pueden contener sangre u otro material biológico, los cuales pueden enmascarar los cambios de color al añadir el reactivo de desnaturalización. Es posible que las muestras que tengan un color oscuro antes de añadir el reactivo de desnaturalización no muestren el cambio de color apropiado en este paso. En estos casos, la imposibilidad de visualizar el cambio de color correcto no afecta a los resultados del ensayo. El mezclado correcto puede verificarse observando el cambio de color de los calibradores y de los controles de calidad.
- Durante los pasos de desnaturalización e hibridación, asegúrese de que el nivel de agua del baño María sea suficiente para sumergir todo el volumen de la muestra del tubo.
- Los calibradores, los controles de calidad y las muestras pueden prepararse hasta el paso de desnaturalización incluido y conservarse a una temperatura de 2 °C a 8 °C hasta el día siguiente o a -20 °C durante un máximo de 3 meses. Se pueden realizar como máximo 3 ciclos de congelación-descongelación con un máximo de 2 horas a temperatura ambiente durante cada ciclo de descongelación. Mezcle bien las muestras antes de utilizarlas.
- Tras la desnaturalización y la incubación, las muestras dejan de considerarse infecciosas<sup>26</sup>. No obstante, el personal del laboratorio deberá seguir cumpliendo las precauciones nacionales y locales.
- No extraiga el dispositivo de recogida de muestras antes de la desnaturalización.
- Para evitar resultados positivos falsos, es fundamental que todo el material de calibrador, control de calidad y muestra recogida en STM entre en contacto con el reactivo de desnaturalización. La mezcla después de añadir el reactivo de desnaturalización es un paso crítico: **Asegúrese de que el Multi-Specimen Tube Vortexer 2 está configurado en 100 (velocidad máxima) y de que se observa un vórtice visible de líquido durante la mezcla de modo que el líquido lave toda la superficie interna del tubo. Si se realiza una agitación vorticial manual, asegúrese de que cada calibrador, control de calidad y muestra se mezcla individualmente mediante agitación vorticial durante 5 segundos como mínimo a máxima velocidad de manera que el vórtice de líquido lave toda la superficie interna del tubo y, a continuación, invirtiendo el tubo una vez.**

#### Procedimiento de preparación de calibradores, controles de calidad y muestras recogidas en STM

1. Retire y deseche las tapas de los tubos de los calibradores, los controles de calidad y las muestras recogidas en STM.

**Nota:** Las tapas retiradas de los tubos de muestras se consideran potencialmente infecciosas. Elimínelas conforme a la normativa nacional/local.

2. Pipetee el reactivo de desnaturalización con el tinte indicador en cada calibrador, control de calidad o muestra recogida en STM utilizando una pipeta repetidora o ajustable. Tenga cuidado de no tocar las paredes del tubo, ya que de lo contrario podría producirse una contaminación cruzada de las muestras. El volumen de reactivo de desnaturalización necesario equivale a la mitad del volumen de la muestra. El volumen exacto para cada tipo de calibrador, control de calidad y muestra se indica en la siguiente tabla.

**Diluya el reactivo de desnaturalización restante en el frasco antes de desecharlo conforme a los procedimientos de laboratorio nacionales y locales.**

Calibrador, control de calidad o muestra	Volumen necesario del reactivo de desnaturalización
Calibrador negativo	1.000 µl
Calibrador para VPH de bajo o de alto riesgo	500 µl
Control de calidad de VPH de bajo o de alto riesgo	500 µl
Muestra cervicouterina	500 µl

3. Mezcle las muestras utilizando uno de los dos métodos siguientes.

Método del Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2



**Nota:** Las muestra recogidas con el dispositivo *digene* HC2 DNA Collection Device y mezcladas con el MST Vortexer 2 **deben** hibridarse con el método de microplaca de hibridación y Microplate Heater I.

- a) Cubra los tubos de calibrador, controles de calidad y muestras recogidas en STM con lámina selladora de tubos DuraSeal extendiéndola sobre los tubos en la gradilla.
- b) Coloque la tapa de gradilla sobre los tubos cubiertos con la lámina y asegure la tapa en su posición con las dos pinzas laterales. Corte la lámina con el dispositivo de corte.
- c) Coloque la gradilla en el Multi-Specimen Tube Vortexer 2 y asegúrela con la pinza. Asegúrese de que la velocidad esté ajustada en 100 (velocidad máxima) y conmute el interruptor de alimentación del agitador vorticial a la posición de encendido (ON). Agite los tubos en el agitador vorticial durante 10 segundos.

#### Método de agitación vorticial manual de tubos individuales

- a) Cubra de nuevo los tubos de calibrador, controles de calidad y muestras recogidas en STM con tapas de rosca limpias para tubos de recogida de muestras.
- b) Mezcle bien cada tubo de forma individual mediante agitación vorticial a alta velocidad durante 5 segundos.
- c) Invierta cada tubo de muestras una vez para lavar el interior del tubo, la tapa y el reborde.
- d) Vuelva a colocar el tubo en la gradilla.

Independientemente del método de agitación vorticial utilizado, **debe formarse un vórtice visible de líquido en el interior de cada tubo durante el mezclado de forma que el líquido lave toda la superficie interior del tubo.** Los calibradores, los controles de calidad y las muestras deben adquirir un color morado.

4. Incube los tubos en la gradilla en un baño María a  $65 \pm 2$  °C durante  $45 \pm 5$  minutos (los calibradores, controles de calidad y muestras desnaturalizados pueden analizarse inmediatamente o conservarse tal como se ha descrito previamente en las notas). Durante esta incubación, prepare las mezclas de sondas de VPH. Consulte el apartado *Preparación y conservación de los reactivos*.

#### **Procedimiento de preparación de las muestras recogidas en solución PreservCyt**

##### **Notas:**

- Consulte las instrucciones de uso del kit *digene* HC2 Sample Conversion si desea obtener información detallada completa.
- Al procesar una alícuota de 4 ml de solución PreservCyt se obtiene material suficiente para 2 pruebas con el método de análisis manual. El volumen mínimo que se puede procesar es 4 ml.
- Prepare las muestras recogidas en solución PreservCyt en lotes de 36 o menos; de lo contrario, se pueden desprender los sedimentos al decantar el sobrenadante. Esto es importante para mantener la integridad del sedimento celular durante el paso de decantación. Si prepara viales adicionales de solución PreservCyt, no comience a prepararlos hasta que haya finalizado la preparación del primer lote.

#### Preparación de los reactivos

Use el reactivo de desnaturalización (DNR) suministrado con la prueba *digene* HC2 HPV DNA (consulte *Preparación y conservación de los reactivos*) o el DNR suministrado con el kit *digene* HC2 Sample Conversion. Para preparar el DNR suministrado con el kit *digene* HC2 Sample Conversion, añada 3 gotas de tinte indicador al frasco de DNR y mezcle bien. La solución debe presentar un color morado oscuro uniforme. Para determinar el volumen necesario, utilice la tabla 1.

**Tabla 1**  
**Volumen necesario: Preparación de los reactivos**

Número de pruebas	Volumen de solución PreservCyt	Volumen de tampón de conversión
1-2	4 ml	0,4 ml
3	6 ml	0,6 ml
4	8 ml	0,8 ml
5	10 ml	1,0 ml
6	12 ml	1,2 ml

1. Etiquete un tubo *digene* HC2 Sample Conversion, un tubo Sarstedt cónico de 10 ml o un tubo cónico de 15 ml de las marcas VWR o Corning con el número de identificación de la muestra adecuado.
2. Manipule una única muestra cada vez:
  - a. Agite enérgicamente a mano el vial de PreservCyt hasta que las células aparezcan uniformemente dispersas.
  - b. Pipetee inmediatamente (ya que las células sedimentan con mucha rapidez) el volumen adecuado de la muestra recogida en PreservCyt en el tubo etiquetado. Añada la solución PreservCyt al fondo del tubo cónico para reducir al mínimo la adhesión del material celular al interior del tubo.
3. Añada el volumen adecuado de tampón para conversión de muestras a cada tubo (consulte la tabla 1).
4. Vuelva a tapar cada tubo y mezcle bien su contenido mediante un mezclador vorticial con accesorio cóncavo.
 

**Nota:** El procedimiento del MST Vortexer 2 no se ha validado para la agitación vorticial de muestras recogidas en solución PreservCyt con tampón para conversión de muestras antes de la centrifugación y, por consiguiente, no debe utilizarse para este paso.
5. Centrifugue los tubos en un rotor basculante a  $2.900 \pm 150 \times g$  durante  $15 \pm 2$  minutos.

6. Durante la centrifugación, prepare la mezcla de medio Specimen Transport Medium/reactivo de desnaturalización (STM/DNR) en una relación de 2:1, según se indica en la tabla 2.

**Nota:** La mezcla STM/DNR debe prepararse nueva cada día que se vaya a realizar la prueba.

- a. Para determinar el volumen total de mezcla STM/DNR necesario, utilice el volumen inicial de muestra recogida en solución PreservCyt como referencia y, a continuación, multiplique los volúmenes de STM y DNR “por tubo” por el número de muestras que desee procesar (consulte la tabla 2).

**Tabla 2**  
**Volumen necesario: STM/DNR**

N.º de pruebas	Volumen de solución PreservCyt	Volumen de STM por tubo para la mezcla STM/DNR final*	Volumen de DNR por tubo para la mezcla STM/DNR final*	Mezcla STM/DNR añadida al tubo
1-2	4 ml	120 µl	60 µl	150 µl
3	6 ml	170 µl	85 µl	225 µl
4	8 ml	220 µl	110 µl	300 µl
5	10 ml	270 µl	135 µl	375 µl
6	12 ml	320 µl	160 µl	450 µl

\* Los volúmenes indicados en estas columnas no deben añadirse directamente al tubo de muestra.

- b. Mezcle bien la solución mediante agitación vorticial.
7. Saque los tubos de la centrifugadora de uno en uno y colóquelos en una gradilla o en la gradilla de conversión. En el fondo de cada tubo debe haber un sedimento de color rosa/naranja.

**Nota:** Las muestras que no tengan un sedimento visible después de la centrifugación no son aceptables para realizar la prueba y deben desecharse.

8. Manipulación individual de cada tubo:
  - a. Quite la tapa y deposítela sobre una hoja de papel absorbente sin pelusa limpia.
  - b. Decante con cuidado el sobrenadante.
  - c. Mantenga el tubo invertido y séquelo suavemente (aproximadamente 6 veces) sobre hojas de papel absorbente sin pelusa hasta que ya no gotee líquido del tubo. Utilice cada vez una zona limpia de la hoja de papel absorbente. **No** permita que el sedimento celular se deslice hacia abajo por el tubo durante el secado.

**Notas:**

- No utilice la misma parte de la hoja de papel absorbente sin pelusa más de una vez para secar.
  - Es importante eliminar mediante el secado la máxima cantidad de solución PreservCyt. No obstante, es normal que aparezcan restos de la solución PreservCyt después del secado.
- d. Coloque el tubo en una gradilla o en la gradilla de conversión.

## AGITACIÓN VORTICIAL Y DESNATURALIZACIÓN

### Procedimiento de agitación vorticial manual

1. Añada el volumen apropiado de STM/DNR a cada sedimento (consulte la tabla 2). Tape de nuevo cada tubo y vuelva a poner en suspensión los sedimentos mediante agitación vorticial de cada tubo de forma individual durante al menos 30 segundos a la velocidad máxima del agitador vorticial. Si es difícil volver a poner en suspensión el sedimento, agite en el agitador vorticial durante un período adicional de 10 a 30 segundos o hasta que el sedimento flote suelto del fondo del tubo. Si el

sedimento permanece sin disolverse después de la agitación vorticial adicional (máximo de 2 minutos en total), anote la identificación de la muestra y continúe con el siguiente paso.

2. Coloque los tubos en una gradilla.
3. Coloque la gradilla en un baño María a  $65 \pm 2$  °C durante  $15 \pm 2$  minutos. Asegúrese de que el nivel de agua es suficiente para cubrir todo el líquido de los tubos.
4. Extraiga la gradilla con las muestras del baño María y agite las muestras individualmente en el agitador vorticial durante 15 a 30 segundos.

**Nota:** Asegúrese de que todos los sedimentos están completamente en suspensión en este momento. Las muestras que aún tengan sedimentos visibles no son válidas para realizar la prueba y deben desecharse.

5. Vuelva a introducir la gradilla en el baño María a  $65 \pm 2$  °C y continúe la desnaturalización durante  $30 \pm 3$  minutos más.
6. Continúe con el paso *Hibridación* o consulte el apartado *Punto de detención opcional* para obtener información sobre la conservación y el tratamiento de las muestras desnaturalizadas.

## Procedimiento del Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2

### Notas:

- El procedimiento del Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 está validado para procesar muestras recogidas en solución PreservCyt después de la centrifugación y la decantación del sobrenadante.
  - El MST Vortexer 2 es el único aparato diseñado para el procesamiento de muestras recogidas en solución PreservCyt.
  - La gradilla de conversión con tapa está específicamente diseñada para alojar tubos *digene* HC2 Sample Conversion (tubos cónicos de 15 ml de las marcas VWR o Corning). Solo debe utilizarse un tipo de tubo al mismo tiempo en la gradilla de conversión. El uso de otras marcas no está validado.
  - Es necesario cumplir estrictamente los tiempos de agitación vorticial especificados para la gradilla de conversión con tapa.
  - La gradilla de conversión con tapa no puede utilizarse para la agitación vorticial de los calibradores y de los controles de calidad del kit *digene* HC2 DNA Test. La altura de los tubos de STM impide una agitación vorticial adecuada si se utiliza la gradilla de conversión con tapa.
1. Después de secar cada tubo cónico de 15 ml etiquetado, colóquelo en la posición adecuada en la gradilla de conversión.
  2. Añada el volumen apropiado de mezcla STM/DNR a cada sedimento (tabla 2).
  3. Cubra los tubos cónicos de 15 ml con lámina selladora de tubos DuraSeal, extendiendo la lámina sobre los tubos en la gradilla.
  4. Coloque la tapa de gradilla sobre los tubos cubiertos con la lámina y asegure la tapa en su posición con las dos pinzas laterales. Corte la lámina con el dispositivo de corte una vez asegurada la tapa.
  5. Eleve la palanca con el mango rojo hasta la posición horizontal.
  6. Coloque la gradilla de conversión con tapa en el MST Vortexer 2 de forma que la esquina recortada más grande de la gradilla de conversión quede situada en la esquina frontal derecha. Coloque la gradilla con tapa en la plataforma del MST Vortexer 2 de modo que encaje de forma segura en las guías. Asegure la gradilla en su posición bajando la palanca con el mango rojo a la posición vertical. De esta forma se asegurará la gradilla en su posición.
  7. Asegúrese de que la velocidad esté ajustada en 100 (velocidad máxima) y de que el conmutador basculante del generador de impulsos se encuentre en la posición de apagado (OFF).
  8. Conmute el interruptor de alimentación del agitador vorticial a la posición de encendido (ON). **Agite los tubos en el agitador vorticial durante 30 segundos.**
  9. Conmute el interruptor de alimentación del agitador vorticial a la posición de apagado (OFF).

10. Extraiga la gradilla de conversión con tapa del MST Vortexer 2 levantando la palanca con el mango rojo.
11. Coloque la gradilla en el baño María a  $65 \pm 2$  °C durante  $15 \pm 2$  minutos. Asegúrese de que el agua cubra completamente el líquido de todos los tubos.
12. Tras 15 minutos de incubación, extraiga del baño María la gradilla con las muestras.
13. Para evitar salpicaduras, seque el exceso de agua de la gradilla antes de colocarla en el MST Vortexer 2.
14. Asegure la gradilla de conversión con tapa en el MST Vortexer 2 tal como se describe en el *paso 6*.
15. Asegúrese de que la velocidad esté ajustada en 100 y conmute el interruptor de alimentación del agitador vorticial a la posición de encendido (ON). **Agite los tubos en el agitador vorticial durante 1 minuto.**
16. Conmute el interruptor de alimentación del agitador vorticial a la posición de apagado (OFF).  
**Nota:** El procedimiento del MST Vortexer 2 normaliza la velocidad, los tiempos y el proceso de mezclado, eliminando así la necesidad de comprobar visualmente los sedimentos celulares como es necesario hacer durante el procedimiento de agitación vorticial manual.
17. Vuelva a introducir la gradilla en el baño María a  $65 \pm 2$  °C y continúe la desnaturalización durante  $30 \pm 3$  minutos.
18. Extraiga la gradilla del baño María, séquela y asegúrela en el agitador vorticial.
19. Conmute el interruptor de alimentación del agitador vorticial a la posición de encendido (ON). **Agite durante 10 segundos en el agitador vorticial a la máxima velocidad.**
20. Conmute el interruptor de alimentación del agitador vorticial a la posición de apagado (OFF). Retire la gradilla.
21. Retire inmediatamente la tapa de gradilla y la lámina selladora de tubos DuraSeal de las muestras.
22. Continúe con el *paso Hibridación* o consulte el apartado *Punto de detención opcional* para obtener información sobre la conservación y el tratamiento de las muestras desnaturalizadas.

### **Procedimiento de preparación de las muestras recogidas en SurePath (SOLO para el análisis de ADN de VPH de alto riesgo)**

Una vez finalizado el procesamiento citológico, haga lo siguiente:

1. Asegúrese de que el volumen de líquido observado es igual a 2,8 ml.  
**ATENCIÓN: Si el sedimento celular residual parece contener menos de 1 ml de líquido, es posible que no se haya añadido la solución conservante SurePath después de la citología y la muestra NO es apta para el análisis de ADN de VPH de alto riesgo.**
2. Asegúrese de que las muestras se hayan estabilizado a temperatura ambiente.
3. Centrifugue la muestra en un rotor basculante a  $800 \pm 15 \times g$  durante  $10 \pm 1$  minutos.
4. Extraiga los tubos de la centrifugadora.
5. Decante con cuidado el sobrenadante inmediatamente después de la centrifugación y seque suavemente cada tubo (aproximadamente tres veces) sobre hojas de papel absorbente para eliminar el exceso de líquido. Observe el sedimento de cada tubo. **No permita que el sedimento celular se deslice hacia abajo por el tubo durante el secado.**
6. Coloque los tubos en la gradilla.
7. Añada 200 µl de STM a cada sedimento utilizando una pipeta repetidora o ajustable.  
**Nota:** Los tubos pueden mezclarse sin tapar.
8. Vuelva a poner en suspensión cada sedimento agitando cada tubo de forma individual en el agitador vorticial durante 15 segundos a alta velocidad. Si es difícil volver a poner en suspensión el sedimento,

agítelo en el agitador vorticial durante 5 a 30 segundos más o hasta que el sedimento flote suelto del fondo del tubo y parezca disolverse.

9. Pipetee 100 µl de reactivo de desnaturalización preparado (con tinte indicador) a cada muestra utilizando una pipeta repetidora o ajustable.

**ATENCIÓN:** Tenga cuidado de no tocar las paredes del tubo, ya que de lo contrario podría producirse una contaminación cruzada de las muestras.

Si va a desechar el reactivo de desnaturalización restante, hágalo conforme a las normativas federales, estatales y locales vigentes para la eliminación de sustancias corrosivas.

10. Mezcle bien cada tubo de forma individual mediante agitación vorticial a alta velocidad durante 5 segundos.

**Nota:** Los tubos pueden mezclarse sin tapar.

Etiquete tubos cónicos de 15 ml con la identificación y el tipo de muestra correspondientes (por ejemplo, "SP" para las muestras recogidas en SurePath) y colóquelos en una gradilla.

**Nota:** Si va a utilizar el Rapid Capture System para procesamiento de ensayo semiautomático, debe utilizar tubos cónicos de 15 ml de las marcas VWR o Corning para conseguir una colocación adecuada en la gradilla de conversión *digene* (gradilla plateada).

11. Transfiera todo el volumen del tubo a un tubo cónico de 15 ml con tapa de rosca utilizando una pipeta de transferencia de punta convencional de 7 ml desechable o equivalente<sup>1</sup>.
12. Tape los tubos cónicos de 15 ml.
13. Incube los tubos en un baño María a  $65 \pm 2$  °C durante  $90 \pm 5$  minutos.

**ATENCIÓN:** Este tiempo de incubación es mayor que el necesario para otros tipos de muestras aprobados.

14. Si el análisis del VPH va a finalizarse el mismo día, desnaturalice los calibradores *digene* HC2 DNA Test según se indica en estas instrucciones de uso.
15. Retire la gradilla de muestras del baño María.

#### Punto de detención opcional

Después de la desnaturalización, las muestras recogidas en STM y las muestras recogidas en solución PreservCyt y en SurePath convertidas pueden conservarse a una temperatura de 2 °C a 8 °C hasta el día siguiente o a -20 °C durante un máximo de 3 meses. Si se desea conservar las muestras refrigeradas hasta el día siguiente, se pueden dejar en la gradilla de conversión colocando la lámina DuraSeal y la tapa de gradilla. Antes de almacenarlas a -20 °C, se deberá retirar la tapa de gradilla y la lámina DuraSeal y cerrar los tubos con sus tapas. En ambos casos, es necesario dejar que las muestras se estabilicen a temperatura ambiente (entre 20 °C y 25 °C) y agitarlas bien en el agitador vorticial antes de continuar con el paso de hibridación.

**Nota:** No almacene ni envíe en nieve carbónica muestras desnaturalizadas.

Se pueden realizar como máximo 3 ciclos de congelación-descongelación con un máximo de 2 horas a temperatura ambiente durante cada ciclo de descongelación.

## **HIBRIDACIÓN: MÉTODOS DE CÓCTEL DE SONDAS COMBINADAS (CPC) Y DE DOS SONDAS**

---

<sup>1</sup> Para las pruebas de verificación de QIAGEN se utilizaron tubos cónicos de 15 ml de la marca VWR.

#### Notas:

- Las mezclas de sondas de VPH son viscosas. Asegúrese de que la mezcla de la sonda está bien mezclada y de que se ha dispensado completamente la cantidad necesaria en cada pocillo de la microplaca. Consulte el apartado *Preparación y conservación de los reactivos*.
- Si la muestra desnaturalizada se ha conservado a  $-20\text{ °C}$ , deje que se descongele hasta alcanzar una temperatura de  $20\text{ °C}$  a  $25\text{ °C}$  y agítela bien en el agitador vorticial antes de proceder con la hibridación.
- Precaliente el Microplate Heater I a  $65 \pm 2\text{ °C}$  durante al menos 60 minutos antes de utilizarlo. Consulte el manual del usuario del Microplate Heater I (*Microplate Heater I User Manual*) si desea obtener más instrucciones en caso necesario.

#### Método de hibridación con microplaca de hibridación y el Microplate Heater I

**Nota:** Las muestras recogidas con el dispositivo *digene* HC2 DNA Collection Device en STM y procesadas con el método del MST Vortexer 2 pueden hibridarse **únicamente** empleando el método del Microplate Heater I.

1. Obtenga y etiquete una microplaca de hibridación.
2. Extraiga los calibradores, los controles de calidad y las muestras del baño María después de la incubación. Si se va a utilizar el Multi-Specimen Tube Vortexer 2, agite en el agitador vorticial la gradilla completa de muestras recogidas en STM durante un mínimo de 5 segundos a la velocidad máxima. En el caso de las muestras recogidas en solución PreservCyt o en SurePath, agite la gradilla de conversión completa en el agitador vorticial durante un mínimo de 10 segundos a la velocidad máxima. También puede agitar en el agitador vorticial cada tubo de forma individual durante al menos 5 segundos.
3. Pipetee  $75\ \mu\text{l}$  de cada calibrador, control de calidad o muestra en el **fondo** del pocillo vacío de la microplaca de hibridación conforme al diseño de placa creado en *Setup* (Configuración). Evite tocar las paredes de los pocillos y limite la formación de burbujas de aire. Utilice una punta de pipeta extralarga limpia para cada transferencia con el fin de evitar la contaminación cruzada de los calibradores, los controles de calidad o las muestras. No retire el dispositivo de recogida de muestras del tubo de transporte de muestras. Las muestras desnaturalizadas se pueden tapar con las tapas de rosca para tubos de recogida de muestras y conservar con los dispositivos de recogida de muestras restantes en los tubos. Las muestras recogidas en solución PreservCyt desnaturalizadas pueden volver a taparse con las tapas originales.

**Nota:** Se pueden obtener resultados positivos falsos si no se transfieren con cuidado las alícuotas de las muestras. Durante la transferencia de una muestra, no permita que la punta de la pipeta toque el interior del tubo al extraer la alícuota de  $75\ \mu\text{l}$ .

4. Después de transferir la última muestra, cubra la placa con una tapa de placa e **incube la microplaca de hibridación durante 10 minutos a una temperatura de  $20\text{ °C}$  a  $25\text{ °C}$** .
5. Transfiera la mezcla de la sonda preparada y bien agitada en el agitador vorticial a un depósito desechable para reactivos. Con una pipeta de 8 canales y puntas nuevas para cada fila, añada con cuidado  $25\ \mu\text{l}$  de la mezcla de la sonda a cada pocillo que contenga calibradores, controles de calidad y muestras. Dispense el volumen de sonda en cada pocillo de hibridación, evitando que salpique. No toque las paredes de los pocillos. Coloque la tapa de placa sobre la microplaca durante toda la incubación de desnaturalización.
6. Cubra la microplaca de hibridación con una tapa de placa y agítela en el Hybrid Capture System Rotary Shaker I a  $1.100 \pm 100\text{ rpm}$  durante  $3 \pm 2$  minutos. *Después de la agitación, los calibradores, los controles de calidad y las muestras deberían adquirir un color amarillo*. Si queda algún pocillo de color morado, es posible que no haya recibido la cantidad adecuada de mezcla de la sonda. Añada  $25\ \mu\text{l}$  más de mezcla de la sonda a las muestras que sigan teniendo un color morado y agítelas de nuevo. Si los pocillos continúan presentando un color morado después de este procedimiento, deben volver a analizarse las muestras.

#### Notas:

- Después de la agitación, las muestras recogidas en solución PreservCyt deberían adquirir un color rosa en lugar de amarillo.
  - Al colocar la microplaca de hibridación en el Microplate Heater I, asegúrese de que no se produzcan salpicaduras.
7. Incube en un Microplate Heater I precalentado y estabilizado a  $65 \pm 2$  °C durante  $60 \pm 5$  min.

#### Método de hibridación con microtubos y baño María

#### Notas:

- **No se ha validado** el procesamiento de muestras recogidas con el dispositivo *digene* HC2 DNA Collection Device en STM utilizando el método del MST Vortexer 2 para el mezclado y el método del baño María para la hibridación. Las muestras recogidas con el dispositivo *digene* HC2 DNA Collection Device en STM y procesadas con el método del MST Vortexer 2 pueden hibridarse **únicamente** empleando el método del Microplate Heater I.
  - Si la muestra desnaturalizada se ha conservado a  $-20$  °C, deje que se descongele hasta alcanzar una temperatura de  $20$  °C a  $25$  °C y agítela bien en el agitador vorticial antes de proceder con la hibridación.
1. Etiquete y coloque en la gradilla para microtubos el número necesario de microtubos de hibridación limpios.
  2. Extraiga los calibradores, los controles de calidad y las muestras del baño María después de la incubación. Agite cada tubo individualmente en el agitador vorticial durante al menos 5 segundos justo antes de extraer las alícuotas.
  3. Pipetee  $75$   $\mu$ l de cada calibrador, control de calidad o muestra en el **fondo** del microtubo de hibridación vacío conforme al diseño de placa creado en *Setup*. No toque las paredes de los microtubos y limite la formación de burbujas de aire. Utilice una punta de pipeta extralarga limpia para cada transferencia con el fin de evitar la contaminación cruzada de los calibradores, los controles de calidad o las muestras. No es necesario retirar el dispositivo de recogida de muestras del tubo de transporte de muestras. Las muestras desnaturalizadas se pueden tapar con las tapas de rosca para tubos de recogida de muestras y conservar con los dispositivos de recogida de muestras restantes en los tubos.  
**Nota:** Se pueden obtener resultados positivos falsos si no se transfieren con cuidado las alícuotas de las muestras. Durante la transferencia de una muestra, no permita que la punta de la pipeta toque el interior del tubo al extraer la alícuota de  $75$   $\mu$ l.
  4. Después de transferir la última muestra, **incube los microtubos de hibridación durante 10 minutos a una temperatura de  $20$  °C a  $25$  °C.**
  5. Transfiera la mezcla de la sonda preparada y bien agitada en el agitador vorticial a un depósito desechable para reactivos. Con una pipeta de 8 canales y puntas nuevas para cada fila, añada con cuidado  $25$   $\mu$ l de la mezcla de la sonda a cada microtubo que contenga calibradores, controles de calidad y muestras. Dispense el volumen de sonda en cada microtubo de hibridación, evitando que salpique. Evite tocar las paredes de los tubos. Examine la gradilla por debajo para asegurarse de que todos los tubos han recibido la cantidad adecuada de la mezcla de la sonda.
  6. Cubra los microtubos con sellador de placas. Coloque una tapa de gradilla sobre la gradilla. Agite la gradilla para microtubos en el Rotary Shaker I a  $1.100 \pm 100$  rpm durante  $3 \pm 2$  minutos. *Después de la agitación, los calibradores, los controles de calidad y las muestras deberían adquirir un color amarillo.* Si queda algún tubo de color morado, es posible que no haya recibido la cantidad adecuada de mezcla de la sonda. Añada  $25$   $\mu$ l más de mezcla de la sonda a las muestras que sigan teniendo un color morado y agítelas de nuevo. Si los tubos continúan presentando un color morado después de este procedimiento, deben volver a analizarse las muestras.



**Nota:** Después de la agitación, las muestras recogidas en solución PreservCyt deberían adquirir un color rosa en lugar de amarillo.

7. Incube los tubos en un baño María a  $65 \pm 2$  °C durante  $60 \pm 5$  minutos. Asegúrese de que el nivel de agua del baño María es suficiente para cubrir todo el volumen de la mezcla de hibridación. La gradilla para microtubos flotará en el baño María.

**Nota:** Cree un diseño de placa por medio del software de análisis de ensayos *digene* si no lo ha hecho antes.

## CAPTURA DE LOS HÍBRIDOS

1. Extraiga del bastidor de placa todos los pocillos de la microplaca de captura que no sean necesarios. Devuelva los pocillos de la microplaca que no haya utilizado a la bolsa original y séllela de nuevo. Con un rotulador, numere cada columna como 1, 2 y 3. . . . y rotule la microplaca con un identificador apropiado. Las muestras se añadirán a los pocillos conforme al ejemplo de diseño de placa preparado en *Setup*.
2. Extraiga con cuidado la microplaca de hibridación que contiene los calibradores, los controles y las muestras del Microplate Heater I. Quite inmediatamente la tapa de placa y colóquela sobre una superficie limpia. De forma alternativa, extraiga la gradilla para microtubos del baño María. Quite inmediatamente la tapa de gradilla y tire lentamente del sellador de placas hacia arriba a través de la gradilla.
3. Transfiera el contenido completo (aproximadamente 100  $\mu$ l) de los calibradores, los controles de calidad y las muestras de los pocillos de la microplaca de hibridación o de los microtubos al fondo del pocillo correspondiente de la microplaca de captura utilizando una pipeta de 8 canales. Utilice puntas de pipeta nuevas en la pipeta de 8 canales para cada columna transferida y deje que escurra bien cada punta de pipeta para asegurarse de transferir completamente la muestra. Si lo desea, puede estabilizar la pipeta apoyando **la parte central** de las puntas de pipeta en el borde superior de los pocillos de la microplaca de captura (consulte el *Diagrama 1*).

### DIAGRAMA 1: PIPETEO CORRECTO



4. Cubra la microplaca de captura con la tapa de placa o con sellador de placas y agítela en el Rotary Shaker I a  $1.100 \pm 100$  rpm, a una temperatura de 20 °C a 25 °C, durante  $60 \pm 5$  minutos.
5. Prepare el tampón de lavado y compruebe los depósitos de enjuague y de residuos del Automated Plate Washer durante esta incubación. Consulte el apartado Preparación y conservación de los reactivos.
6. Una vez finalizado el paso de captura, extraiga la microplaca de captura del Rotary Shaker I y retire con cuidado la tapa de placa o el sellador de placas. Vacíe en un fregadero el líquido de los pocillos; invierta completamente la placa sobre el fregadero y sacúdala enérgicamente con un movimiento hacia abajo, teniendo cuidado de no decantar demasiado cerca del fondo del fregadero para que no salpique. **No vuelva a invertir la placa**; seque dando firmemente 2 o 3 golpes suaves sobre toallitas Kimtowels limpias o sobre hojas de papel absorbente sin pelusa

equivalentes. Asegúrese de eliminar todo el líquido de los pocillos y de que la parte superior de la placa esté seca.

## DETECCIÓN DE LOS HÍBRIDOS

### Notas:

- Realice las adiciones en la placa de izquierda a derecha utilizando una pipeta de 8 canales.
  - Se recomienda utilizar la técnica de pipeteo inverso para mejorar la uniformidad de la dispensación de los reactivos. Con esta técnica, las puntas de pipeta se llenan inicialmente en exceso utilizando el segundo tope del control de aspiración/dispensación (émbolo) de la pipeta. Consulte el procedimiento a continuación. Limpie las puntas en el depósito desechable para reactivos para eliminar el exceso de reactivo antes de dispensarlo en la placa.
  - Si lo desea, puede estabilizar la pipeta apoyando la parte central de las puntas de pipeta en el borde superior de los pocillos de la microplaca. Tenga cuidado de no tocar las paredes de los pocillos de la microplaca, ya que esto podría producir la contaminación cruzada de las muestras. Consulte el Diagrama 1 mostrado anteriormente.
1. Transfiera el volumen adecuado del reactivo de detección 1 a un depósito desechable para reactivos (consulte el apartado *Preparación y conservación de los reactivos* si desea obtener instrucciones al respecto). Con una pipeta de 8 canales y utilizando la técnica de pipeteo inverso, pipetee con cuidado 75 µl del reactivo de detección 1 en cada pocillo de la microplaca de captura.

Procedimiento de pipeteo inverso:

- a) Acople puntas a una pipeta de ocho canales; asegúrese de que todas las puntas estén firmemente ajustadas.
  - b) Presione el émbolo de la pipeta más allá del primer tope hasta el segundo tope.
  - c) Sumerja las puntas en la solución del reactivo de detección 1.
  - d) Suelte el émbolo lentamente y deje que la solución llene las puntas.
  - e) Dispense la solución en los pocillos de la microplaca (75 µl) presionando el émbolo hasta el primer tope. No suelte el émbolo hasta que las puntas de pipeta se hayan sumergido de nuevo en la solución del reactivo de detección 1.
  - f) Vuelva a llenar las puntas y repita el proceso hasta que todos los pocillos estén llenos. Llene los pocillos de la microplaca de izquierda a derecha. Observe la intensidad del color rosa para asegurarse de que se han llenado todos los pocillos. Todos los pocillos deberían tener una intensidad similar.
2. Cubra las placas con una tapa de placa o con Parafilm limpio (o equivalente) e incúbelas a una temperatura de 20 °C a 25 °C durante 30 a 45 minutos.

## LAVADO

Lave la placa de captura utilizando uno de los dos métodos siguientes.

### Método del Automated Plate Washer

**Nota:** Mantenga siempre el Automated Plate Washer **ENCENDIDO**. Asegúrese de que el depósito de enjuague está lleno y de que el depósito de residuos está vacío. El Automated Plate Washer enjuagará sistemáticamente el sistema para limpiarlo. Consulte el documento "Automated Plate Washer Manual del usuario" si desea obtener más instrucciones en caso necesario.

### ANTES DE CADA USO:

- Asegúrese de que el depósito de lavado está relleno hasta al menos la marca de 1 litro con solución de tampón de lavado. Si no es así, prepare la solución de tampón de lavado. Consulte el apartado Preparación y conservación de los reactivos.
- Asegúrese de que el depósito de enjuague está relleno con agua desionizada o destilada.
- Asegúrese de que el depósito de residuos está vacío y de que la tapa está bien ajustada.
- El Automated Plate Washer realiza automáticamente un cebado antes de cada lavado y un enjuague después de cada lavado.

1. Retire la tapa de placa y coloque la placa en la plataforma del Automated Plate Washer.
2. Asegúrese de que el aparato está encendido y de que la pantalla indica “Digene Wash Ready” (Lavado de digene listo) o “P1”.
 

**Nota:** Si únicamente se va a utilizar una tira parcial de pocillos de captura, será necesario colocar pocillos de microplaca vacíos en la placa de captura para completar la columna antes del lavado.
3. Seleccione el número de tiras que desea lavar pulsando la tecla “Rows” (Filas) y, a continuación, “+” o “-” para ajustar el valor. Pulse la tecla “Rows” para volver a la pantalla “Digene Wash Ready” o “P1”.
4. Pulse “Start/Stop” (Iniciar/Parar) para comenzar.
5. El lavador realizará 6 ciclos de llenado y aspiración con una duración aproximada de 10 minutos. Tendrá lugar una breve pausa durante el programa; no extraiga la placa antes de tiempo. Cuando el Automated Plate Washer haya finalizado el lavado, se mostrará el mensaje “Digene Wash Ready” o “P1”.
6. Cuando termine el programa, retire la microplaca del lavador. La placa debería tener un color blanco, sin restos de líquido rosa en los pocillos de la microplaca.

### Método de lavado manual

1. Elimine el reactivo de detección 1 de los pocillos colocando toallitas Kimtowels limpias u hojas de papel absorbente sin pelusa equivalentes sobre la placa e invirtiendo la placa con cuidado. Antes de invertirla, asegúrese de que el papel absorbente esté en contacto con toda la superficie de la placa. Deje escurrir la placa durante 1 a 2 minutos. Seque bien la placa con toallitas Kimtowels limpias o con hojas de papel absorbente sin pelusa equivalentes. Deseche con cuidado las hojas de papel absorbente usadas para evitar la contaminación con fosfatasa alcalina en los pasos siguientes.
2. Con el aparato de lavado, lave la placa manualmente 6 veces. Cada pocillo debe lavarse hasta que rebose el líquido con el fin de eliminar el reactivo de detección 1 de la parte superior de los pocillos. El lavado se inicia en el pocillo A1 y continúa en zigzag hacia la derecha y hacia abajo. Una vez llenados todos los pocillos, decante el líquido en el fregadero con un movimiento enérgico hacia abajo. El segundo lavado se inicia en el pocillo H12, avanzando en zigzag hacia la izquierda y hacia arriba. Esta secuencia de 2 lavados se repite 2 veces más hasta un total de 6 lavados por pocillo.
3. Después del lavado, seque la placa invirtiéndola sobre toallitas Kimtowels limpias u hojas de papel absorbente sin pelusa equivalentes y dando 3 o 4 golpecitos firmes. Sustituya las hojas de papel absorbente y seque la placa de nuevo. Deje la placa invertida y espere 5 minutos a que escurra. Seque nuevamente la placa.
4. La placa debería tener un color blanco, sin restos de líquido rosa en los pocillos de la microplaca.

### AMPLIFICACIÓN DE LA SEÑAL

#### NOTAS:

- Utilice un par de guantes nuevos para manipular el reactivo de detección 2.
- Transfiera **solamente** la cantidad de reactivo necesaria para realizar el ensayo al depósito desechable para reactivos con el fin de evitar la contaminación del reactivo de detección 2. Consulte el apartado “Preparación de los reactivos”. **No devuelva el reactivo de detección 2 al frasco original. Después de utilizar el reactivo, deseche el material que no se haya usado.**
- El reactivo de detección 2 debe añadirse de forma ininterrumpida. El tiempo de incubación de todos los pocillos debe ser lo más parecido posible.

- Tenga cuidado de no tocar la pared de los pocillos de la microplaca ni salpicar el reactivo sobre las puntas de pipeta, ya que podría producirse una contaminación cruzada de las muestras (consulte el *Diagrama 1*).
1. Con una pipeta de 8 canales, dispense con cuidado 75  $\mu$ l del reactivo de detección 2 en cada pocillo de la microplaca de captura tal como se ha descrito anteriormente. *Todos los pocillos de la microplaca deberían adquirir un color amarillo*. Observe la intensidad del color para asegurarse de que se han llenado todos los pocillos. Todos los pocillos deberían tener una intensidad similar.
  2. Cubra las microplacas con una tapa de placa o con Parafilm limpio (o equivalente) e incúbelas a una temperatura de 20 °C a 25 °C durante 15 minutos. Evite la exposición a la luz directa del sol.
  3. Lea la microplaca en el instrumento DML después de 15 minutos (pero no más de 30 minutos) de incubación.
  4. El protocolo del software específico del ensayo permitirá la introducción de información relevante del ensayo directamente en el software.
  5. Si no se ha utilizado una microplaca completa, retire los pocillos de la microplaca usados del soporte de la microplaca, enjuague bien el soporte con agua destilada o desionizada, séquelo y resérvelo para el siguiente ensayo.

## CRITERIOS PARA VERIFICAR LA CALIBRACIÓN DEL ENSAYO

La verificación de la calibración del ensayo se realiza para confirmar que los reactivos y los calibradores y controles de calidad suministrados funcionan correctamente, permitiendo así una determinación exacta del valor de corte del ensayo. La prueba *digene* HC2 HPV DNA requiere una calibración con cada ensayo, por lo que es necesario verificar cada ensayo empleando los criterios indicados a continuación. Este procedimiento de verificación no está destinado a reemplazar la prueba de control de calidad interno. Los protocolos de ensayo del software de análisis de ensayos *digene* verifican automáticamente los criterios indicados a continuación.

### 1. Calibrador negativo

El calibrador negativo debe analizarse por triplicado en cada ensayo. La media del calibrador negativo debe ser  $\geq 10$  y  $\leq 250$  RLU para poder continuar. Los resultados del calibrador negativo deberían mostrar un coeficiente de variación (%CV)  $\leq 25\%$ . Si el %CV es  $> 25$ , descarte como valor atípico el valor de RLU que más se aleje de la media y vuelva a calcular la media con los dos valores restantes. Si la diferencia entre la media y cada uno de los dos valores es  $\leq 25\%$ , continúe en el paso 2. De lo contrario, la verificación de la calibración del ensayo no es válida y es necesario repetir el ensayo con todas las muestras de pacientes. En este caso, no deberán comunicarse los resultados de las muestras de pacientes.

### 2. Calibradores

Los calibradores deben analizarse por triplicado con cada ensayo. Si se utiliza el método CPC, ambos calibradores deben analizarse por triplicado. Los resultados del calibrador deberían mostrar un coeficiente de variación (%CV)  $\leq 15\%$ . Si se utiliza el método CPC, el %CV de LRC, HRC y LRC-HRC combinados debe ser  $\leq 15\%$ . Si el %CV es  $> 15$ , descarte como valor atípico el valor de RLU del calibrador que más se aleje de la media y vuelva a calcular la media con los dos valores restantes del calibrador. Solamente puede eliminarse 1 duplicado de LRC y 1 duplicado de HRC. Si el %CV de los calibradores es  $\leq 15\%$ , continúe en el paso 3. De lo contrario, la verificación de la calibración del ensayo no es válida y es necesario repetir el ensayo con todas las muestras de pacientes. En este caso, no deberán comunicarse los resultados de las muestras de pacientes.

El software de análisis de ensayos *digene* realiza automáticamente la verificación de la calibración del ensayo anteriormente descrita para los calibradores e imprime los resultados en el informe de análisis de los datos. **Los protocolos de análisis de ensayos *digene* para el VPH comprueban automáticamente que el %CV de los calibradores para VPH de alto riesgo y de bajo riesgo es  $\leq 15\%$ .** Sin embargo, las versiones v1.0.2 y v1.0.3 del software de análisis de ensayos *digene* NO invalidará el ensayo a menos que el %CV sea  $> 25\%$  para los calibradores. Por consiguiente, el usuario debe comprobar manualmente que el %CV calculado por el software de análisis de ensayos *digene* es  $\leq 15\%$  y proceder tal como se indica para la situación 1 en la tabla siguiente. Si el %CV de los duplicados del calibrador se encuentra entre 15 y 25, consulte las instrucciones para las situaciones 2 o 3 en la tabla siguiente y proceda con la “acción del usuario” indicada.

Situación	%CV comunicado para los duplicados de LRC y/o HRC	Acción realizada por el software de análisis de ensayos <i>digene</i>	Acción del usuario
1	≤ 15%	Ensayo clasificado como "Valid" (Válido)	Los resultados se pueden comunicar; no se necesita ninguna otra acción.
2	Entre 15% y 25%	No se ha eliminado ningún valor atípico y el ensayo se clasifica como "Valid"	Elimine el valor de RLU del calibrador que más se aleje de la media. Vuelva a calcular el %CV del calibrador con los dos valores restantes. Si el %CV de los valores de RLU restantes es > 15%, el ensayo no es válido. Los resultados no deben comunicarse. Si el %CV de los valores de RLU restantes es ≤ 15%, vuelva a calcular el valor de corte del ensayo y, a continuación, vuelva a calcular el cociente RLU/valor de corte de cada muestra utilizando este valor de corte. Estos valores recalculados pueden comunicarse.
3	Entre 15% y 25%	Se ha eliminado un valor atípico por calibrador y el ensayo se clasifica como "Valid"	El ensayo no es válido. Los resultados no deben comunicarse. Debe repetirse el ensayo.
4	> 25%	Se ha eliminado un valor atípico y el ensayo se clasifica como "Invalid"	El ensayo no es válido. Los resultados no deben comunicarse. Debe repetirse el ensayo.

Para calcular manualmente el %CV tal como se requiere en la situación 2 anterior, el usuario debe dividir la desviación estándar (STDEV) (n-1) de los valores de RLU de los duplicados restantes entre la media de dichos valores (LRC, HRC o ambos) y multiplicar el resultado por 100.

Para calcular el %CV con Microsoft® Excel® (suministrado con la versión anterior del software de análisis de ensayos *digene*), el usuario puede calcular la desviación estándar de los duplicados del calibrador utilizando la fórmula *STDEV* y determinar el valor medio de RLU del calibrador utilizando la fórmula *AVERAGE*. Una vez obtenidos estos dos valores, divida *STDEV* entre *AVERAGE* y multiplique el resultado por 100 para obtener el %CV.

$$(STDEV/AVERAGE) * 100 = \%CV$$

**Si tiene dudas sobre cómo calcular los %CV, cómo volver a calcular el valor de corte del ensayo o cómo volver a calcular el cociente RLU/valor de corte de las muestras, llame a su representante local de QIAGEN.**

Para determinar la reproducibilidad del calibrador y calcular la frecuencia con la que puede ser necesario volver a hacer los cálculos manualmente se recopilaron los resultados de tres evaluaciones clínicas con 152 series analíticas realizadas con la prueba *digene* HC2 HPV DNA. Los resultados mostraron que la media del %CV de estas 152 series analíticas fue de 8,1. Considerando los tres duplicados del calibrador para cada serie analítica, se observó una reproducibilidad del calibrador con un %CV > 15% solamente en 17 de las 152 series analíticas (11,2%); 10 de estas 17 series analíticas produjeron resultados de %CV entre el 15% y el 25% (situación 2). Para las 17 series analíticas que dieron lugar a un %CV > 15, se eliminó 1 valor atípico y se volvió a calcular el %CV. Siguiendo la acción del usuario para la situación 2, solamente una de las series analíticas continuó mostrando un %CV > 15, lo cual invalidó la serie analítica. Se calculó el %CV de las 151 series analíticas restantes, obteniéndose una media del %CV de 6,0.

- Los resultados de la media del calibrador (LRC o HRC) y del calibrador negativo (NC) se utilizan para calcular el cociente LRC/NC o HRC/NC de cada sonda. Las versiones anteriores (V1.0.2 y V1.0.3) de los protocolos del software de análisis de ensayos *digene* no calculan correctamente los intervalos aceptables. Estos cocientes deben cumplir los criterios siguientes para verificar la calibración del ensayo antes de que se puedan interpretar los resultados de las muestras:

MÉTODO CPC	MÉTODO DE DOS SONDAS
Verificación de la calibración del ensayo Intervalos aceptables	Verificación de la calibración del ensayo Intervalos aceptables
$2,0 \leq LRC\bar{x} / NC\bar{x} \leq 15$	$2,0 \leq LRC\bar{x} / NCLR\bar{x} \leq 15$ (lado LR)
$2,0 \leq HRC\bar{x} / NC\bar{x} \leq 15$	$2,0 \leq HRC\bar{x} / NCHR\bar{x} \leq 15$ (lado HR)
$2,0 \leq (LRC \text{ y } HRC) \bar{x} / NC\bar{x} \leq 15$	

4. Calcule los cocientes  $LRC\bar{x}/NC\bar{x}$  o  $HRC\bar{x}/NC\bar{x}$  apropiados para cada juego de sondas. Si los cocientes son  $\geq 2,0$  y  $\leq 15$ , continúe con el paso siguiente. Si alguno de los cocientes es  $< 2,0$  o  $> 15$ , **el ensayo no es válido para esa sonda específica y debe repetirse**. Repita el análisis de todas las muestras de pacientes de la serie analítica.

**Nota:** Se han establecido intervalos aceptables para el calibrador negativo y para los calibradores positivos únicamente para instrumentos DML.

## CÁLCULO DEL VALOR DE CORTE

Una vez que se ha validado un ensayo conforme a los criterios anteriores, los valores de corte para determinar las muestras positivas se calculan de la siguiente manera:

- 1) Método del cóctel de sondas combinadas:  $\frac{(\text{duplicados de LRC} + \text{duplicados de HRC})}{\text{N.º de duplicados}}$
- 2) Método de dos sondas: Valor de corte de la sonda de VPH de bajo riesgo =  $\text{LRC}\bar{x}$   
 Valor de corte de la sonda de VPH de alto riesgo =  $\text{HRC}\bar{x}$

Ejemplo de cálculo del valor de corte					
Para:		Sonda de VPH de bajo o de alto riesgo Método de dos sondas	Sonda de VPH de bajo riesgo Método CPC	Sonda de VPH de alto riesgo Método CPC	Sondas de VPH combinadas Método CPC
	Valores de RLU de NC	Valores de RLU de LRC o HRC	Valores de RLU de LRC	Valores de RLU de HRC	Valores de RLU de LRC y HRC
	97	312	330	235*	330
	101	335	305	295	305
	91	307	385	279	385
					295
					235*
					279
<b>Media del valor de RLU</b>	96	318	340	287*	318,8*
%CV	4,9	4,7	12,0	3,9*	13,0
$\text{LRC}\bar{x}/\text{NC}\bar{x}$	N/D	3,31	3,54	3,00	3,32

La media del valor de RLU para el calibrador positivo determina el valor de corte del ensayo. Por consiguiente, el valor de corte es  $(\text{LRC}\bar{x}) = 318$ .

\* La media del %CV de los 6 duplicados fue de 16,8. Se eliminó como valor atípico el duplicado con valor de 235. El %CV del resto de los duplicados fue de 13,0, con una media de 318,8. El %CV inicial de HRC fue de 11,5.

Todos los valores de RLU de las muestras deben convertirse a un cociente respecto del valor de corte correspondiente. Por ejemplo, todos los ensayos realizados con la sonda de VPH de bajo riesgo deben expresarse como RLU de la muestra/valor de corte de riesgo bajo. Lo mismo puede hacerse con las muestras analizadas con la sonda VPH de alto riesgo o con la sonda CPC.

**Notas:** Los valores de RLU/CO y los resultados positivos/negativos de todas las muestras se comunican en el *Data Analysis Report* (Informe de análisis de los datos) del instrumento DML.

En el caso de la aplicación del instrumento Rapid Capture System, el protocolo de software del RCS para el VPH se ha programado para aplicar un factor de ajuste de calibración (CAF) de 0,8 a la media del valor de RLU de los duplicados válidos del calibrador positivo. Este CAF es necesario para que las características de rendimiento del ensayo permanezcan equivalentes al procedimiento de análisis manual. Este cambio solo se aplica a ensayos realizados mediante la aplicación del instrumento Rapid Capture System. Por consiguiente, es fundamental seleccionar el protocolo de software correcto para cada método de ensayo específico para poder generar resultados exactos del ensayo. Todos los valores de RLU de las muestras deben convertirse a un cociente respecto del valor de corte (CO) correspondiente. Por ejemplo, todos los ensayos deben expresarse como valor de RLU/CO de la muestra.



## CONTROL DE CALIDAD

Con la prueba *digene* HC2 HPV DNA se suministran muestras de control de calidad. Consulte el manual del usuario correspondiente si desea instrucciones acerca de cómo introducir los números de lote y las fechas de caducidad de los controles de calidad. Estos controles de calidad deben incluirse en cada serie analítica y el valor de RLU/CO de cada control de calidad debe estar dentro de los siguientes intervalos aceptables para que la serie analítica se considere válida. **Si los controles de calidad están fuera de estos intervalos, el ensayo no es válido y debe repetirse.** En consecuencia, no se deben comunicar los resultados de pacientes de ninguna serie analítica no válida.

Control de calidad	Tipo de VPH	Resultado esperado (RLU/valor de corte) Sonda de VPH de bajo riesgo			
		Mínimo	Máximo	Media	%CV
QC1-LR	Bajo riesgo (VPH 6)	2	8	5,0	25
QC2-HR	Alto riesgo (VPH 16)	0,001	0,999	0,5	25

Control de calidad	Tipo de VPH	Resultado esperado (RLU/valor de corte) Sonda de VPH de alto riesgo			
		Mínimo	Máximo	Media	%CV
QC1-LR	Bajo riesgo (VPH 6)	0,001	0,999	0,5	25
QC2-HR	Alto riesgo (VPH 16)	2	8	5,0	25

Control de calidad	Tipo de VPH	Resultado esperado (RLU/valor de corte) Sonda CPC de VPH			
		Mínimo	Máximo	Media	%CV
QC1-LR	Bajo riesgo (VPH 6)	2	8	5,0	25
QC2-HR	Alto riesgo (VPH 16)	2	8	5,0	25

1. Los materiales de control de calidad suministrados con el kit son dianas de ADN del VPH clonadas y no proceden de VPH de tipo natural (*wild-type*). Este es el mismo tipo de material utilizado para los calibradores suministrados con la prueba *digene* HC2 HPV DNA.
2. El material de control de calidad no servirá como control apropiado para el procesamiento de la solución PreservCyt ni de la solución conservante SurePath.
3. Los controles de calidad suministrados con este kit deben utilizarse para el control de calidad interno. Se pueden analizar otros controles de calidad conforme a las directrices o los requisitos de las normativas locales o nacionales o de las organizaciones de acreditación.

## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LAS MUESTRAS

**Nota:** El valor de corte de la prueba *digene* HC2 HPV DNA de 1 pg/ml equivale a 100.000 copias de VPH/ml o 5.000 copias de VPH por ensayo.

1. Las muestras recogidas en STM con cocientes RLU/valor de corte  $\geq 1,0$  **con la sonda de VPH de bajo riesgo únicamente** se consideran “positivas” para uno o más de los tipos 6, 11, 42, 43 o 44 del VPH.
2. Las muestras recogidas en STM con cocientes RLU/valor de corte  $\geq 1,0$  **con la sonda de VPH de alto riesgo únicamente** se consideran “positivas” para uno o más de los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 del VPH.
3. Cuando se analizan muestras recogidas en PreservCyt, si el cociente RLU/CO de una muestra es  $\geq 1,0$  y  $< 2,5$ , QIAGEN recomienda repetir el análisis de la muestra. Si el resultado inicial de la repetición de la prueba es positivo (RLU/CO  $\geq 1,0$ ), la muestra puede clasificarse como positiva, sin necesidad de realizar ninguna prueba adicional. Sin embargo, si el resultado de la primera repetición de la prueba es negativo ( $< 1,0$ ), es preciso realizar una segunda repetición de la prueba (tercer resultado) para generar un resultado final. El resultado de la segunda repetición de la prueba se considerará el resultado final y es el que se comunicará.
4. Si el cociente RLU/valor de corte de una muestra está próximo a 1,0 pero es inferior a dicho valor y existe sospecha de una infección por VPH de alto riesgo, debe considerarse el uso de otros métodos de ensayo y/o repetir la prueba para esa muestra.
5. Las muestras recogidas en STM con cocientes RLU/valor de corte  $\geq 1,0$  para la sonda de VPH de bajo riesgo y para la sonda de VPH de alto riesgo se consideran “positivas” para uno o más tipos de VPH de cada grupo de sondas.
6. Las muestras recogidas en STM con cocientes RLU/valor de corte  $\geq 1,0$  para el cóctel de sondas combinadas se consideran positivas para uno o más de los tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 del VPH.
7. Las muestras con cocientes RLU/valor de corte  $< 1,0$  para el cóctel de sondas combinadas o para la sonda de VPH de bajo riesgo y la sonda de VPH de alto riesgo se consideran “negativas” o “sin detección de ADN del VPH” para los 18 tipos de VPH analizados. No hay secuencias de ADN del VPH en la muestra o los niveles de ADN del VPH son inferiores al límite de detección del ensayo.

## CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

### DATOS QUE RESPALDAN LA INDICACIÓN PARA EL VPH DE BAJO RIESGO Y DE ALTO RIESGO

#### Cribado de pacientes con resultados de ASC-US en la citología cervicovaginal para determinar la necesidad de derivación para la realización de una colposcopia

En 1996 se llevó a cabo en Estados Unidos un estudio titulado "Utility of HPV DNA Testing for Triage of Women with Borderline Pap Smears" (Utilidad del análisis de ADN del VPH para el cribado de mujeres con citología cervicovaginal dudosa) bajo la dirección del Kaiser Foundation Research Institute y el Kaiser Permanente Medical Group. Se obtuvieron muestras cervicouterinas para la realización de una citología cervicovaginal sistemática y de la prueba *digene* HC2 HPV DNA de mujeres que acudían a varios centros clínicos Kaiser. Las pruebas de Papanicoláu iniciales se evaluaron conforme a la clasificación de Bethesda. Para conocer la terminología equivalente para el cribado del cáncer de cuello uterino en la Comunidad Europea, consulte el documento *European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening* (Directrices europeas para el aseguramiento de la calidad en el cribado del cáncer de cuello uterino)<sup>40</sup>. Las mujeres (de 15 años o más) con resultados en la citología cervicovaginal de células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US, *atypical squamous cells of undetermined significance*) volvieron al centro para la realización de una colposcopia y una biopsia. Anatomopatólogos examinaron las muestras histológicas dirigidas por colposcopia y se realizó un diagnóstico inicial. Un anatomopatólogo independiente revisó también las muestras histológicas y un tercer anatomopatólogo resolvió las discrepancias entre la revisión inicial y la revisión independiente.

Se realizó el análisis de ADN del VPH en la muestra inicial y solamente se utilizó la sonda de VPH de alto riesgo. El análisis de ADN del VPH se realizó con un prototipo de la prueba *digene* HC2 HPV DNA que contenía sondas para 11 de los 13 tipos del VPH incluidos en la sonda de VPH de alto riesgo, pero que no contenía sondas para los tipos 59 y 68 de VPH. No cabe prever que esta diferencia produjera diferencias significativas en los perfiles de rendimiento de los dos ensayos.

Se obtuvieron resultados de la prueba de VPH y diagnósticos histológicos de 885 mujeres con un resultado de ASC-US en la citología cervicovaginal. El análisis de la mayoría de las pacientes se llevó a cabo con muestras recogidas en STM y en la solución PreservCyt. Debido a las semejanzas entre las características de rendimiento de la prueba *digene* HC2 HPV DNA para los medios STM y PreservCyt, se presenta el rendimiento del ensayo únicamente para la solución PreservCyt.

La tabla 3 muestra que, entre las pacientes que tenían un resultado de ASC-US en la citología cervicovaginal motivo de derivación, el valor predictivo de un resultado negativo de la prueba *digene* HC2 HPV DNA de presentar HSIL o enfermedad de grado mayor en la colposcopia es del 99%.

**Tabla 3**  
**Comparación de la prueba *digene* HC2 HPV DNA con el examen histológico de consenso**  
**Población con un resultado de ASC-US en la citología cervicovaginal motivo de derivación**  
**Estudio Kaiser, muestras recogidas en solución PreservCyt**

	HSIL o enfermedad superior en el momento de la colposcopia			
		+	-	Total
VPH de alto riesgo	+	66	317	383
	-	5	497	502
	Total	71	814	885

Sensibilidad (PT/[PT+NF]) = 93,0% (66/71)

IC del 95% = 84,3 a 97,7

Especificidad (NT/[NT+PF]) = 61,1% (497/814)

IC del 95% = 57,7 a 64,4

Prevalencia de la enfermedad = 8,0% (71/885)

Valor predictivo de un resultado positivo del ensayo = 17,2% (66/383)

Valor predictivo de un resultado negativo del ensayo = 99,0% (497/502)

La tabla 4 muestra el valor predictivo teórico de un resultado positivo y de un resultado negativo basado en distintas prevalencias para un ASC-US inicial con un resultado de HSIL o superior basado en los resultados de la sonda de VPH de alto riesgo.

**Tabla 4**  
**Valor predictivo teórico de un resultado positivo y de un resultado negativo**  
**Sonda de VPH de alto riesgo**  
**Resultados de ASC-US en la citología cervicovaginal**

Prevalencia teórica para HSIL	Resultado inicial de ASC-US en la citología cervicovaginal	
	Valor predictivo de un resultado positivo del ensayo	Valor predictivo de un resultado negativo del ensayo
5	11,2	99,4
10	21,0	98,7
15	29,7	98,0
20	37,4	97,2
25	44,3	96,3
30	50,6	95,3

En la tabla 5 se muestra la variación entre los distintos grupos de edad incluidos en este estudio:

**Tabla 5**  
**Datos del estudio de Kaiser**  
**Rendimiento de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA en comparación con el examen histológico de consenso**  
**Resultados (HSIL)**  
**Características específicas de la edad**

	Edad < 30	Edad 30-39	Edad > 39
<b>n</b>	287	233	365
<b>Prevalencia de la enfermedad (%)</b>	12,2	11,2	2,7
<b>Sensibilidad (%)</b>	100,00 (35/35)	88,46 (23/26)	80,00 (8/10)
Intervalo de confianza del 95%	90,0-100	69,9-97,6	44,4-97,5
<b>Especificidad (%)</b>	31,4 (79/252)	66,2 (137/207)	79,15 (281/355)
Intervalo de confianza del 95%	25,7-37,5	59,3-72,6	74,6-83,3
<b>Valor predictivo de un resultado negativo (%)</b>	100 (79/79)	97,86 (137/140)	99,29 (281/283)
<b>Valor predictivo de un resultado positivo (%)</b>	16,83 (35/208)	24,73 (23/93)	9,76 (8/82)

**Sensibilidad y especificidad clínicas para la determinación del riesgo de enfermedad de grado alto en mujeres con un resultado de LSIL o HSIL en la citología cervicovaginal:**

Se llevó a cabo un estudio clínico multicéntrico con la prueba *digene* HC2 HPV DNA con muestras recogidas en varias clínicas colposcópicas grandes de centros médicos y hospitales con alta prevalencia de enfermedad cervicouterina e infección por el VPH (3 centros) en el oeste y en el sur de Estados Unidos. El análisis del VPH se realizó en 3 centros de investigación no afiliados a las clínicas colposcópicas en las que se recogieron las muestras. La población para este estudio clínico estaba compuesta por mujeres con diagnóstico de LSIL o HSIL basado en una citología cervicovaginal reciente y derivadas para una colposcopia de seguimiento. De las 702 pacientes incluidas en el estudio, 327 presentaban resultados superiores a ASC-US en la citología cervicovaginal y tenían suficiente información disponible; 96 de ellas tenían un estado final de la enfermedad de HSIL o superior. Las

muestras de células cervicouterinas exfoliadas se obtuvieron con el dispositivo *digene* HC2 DNA Collection Device y se pusieron en STM o se obtuvieron con un dispositivo de cepillado y se enjuagaron en la solución PreservCyt. Las muestras se recogieron en el momento de la colposcopia. Las muestras se analizaron con la prueba *digene* HC2 HPV DNA y los resultados se compararon con el estado de la enfermedad determinado para cada paciente. El estado de la enfermedad se basó en los resultados del examen histológico, pero en los casos en los que el examen histológico era negativo o no se disponía de un resultado histológico, el estado de la enfermedad se determinó mediante citología en el momento del examen colposcópico (consulte la *tabla 6*). La prueba *digene* HC2 HPV DNA se llevó a cabo en 3 centros médicos metropolitanos grandes no afiliados a los centros en los que se recogieron las muestras en la colposcopia. La citología se llevó a cabo en un laboratorio anatomopatológico de referencia y el examen histológico se realizó en el mismo centro en el que se realizó la colposcopia. Se compararon los resultados de la prueba con el estado de la enfermedad para evaluar la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos de un resultado negativo y de un resultado positivo de la prueba para detectar una neoplasia cervicouterina de alto grado. Debido a las semejanzas entre las características de rendimiento de la prueba *digene* HC2 HPV DNA para los medios STM y PreservCyt, se presenta el rendimiento del ensayo únicamente para la solución PreservCyt.

No se observaron diferencias en los resultados de la sonda de VPH de alto riesgo entre las muestras recogidas en STM y las recogidas en solución PreservCyt. La tabla siguiente muestra los resultados de la sonda de VPH de alto riesgo en esta población:

**Tabla 6**  
**Algoritmo del estado de la enfermedad de las pacientes**

Resultado de la citología	Resultado del examen histológico	Estado de la enfermedad
NEG	NEG o no realizado*	NEG
LSIL	NEG	LSIL
HSIL	NEG	HSIL
Cáncer	NEG	HSIL+
NEG	LSIL	LSIL
LSIL	No realizado*	LSIL
LSIL	LSIL	LSIL
HSIL	LSIL	LSIL
Cáncer	LSIL	LSIL
NEG	HSIL	HSIL
LSIL	HSIL	HSIL
HSIL	HSIL	HSIL
HSIL	No realizado*	HSIL
Cáncer	HSIL	HSIL
NEG	Cáncer	HSIL+
LSIL	Cáncer	HSIL+
HSIL	Cáncer	HSIL+
Cáncer	No realizado*	HSIL+
Cáncer	Cáncer	HSIL+

\* No se realizaron una biopsia y/o un raspado endocervical (REC) debido a que no se observaron anomalías en la colposcopia o a que no se disponía del resultado histológico.

En las tablas 7 y 8 se presenta el rendimiento de la prueba *digene* HC2 HPV DNA determinado con 327 muestras recogidas en PreservCyt, 96 de las cuales se obtuvieron de mujeres con un diagnóstico de enfermedad cervicouterina de alto grado. Las comparaciones se llevaron a cabo con todas las pacientes del estudio que tenían resultados anormales en la citología cervicovaginal motivo de derivación. Se muestran las comparaciones para las muestras recogidas en PreservCyt analizadas con la sonda de VPH de alto riesgo.

**Tabla 7**  
**Resultados de la sonda de VPH de alto riesgo**

Resultado de la citología cervicovaginal motivo de derivación	Estado final de la enfermedad						Total
	HSIL		LSIL		Negativo		
	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	
Resultados de VPH de alto riesgo							
LSIL	44	4	78	33	28	37	224
HSIL	45	3	29	14	5	7	103
<b>Total</b>	<b>89</b>	<b>7</b>	<b>107</b>	<b>47</b>	<b>33</b>	<b>44</b>	<b>327</b>
	<b>96</b>		<b>154</b>		<b>77</b>		

La tabla 8 muestra que la prueba *digene* HC2 HPV DNA con la sonda de VPH de alto riesgo demostró una sensibilidad global de aproximadamente el 93% para identificar a mujeres con neoplasia de alto grado en una población derivada para una colposcopia sobre la base de un diagnóstico de LSIL, HSIL o equivalente en la citología cervicovaginal. La prueba también demostró un valor predictivo de un resultado negativo de casi el 93% en esta población.

**Tabla 8**  
**Características del rendimiento**  
**Prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA en pacientes con un resultado en la citología cervicovaginal motivo de derivación de LSIL o superior y un estado final de la enfermedad de HSIL**

Resultado con la sonda de VPH de alto riesgo	Resultado de LSIL o HSIL en la citología cervicovaginal motivo de derivación → Enfermedad HSIL			Total
		+	-	
	+	89	140	
-	7	91	<b>98</b>	
<b>Total</b>	<b>96</b>	<b>231</b>	<b>327</b>	

Sensibilidad (PT/[PT+NF]) = 92,7% (89/96)

IC del 95% = 85,6 a 97,0

Especificidad (NT/[NT+PF]) = 39,4% (91/231)

IC del 95% = 33,1 a 46,0

Prevalencia de la enfermedad para los casos de LSIL motivo de derivación a HSIL final = 21,4%

Prevalencia de la enfermedad para los casos de HSIL motivo de derivación a HSIL final = 46,6%

Valor predictivo global de un resultado positivo = 38,9% (89/229)

Valor predictivo global de un resultado negativo = 92,8% (91/98)

Aunque la especificidad de la prueba *digene* HC2 HPV DNA parecía ser algo baja, no se prevé una correlación estricta entre la ausencia de neoplasia y un resultado de VPH negativo. El ADN del VPH puede estar presente en mujeres que no han evolucionado a una enfermedad de grado más alto. De hecho, cuando se realizó una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) del VPH (un ensayo de uso exclusivamente en investigación) con muestras con resultados positivos para el VPH y cuyo estado de enfermedad correspondiente era inferior a neoplasia de bajo grado, casi el 75% de los casos fueron positivos.

La tabla 9 indica los valores predictivos teóricos de un resultado positivo y de un resultado negativo con la sonda de VPH de alto riesgo para un LSIL o HSIL inicial con un resultado de HSIL o de enfermedad más grave en la colposcopia.

**Tabla 9**  
**Valor predictivo teórico de un resultado positivo y de un resultado negativo**  
**Sonda de VPH de alto riesgo**  
**Resultados iniciales de LSIL o HSIL en la citología cervicovaginal**

Prevalencia teórica para HSIL	Resultado inicial de LSIL o HSIL en la citología cervicovaginal	
	Valor predictivo de un resultado positivo  del ensayo	Valor predictivo de un resultado negativo  del ensayo
5	7,4	99,0
10	14,5	97,9
15	21,2	96,8
20	27,6	95,5
25	33,7	94,1
30	39,6	92,6
35	45,1	90,9
40	50,4	89,0
45	55,5	86,8
50	60,4	84,3

**DATOS QUE RESPALDAN LA INDICACIÓN PARA EL CRIBADO PRIMARIO DEL VPH DE ALTO RIESGO**

**Rendimiento clínico en el cribado de pacientes con resultados normales en la citología cervicovaginal como ayuda en la evaluación del riesgo para el tratamiento de las pacientes**

A continuación se describen los resultados de ocho estudios clínicos independientes realizados por instituciones médicas, académicas y gubernamentales destacadas en centros de Estados Unidos y de otros países. Los estudios utilizaron los métodos de la citología cervicovaginal establecidos vigentes en los países en los que se realizó el estudio. Excepto en dos casos, se utilizó el sistema de clasificación de Bethesda para interpretar los resultados de la citología cervicovaginal. Además, la enfermedad cervicouterina de alto grado se diagnosticó mediante biopsia dirigida por colposcopia en todos los estudios. Estos estudios evaluaron la utilidad clínica de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA en comparación con la citología cervicovaginal en mujeres de mayor edad (generalmente, mayores de 30-35 años). Todos los estudios menos uno realizaron también un análisis prospectivo del VPH con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Se trató de estudios transversales de cribado en la población general con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, a menos que se indique lo contrario más adelante. Como se señaló anteriormente, de los 8 estudios de cribado 2 se realizaron en Estados Unidos, 2 en Europa, 2 en Latinoamérica, 1 en África y 1 en Asia.

En las tablas 10 y 11 se resume el rendimiento de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA observado en seis estudios transversales en mujeres de 30 años de edad o más con un diagnóstico de neoplasia cervicouterina de alto grado confirmada histológicamente (que se define como NIC [neoplasia intraepitelial cervicouterina] de grado 3 o mayor).

**Tabla 10**  
**Estimaciones del rendimiento de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA**  
**Sensibilidad y especificidad**

Población	n		Sensibilidad (%)			Especificidad (%)		
			Citología sola	VPH solo	VPH + citología	Citología sola	VPH solo	VPH + citología
Europa Occidental 1	7.592		51,6 (14/27)	96,3 (26/27)	100 (27/27)	98,5 (7.453/7.565)	96,2 (275/7.565)	95,1 (7193/7.565)
		IC del 95%	32,0-71,3	81,0-99,9	87,2-100	98,2-98,8	95,7-96,6	94,6-95,6
Latinoamérica 1	6.115		58,4 (45/77)	94,8 (73/77)	97,4 (75/77)	98,7 (5.962/6.038)	93,9 (5.669/6.038)	93,4 (5.637/6.038)
		IC del 95%	46,68-69,6	87,2-98,6	90,9-99,7	98,4-99,0	93,3-94,5	92,7-94,0
Latinoamérica 2 <sup>†</sup>	6.176		77,9 (53/68)	89,7 (61/68)	94,1 (64/68)	94,1 (5.745/6.108)	94,0 (5.742/6.108)	89,9 (5.490/6.108)
		IC del 95%	66,2-87,1	79,9-95,8	85,6-98,4	93,4-94,6	93,4-94,6	89,1-90,6
África	2.925		84,1 (90/107)	89,7 (96/107)	92,5 (99/107)	86,4 (2.436/2.818)	80,0 (2.253/2.818)	76,4 (2.152/2.818)
		IC del 95%	75,8-90,5	82,4-94,8	85,8-96,7	85,1-87,7	78,4-81,4	74,8-77,9
Asia	1.936		97,6 (41/42)	100 (42/42)	100 (42/42)	76,3 (1.445/1.894)	83,0 (1.572/1.894)	68,0 (1.287/1.894)
		IC del 95%	87,4-99,9	91,6-100,0	91,6-100,0	74,3-78,2	81,2-85,0	65,8-70,1
EE. UU. 1	1.040		50,0 (1/2)	100 (2/2)	100 (2/2)	97,6 (1.013/1.038)	96,2 (999/1.038)	95,5 (991/1.038)
		IC del 95%	1,26-98,7	15,8-100,0	15,8-100,0	96,5-98,4	94,9-97,3	94,0-96,7

<sup>†</sup>Datos de la prueba HC2 si estaban disponibles, datos del HCS en los demás casos; datos combinados.

**Tabla 11**  
**Estimaciones del rendimiento de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA**  
**Valor predictivo de un resultado positivo y de un resultado negativo**

Población	n		Prevalencia (%)	Valor predictivo de un resultado positivo (%)			Valor predictivo de un resultado negativo (%)		
				CIN 3	Citología sola	VPH solo	VPH + citología	Citología sola	VPH solo
Europa Occidental 1	7.592		0,36 (27/7.592)	11,1 (14/126)	8,23 (26/316)	6,77 (27/399)	99,83 (7.453/7.466)	99,99 (7.275/7.276)	100,0 (7.193/7.193)
		IC del 95%	0,23-0,52	6,21-17,9	5,45-11,8	4,51-9,69	99,70-99,91	99,92-100,0	99,95-100,0
Latinoamérica 1	6.115		1,26 (77/6.115)	37,2 (45/121)	16,5 (73/442)	15,8 (75/476)	99,47 (5.962/5.994)	99,93 (5.669/5.673)	99,96 (5.637/5.639)
		IC del 95%	0,99-1,57	28,6-46,4	13,2-20,3	12,6-19,4	99,25-99,63	99,82-99,98	99,87-100,0
Latinoamérica 2 <sup>†</sup>	6.176		1,10 (68/6.176)	12,7 (53/416)	14,3 (61/427)	9,4 (64/682)	99,74 (5.745/5.760)	99,88 (5.742/5.749)	99,93 (5.490/5.494)
		IC del 95%	0,86-1,39	9,69-16,3	11,1-18,0	7,30-11,8	99,57-99,85	99,75-99,95	99,81-99,98
África	2.925		3,66 (107/2925)	19,1 (90/472)	14,5 (96/661)	12,9 (99/765)	99,31 (2.436/2.453)	99,51 (2.253/2.264)	99,63 (2.152/2.160)
		IC del 95%	3,01-4,40	15,6-22,9	11,9-17,4	10,6-15,5	98,89-99,60	99,13-99,76	99,27-99,84
Asia	1.936		2,17 (42/1.936)	8,37 (41/490)	11,5 (42/364)	6,47 (42/649)	99,93 (1.445/1.446)	100,0 (1.572/1.572)	100,0 (1.287/1.287)
		IC del 95%	1,57-2,92	6,07-11,2	8,44-15,3	4,70-8,65	99,62-100,0	99,77-100,0	99,71-100,0
EE. UU. 1	1.040		0,19 (2/1.040)	3,85 (1/26)	4,88 (2/41)	4,08 (2/49)	99,90 (1.013/1.014)	100,0 (999/999)	100,0 (991/991)
		IC del 95%	0,02-0,69	0,10-19,6	0,60-16,5	0,50-14,0	99,45-100,0	99,63-100,0	99,63-100,0

<sup>†</sup>Datos de la prueba HC2 si estaban disponibles, datos del HCS en los demás casos; datos combinados.

En todos los estudios existe una superioridad uniforme y, a menudo, muy significativa de la sensibilidad de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA en comparación con la citología cervicovaginal sola. Como ocurre con la sensibilidad, el valor predictivo de un resultado negativo (VPN) del VPH es superior



al de la citología cervicovaginal sola en todos los casos, y se aproxima al 100%. Este VPN demuestra la alta probabilidad de ausencia de enfermedad cervicouterina de grado alto o cáncer en las mujeres con una citología normal sin infección por el VPH.

Aunque la especificidad de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA es inferior a la de la citología cervicovaginal sola, el análisis de la razón de posibilidades ha demostrado que la disminución de la especificidad observada no es suficientemente significativa para afectar a la utilidad clínica del uso de la prueba para identificar a mujeres que tienen un riesgo bajo o nulo de padecer en el presente o en el futuro enfermedad cervicouterina. No obstante, es importante que la decisión de derivar a una paciente para la realización de la colposcopia se base en toda la información clínica, los datos sobre el riesgo y los antecedentes de la paciente de los que disponga el médico. Son variables importantes los antecedentes de infección por el VPH y/o de resultados anormales en la citología cervicovaginal, la edad en el momento de la primera relación sexual, el número de parejas sexuales y la presencia de enfermedades de transmisión sexual concomitantes<sup>27,28</sup>.

Aunque la prevalencia de la enfermedad de grado alto no varió de forma significativa entre los estudios en los que se determinó el rendimiento, la prevalencia de la infección por VPH en una población puede afectar al rendimiento y suele variar en las distintas poblaciones de pacientes. Además, se ha demostrado que la prevalencia de la infección por el VPH disminuye drásticamente con la edad<sup>28, 30-37, 41</sup>. Los valores predictivos de un resultado positivo disminuyen cuando se analizan poblaciones con una prevalencia baja o personas con un riesgo bajo de infección.

Se realizaron análisis longitudinales con los resultados de dos estudios, uno de ellos llevado a cabo en Estados Unidos por el National Cancer Institute (NCI, Instituto Nacional del Cáncer) en Portland (Oregón) y el otro llevado a cabo en Francia en el Laboratoire Pol Bouin C.H.U. de Reims. Estos análisis longitudinales se realizaron para demostrar que las pacientes con un resultado negativo en la citología cervicovaginal y en la prueba del VPH tienen un riesgo menor de padecer enfermedad cervicouterina en comparación con las mujeres definidas tradicionalmente como de bajo riesgo en las que se desconoce el estado relativo al VPH y con las mujeres con un resultado negativo en la citología cervicovaginal y un resultado positivo en la prueba del VPH.

Los resultados de estos análisis longitudinales se muestran en las tablas 12 y 13 a continuación.

**Tabla 12**  
**Resumen de los resultados: estudios del NCI y de Francia**  
**Riesgo relativo de enfermedad de grado alto**

Grupo del estudio	Edad	Clasificación de bajo riesgo	n	Casos de CIN 3+	Tasa (por 100 pacientes-años)	Riesgo relativo (IC del 95%)
NCI	30 o más	Citología normal, VPH negativo	12.054	28	0,043	0,897 (0,596, 1,348)
		Citologías normales consecutivas*	9.429	19	0,048	1,000
	Todas	Citología normal, VPH negativo	17.594	48	0,056	0,678 (0,514, 0,894)
		Citologías normales consecutivas*	13.392	44	0,082	1,000
Francia	30 o más	Citología normal, VPH negativo	1.690	3	0,084	0,849 (0,307, 2,35)
		Citologías normales consecutivas*	2.026	4	0,099	1,000
	Todas	Citología normal, VPH negativo	2.180	3	0,066	0,491 (0,221, 1,09)
		Citologías normales consecutivas*	2.650	7	0,136	1,000

\*Tres citologías vaginales anuales normales durante aproximadamente 2 años

**Tabla 13**  
**Resumen de los resultados: estudios del NCI y de Francia**  
**Tasas de la enfermedad estratificadas por el estado basal del VPH**

Grupo del estudio	Edad	Estado basal	n	Casos de CIN 3+	Tasa (por 100 pacientes-años)	Riesgo relativo (IC del 95%)
NCI	30 o más	Citología normal, VPH positivo	1.078	24	0,451	10,50 (6,13, 18,0)
		Citología normal, VPH negativo	12.054	28	0,043	1,00
	Todas	Citología normal, VPH positivo	2.561	63	0,096	10,64 (7,33-15,5)
		Citología normal, VPH negativo	17.594	48	0,056	1,00
Francia	30 o más	Citología normal, VPH positivo	419	14	2,346	27,3 (8,41, 88,3)
		Citología normal, VPH negativo	1696	3	0,084	1,00
	Todas	Citología normal, VPH positivo	619	22	2,520	37,0 (11,8, 116)
		Citología normal, VPH negativo	2.180	3	0,066	1,00

La utilidad clínica del resultado del análisis del VPH se demuestra, además, por el aumento del riesgo de enfermedad cervicouterina en mujeres con un resultado positivo para el VPH en comparación con las mujeres que tenían un resultado negativo para el VPH.

### SENSIBILIDAD ANALÍTICA

Se analizó un panel no clínico de ADN de plásmidos de VPH clonados para determinar si la prueba *digene* HC2 HPV DNA es capaz de detectar los 18 tipos de VPH y para determinar la sensibilidad analítica del ensayo para cada tipo de VPH. Cada concentración diana del VPH (100 pg/ml, 10 pg/ml, 2,5 pg/ml, 1 pg/ml, 0,5 pg/ml y 0,2 pg/ml) de cada uno de los 18 tipos de ADN del VPH (6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 and 68) se analizó por triplicado con la sonda de VPH de bajo riesgo o con la sonda de VPH de alto riesgo, según procediera. Se calculó el valor medio de RLU de la señal para cada concentración de cada tipo de VPH y se comparó con el calibrador positivo para el lado adecuado del ensayo.

En la tabla 14 se muestra el límite de detección de cada tipo de VPH en STM. Los límites de detección variaron entre 0,62 pg/ml y 1,39 pg/ml en función del tipo de VPH analizado. Todos los tipos de VPH se detectaron a un nivel estimado de 1,09 pg de ADN de VPH diana por mililitro de muestra recogida en STM. El límite de detección medio de los 18 tipos de ADN del VPH fue de 1,09 pg/ml, con una desviación estándar de 0,05.

**Tabla 14**  
**Resumen de los límites de detección de la prueba *digene* HC2 HPV DNA**  
**para la sensibilidad para cada tipo de ADN del VPH en STM**

Tipo de ADN del VPH	Concentración detectable de ADN del VPH (pg/ml)	Desviación estándar	Intervalo de confianza del 95%
6	1,33	0,03	1,22-1,46
11	1,13	0,05	1,00-1,29
16	1,09	0,06	0,94-1,29
18	1,05	0,05	0,88-1,29

31	1,01	0,05	0,91-1,15
33	1,35	0,02	1,26-1,45
35	1,11	0,05	0,95-1,31
39	1,39	0,09	1,16-1,71
42	1,20	0,05	1,02-1,44
43	0,85	0,03	0,86-1,07
44	1,17	0,04	1,02-1,36
45	1,14	0,04	0,99-1,35
51	0,78	0,10	0,70-0,88
52	1,37	0,06	1,21-1,58
56	0,62	0,04	0,58-0,67
58	0,82	0,04	0,73-0,94
59	1,10	0,06	1,00-1,21
68	1,19	0,04	1,03-1,39
<b>Media (todos los tipos)</b>	<b>1,09</b>	<b>0,05</b>	<b>0,97-1,27</b>

### RENDIMIENTO DEL CÓCTEL DE SONDAS COMBINADAS (CPC)

Se analizó el mismo panel no clínico de ADN de plásmidos de VPH anteriormente descrito para determinar la sensibilidad analítica de cada uno de los 18 tipos de VPH en la prueba *digene* HC2 HPV DNA utilizando el protocolo de cóctel de sondas combinadas (CPC) tal como se describe en este documento. La sensibilidad analítica del protocolo CPC osciló entre 0,58 pg/ml y 1,39 pg/ml, y todos los tipos de VPH fueron detectables con un nivel estimado de 0,95 pg/ml de ADN del VPH diana por mililitro de muestra. El límite de detección medio para los 18 tipos de VPH fue de 0,95 pg/ml, con una desviación estándar de 0,07. Esta sensibilidad es equivalente a la sensibilidad analítica observada con el método de dos sondas de la prueba *digene* HC2 HPV DNA.

### EQUIVALENCIA ENTRE LAS MUESTRAS RECOGIDAS EN STM Y LAS MUESTRAS RECOGIDAS EN SOLUCIÓN PRESERVCYT

Se examinó la equivalencia entre las muestras recogidas en STM y las muestras recogidas en solución PreservCyt en cuanto a una recuperación igual del ADN del VPH 18 en aproximadamente  $10^6$  células HeLa+ que contenían genomas del VPH 18 integrados añadidas a STM y a una combinación de células negativas en solución PreservCyt. Cada tipo de muestra se procesó conforme a sus respectivos procedimientos de procesamiento/desnaturalización descritos en estas instrucciones de uso y se analizó con la prueba *digene* HC2 HPV DNA utilizando la sonda de VPH de alto riesgo. Los resultados demostraron que la recuperación de ADN del VPH 18 a partir de células de carcinoma humano es equivalente con los dos medios y que el procedimiento de preparación de las muestras recogidas en PreservCyt no afecta a la sensibilidad analítica de la prueba *digene* HC2 HPV DNA.

### CORRELACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LAS MUESTRA RECOGIDA EN SUREPATH CON LOS RESULTADOS DE LAS MUESTRAS RECOGIDAS EN STM EN UNA POBLACIÓN CLÍNICA

Se llevó a cabo una evaluación clínica en dos fases en 6 centros de recogida de muestras y 3 centros de análisis de Estados Unidos. Eran aptas para su inscripción en el estudio las pacientes que acudieron a una clínica de enfermedades de transmisión sexual (ETS), una clínica obstétrica/ginecológica, una clínica colposcópica, un hospital o un centro de planificación familiar conforme a una serie de criterios de inclusión y exclusión predeterminados. En la fase de viabilidad, cuya finalidad era determinar un valor de corte apropiado de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA para uso con muestras recogidas en SurePath, se inscribió a unas 400 pacientes. La fase de validación clínica, en la que se inscribió a unas 1.500 pacientes para validar el valor de corte del ensayo elegido, comenzó después de que un análisis intermedio de la viabilidad demostrara que un valor de corte del ensayo de 1,0 RLU/CO con muestras recogidas en SurePath dio lugar a una concordancia aceptable con los resultados de las muestras recogidas en STM.

En ambas fases de evaluación se obtuvieron muestras cervicouterinas recogidas en SurePath y en STM pareadas de cada mujer participante que otorgó su consentimiento. A continuación se envió la muestra recogida en SurePath a un laboratorio de citología para la preparación de las extensiones. Tras la preparación citológica, la muestra restante recogida en SurePath y la correspondiente muestra recogida en STM se analizaron con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA aplicando un valor de corte del ensayo de 1,0 RLU/CO.

En la tabla 15 se presenta la correlación entre los resultados de la muestra recogida en SurePath y la muestra recogida en STM correspondiente que se observó en los resultados finales elegibles para el análisis de los datos obtenidos a partir del total de la población inscrita.

**Tabla 15**  
**Concordancia de los resultados de las muestras recogidas en SurePath y en STM**  
**(todas las edades y clasificaciones citológicas)**  
**(n = 1.490)**

% de concordancia positiva IC del 95% (n/N)		% de concordancia negativa IC del 95% (n/N)	
Todos positivos	Subconjunto positivo alto (RLU/CO ≥ 2,5)	Todos negativos	Subconjunto negativo bajo RLU/CO (< 0,80)
93,5 90,7, 95,6 (401/429)	96,4 94,1, 98,0 (378/392)	95,3 93,8, 96,5 (1.011/1.061)	96,0 94,6, 97,1 (1.002/1.044)

Estos resultados predicen que la sensibilidad y la especificidad relativas del ensayo con muestras recogidas en SurePath presentan una correlación alta con las obtenidas con muestras recogidas en STM tal como indica el límite inferior del intervalo de confianza del 95% para las concordancias positiva y negativa.

## REPRODUCIBILIDAD

Se llevó a cabo un estudio multicéntrico de reproducibilidad para determinar la reproducibilidad entre días, entre centros y global de la prueba *digene* HC2 HPV DNA utilizando un panel de dianas de ADN del VPH y muestras clínicas positivas y negativas para el VPH.

Tres laboratorios externos realizaron el análisis con el mismo lote de kits *digene* HC2 HPV DNA Test en 3 días diferentes con un panel de reproducibilidad idéntico. El panel de reproducibilidad incluía las siguientes muestras: 12 combinaciones de muestras clínicas recogidas en STM desnaturalizadas, 3 combinaciones de muestras clínicas recogidas en solución PreservCyt no desnaturalizadas, un calibrador negativo y calibradores positivos de bajo y de alto riesgo en concentraciones de 0,5 pg/ml, 1 pg/ml, 2,5 pg/ml, 5 pg/ml y 10 pg/ml. Todos los componentes del panel se analizaron cada día por triplicado con el método del CPC y con el método de la sonda de HPV de alto riesgo. Los resultados se muestran en la tabla 16.

**Tabla 16**  
**Resumen de las estadísticas globales en relación con la**  
**reproducibilidad multicéntrica de la prueba *digene* HC2 HPV DNA**

<b>Parámetro estadístico</b>	<b>SONDA DE VPH DE ALTO RIESGO</b>	<b>Cóctel de sondas combinadas (CPC)</b>	<b>Resultados combinados de los métodos de sonda de VPH de alto riesgo y CPC<sup>a</sup></b>
Proporción de positivos esperados con un resultado positivo observado	100% (99,0-100,0)	99,8% (98,92-100,0)	99,9% (99,38-100,0)
Proporción de negativos esperados con un resultado negativo observado	99,0% (97,49-99,73)	98,9% (96,79-99,77)	99,0% (97,88-99,58)
Concordancia	99,5% (98,70-99,86)	99,5% (98,70-99,86)	99,5% (99,0-99,78)
Kappa	0,990	0,989	0,990

<sup>a</sup>Las cifras entre paréntesis indican los intervalos de confianza del 95%. Los datos globales son una combinación de todas las series analíticas en todos los centros.

Esto indica que la reproducibilidad de la prueba *digene* HC2 HPV DNA con muestras clínicas recogidas en STM es muy buena.

## REACTIVIDAD CRUZADA

### PANEL DE REACTIVIDAD CRUZADA

Se analizó un conjunto de bacterias, virus y plásmidos presentes habitualmente en el tracto anogenital femenino, así como un conjunto de tipos cutaneotrópicos del VPH de los que se disponía de clones, para determinar si se produciría reactividad cruzada con las sondas de VPH utilizadas en la prueba *digene* HC2 HPV DNA. Todos los microorganismos se analizaron a concentraciones de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^7$  microorganismos por mililitro. El ADN purificado de virus y plásmidos se analizó en una concentración de 4 ng/ml.

A continuación se presenta una lista de las bacterias utilizadas. Todas las bacterias mostraron un resultado negativo en la prueba *digene* HC2 HPV DNA.

<i>Acinetobacter anitratus</i>	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>
<i>Acinetobacter lwoffii</i> (ATCC 17908)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (ATCC 19424)
<i>Bacteroides fragilis</i> (ATCC 25285)	<i>Neisseria lactamica</i> (NRL 2118)
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> (ATCC 13077)
<i>Candida albicans</i> (ATCC 14053 o 10231)	<i>Neisseria sicca</i> (ATCC 29256)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 21117, 8427, 33420)
<i>Escherichia coli</i> (HB101)*	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (cepa Cowan)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Streptococcus faecalis</i> (ATCC 14508)
<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC27762)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Treponema pallidum</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
<i>Mobiluncus curtisii</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
<i>Mobiluncus mulieris</i>	
<i>Mycoplasma hominis</i>	

\* Se analizaron la cepa de *E. coli* utilizada para el crecimiento de plásmidos (HB101) y una cepa clínica de *E. coli*.

A continuación se presenta una lista del ADN viral o plasmídico y del suero humano utilizado:

Adenovirus 2	Virus del papiloma humano de tipo 1
Citomegalovirus	Virus del papiloma humano de tipo 2
Virus de Epstein-Barr	Virus del papiloma humano de tipo 3
Suero positivo para el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B	Virus del papiloma humano de tipo 4
Virus del herpes simple I	Virus del papiloma humano de tipo 5
Virus del herpes simple II	Virus del papiloma humano de tipo 8
Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH, RT-ADN)	Virus del papiloma humano de tipo 13
Virus simio de tipo 40 (SV40)	Virus del papiloma humano de tipo 30
	pBR322

Los únicos virus o plásmidos que mostraron reactividad cruzada en la prueba *digene* HC2 HPV DNA fueron el VPH de tipo 13 y el plásmido pBR322. El ADN del VPH 13 reaccionó únicamente con la sonda de VPH de bajo riesgo. El VPH 13 suele detectarse en lesiones labiales de ciertos grupos étnicos, pero no se ha detectado en el tracto anogenital<sup>29</sup>. Por tanto, no cabría esperar que la reactividad cruzada observada entre el VPH 13 y la sonda de VPH de bajo riesgo de la prueba *digene* HC2 HPV DNA causara un resultado clínicamente confuso en muestras anogenitales. La reactividad cruzada entre el pBR322 y las sondas de VPH de bajo y de alto riesgo de la prueba *digene* HC2 HPV DNA no es inesperada, ya que es difícil eliminar todo el ADN del pBR322 vectorial al aislar el inserto de VPH. Se ha descrito la presencia de secuencias homólogas al pBR322 en muestras genitales humanas, y podrían

obtenerse resultados positivos falsos en presencia de niveles altos de plásmidos bacterianos. Sin embargo, 298 muestras clínicas con un resultado positivo con las sondas de VPH de bajo riesgo y de alto riesgo de la prueba *digene* HC2 HPV DNA mostraron que no se produjo ningún resultado positivo por la presencia del pBR322 cuando se analizaron con una sonda de pBR322. Por tanto, la probabilidad de un resultado positivo falso en la prueba *digene* HC2 HPV DNA debido a secuencias homólogas al pBR322 en muestras clínicas parece ser baja.

### **HIBRIDACIÓN CRUZADA**

Cada uno de los 18 tipos de VPH se analizó con las sondas de VPH de bajo riesgo y de alto riesgo en concentraciones de 4 ng/ml de ADN del VPH. Se esperaba que todas las dianas de VPH fueran positivas con el grupo de sondas apropiado y que ninguna de las muestras fuera positiva con el otro grupo de sondas. En este estudio se demostró que existe un pequeño grado de hibridación cruzada entre los tipos 6 y 42 del VPH (tipos de VPH de bajo riesgo) y el grupo de sondas de alto riesgo (sonda de VPH de alto riesgo). Las muestras con niveles elevados (4 ng/ml o más) de ADN del VPH 6 o del VPH 42 pueden dar resultados positivos con ambos grupos de sondas. La importancia clínica de este hecho es que puede derivarse para la realización de una colposcopia a pacientes con niveles de ADN del VPH 6 o 42 iguales o superiores a 4 ng/ml.

Además, se ha demostrado que la sonda de VPH de alto riesgo presenta reactividad cruzada con los tipos 40, 53 y 66 del VPH. Estos tipos son raros y no se dispone de datos suficientes para establecer la correlación exacta entre la infección por estos tipos y la aparición de enfermedad de grado alto<sup>38</sup>. Las pacientes cuyas muestras contengan niveles altos de estos tipos del VPH pueden ser derivadas incorrectamente para la realización de una colposcopia. También existen informes en la literatura que indican que sondas complejas similares a las utilizadas en esta prueba pueden causar resultados positivos falsos debido a hibridación cruzada con los tipos 11, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 o MM9 del VPH<sup>39</sup>. Aunque varios de estos tipos de VPH son raros o son tipos nuevos que no se encuentran con frecuencia en la enfermedad de grado alto, las pacientes cuyas muestras contengan niveles altos de estos tipos de ADN del VPH pueden ser derivadas incorrectamente para la realización de una colposcopia.

### **EFFECTO DE LA SANGRE Y DE OTRAS SUSTANCIAS SOBRE LAS MUESTRAS RECOGIDAS EN STM**

Se evaluó el efecto de la sangre y de otras sustancias potencialmente interferentes definidas o no definidas en la prueba *digene* HC2 HPV DNA. Se añadieron sangre completa, productos para ducha vaginal, cremas antifúngicas y geles anticonceptivos (agentes que se pueden encontrar con frecuencia en las muestras cervicouterinas) a muestras recogidas en STM positivas y negativas (combinaciones de muestras clínicas y muestras no clínicas) en concentraciones que pueden encontrarse en las muestras cervicouterinas. No se observaron resultados positivos falsos con ninguno de los cuatro agentes a ninguna concentración. Sin embargo, puede notificarse un resultado negativo falso en muestras clínicas con niveles de ADN del VPH próximos al valor de corte positivo del ensayo (1 pg/ml) si hay niveles altos de crema antifúngica o de gel anticonceptivo en la muestra. No obstante, es muy poco probable que una muestra clínica contenga casi exclusivamente una de estas sustancias, ya que el cuello uterino se limpia sistemáticamente antes de obtener las muestras para la citología cervicovaginal y para la prueba del VPH.

### **EFFECTO DE LA SANGRE Y DE OTRAS SUSTANCIAS EN LAS MUESTRAS RECOGIDAS EN SOLUCIÓN PRESERVCYT**

Se evaluó el efecto de la sangre y de otras sustancias potencialmente interferentes definidas o no definidas que pueden estar presentes en las muestras clínicas recogidas en solución PreservCyt en la prueba *digene* HC2 HPV DNA. Se añadieron sangre completa, productos para ducha vaginal, cremas antifúngicas y geles anticonceptivos (agentes que se pueden encontrar con frecuencia en las muestras cervicouterinas) a combinaciones de muestras clínicas recogidas en PreservCyt positivas y negativas en concentraciones que pueden encontrarse en las muestras cervicouterinas. No se observaron resultados positivos falsos ni negativos falsos con ninguno de los 4 agentes a ninguna concentración. Además, las sustancias inherentes en algunas muestras clínicas no inhiben la detección del ADN del VPH con la prueba *digene* HC2 HPV DNA.

## REPRODUCIBILIDAD DE LA PRUEBA *digene* HC2 HPV DNA CON MUESTRAS CLÍNICAS RECOGIDAS EN STM

La reproducibilidad de la prueba *digene* HC2 HPV DNA con muestras clínicas recogidas en STM se determinó en un estudio con 20 combinaciones clínicas (10 positivas y 10 negativas) preparadas combinando muestras obtenidas con un cepillo cervicouterino previamente desnaturalizadas y analizadas recogidas en STM. Las muestras se analizaron por cuadruplicado cada día durante 5 días para un total de 20 duplicados por muestra. Las pruebas se realizaron con el método del cóctel de sondas combinadas. Se calcularon las medias, la desviación estándar y los intervalos de confianza (IC) del 95% en torno a la media de cada muestra en cada día y en el conjunto de los 5 días; los resultados se muestran en la tabla 17.

**Tabla 17**  
**Cociente RLU/CO medio con intervalos de confianza y porcentaje de positivos**  
**(en orden descendente en función del RLU/CO medio)**

N.º	Id. de muestra	Media de RLU/CO	IC	% de positivos
1	10	3,18	3,02-3,35	100 (20/20)
2	20	1,43	1,36-1,50	100 (20/20)
3	11	1,25	1,20-1,28	100 (20/20)
4	12	1,21	1,15-1,27	100 (20/20)
5	15	1,20	1,14-1,25	100 (20/20)
6	13	1,07	1,01-1,11	80 (16/20)
7	16	1,06	1,01-1,09	75 (15/20)
8	17	1,04	1,00-1,06	80 (16/20)
9	14	0,98	0,92-1,02	45 (9/20)
10	18	0,92	0,87-0,96	20 (4/20)
11	19	0,72	0,68-0,75	0 (0/20)
12	7	0,40	0,33-0,46	0 (0/20)
13	4	0,38	0,35-0,39	0 (0/20)
14	9	0,37	0,32-0,41	0 (0/20)
15	1	0,35	0,32-0,36	0 (0/20)
16	2	0,35	0,31-0,37	0 (0/20)
17	8	0,32	0,29-0,34	0 (0/20)
18	3	0,30	0,27-0,31	0 (0/20)
19	6	0,27	0,24-0,30	0 (0/20)
20	5	0,26	0,23-0,28	0 (0/20)

Para las 5 muestras con un RLU/CO medio al menos un 20% por encima del valor de corte (n.<sup>os</sup> 1-5), 100 de los 100 duplicados (100,0%) resultaron positivos. Para las 5 muestras con un RLU/CO medio menos de un 20% por encima o por debajo del valor de corte del ensayo (n.<sup>os</sup> 6-10), 60 de los 100 duplicados (60%) resultaron positivos y 40 de los 100 (40%) resultaron negativos. Para las 10 muestras con un RLU/CO medio más de un 20% por debajo del valor de corte del ensayo, 200 de los 200 duplicados (100%) resultaron negativos.

Así, las muestras con un RLU/CO medio al menos un 20% por encima del valor de corte fueron positivas el 100% de las veces, mientras que las muestras con un RLU/CO medio al menos un 20% por debajo del valor de corte fueron negativas el 100% de las veces, lo que indica que se puede esperar que las muestras con un valor al menos un 20% por encima o por debajo del valor de corte produzcan resultados uniformes. Las muestras próximas al valor de corte produjeron un número aproximadamente igual de resultados positivos y negativos. Estos datos demuestran que las muestras recogidas en STM producen resultados reproducibles en la prueba *digene* HC2 HPV DNA.



## REPRODUCIBILIDAD DE LA PRUEBA *digene* HC2 HPV DNA CON MUESTRAS CLÍNICAS RECOGIDAS EN SOLUCIÓN PRESERVACYT

La reproducibilidad de la prueba *digene* HC2 HPV DNA con muestras clínicas recogidas en solución PreservCyt se determinó en un estudio con 24 muestras simuladas a una concentración que cubría un intervalo de concentraciones de ADN del VPH. Las muestras estaban compuestas de solución PreservCyt y leucocitos, con y sin bacterias que contenían plásmidos del VPH 16.

Las muestras se analizaron por cuadruplicado cada día durante 5 días, obteniéndose un total de 20 duplicados por muestra. En cada uno de los 5 días del estudio, se preparó una alícuota de 8 ml a partir de cada muestra y se analizó conforme a las instrucciones de uso del kit *digene* HC2 Sample Conversion utilizando únicamente la sonda de VPH de alto riesgo. Se calcularon las medias, la desviación estándar y los intervalos de confianza (IC) del 95% de cada muestra en cada día y en el conjunto de los 5 días y de los duplicados. En la tabla 18 se presenta el RLU/CO medio, el intervalo de confianza en torno a la media y el porcentaje de duplicados positivos para cada muestra, en orden descendente en función del RLU/CO medio.

**Tabla 18**  
**Cociente RLU/CO medio con intervalos de confianza y porcentaje de positivos**  
**(en orden descendente en función del RLU/CO medio)**

N.º	N.º de muestra	Media de RLU/CO	IC	% de positivos
1	21	3,51	3,19-3,83	100 (20/20)
2	12	1,58	1,48-1,69	100 (20/20)
3	13	1,42	1,32-1,52	100 (20/20)
4	17	1,38	1,23-1,53	100 (20/20)
5	18	1,36	1,23-1,48	90 (18/20)
6	15	1,32	1,16-1,49	95 (19/20)
7	23	1,17	1,06-1,27	85 (17/20)
8	16	1,14	1,07-1,20	75 (15/20)
9	20	1,10	0,96-1,21	75 (15/20)
10	19	1,06	0,95-1,17	85 (17/20)
11	22	1,05	0,99-1,10	45 (9/19)
12	11	1,04	0,96-1,11	70 (14/20)
13	14	0,94	0,86-1,01	65 (13/20)
14	24	0,77	0,73-0,81	25 (5/20)
15	3	0,28	0,25-0,30	0 (0/20)
16	1	0,27	0,24-0,30	0 (0/20)
17	7	0,27	0,25-0,30	0 (0/20)
18	2	0,27	0,25-0,28	0 (0/20)
19	5	0,26	0,24-0,28	0 (0/20)
20	4	0,24	0,22-0,25	0 (0/20)
21	9	0,23	0,21-0,25	0 (0/20)
22	8	0,22	0,18-0,27	0 (0/20)
23	10	0,22	0,20-0,25	0 (0/20)
24	6	0,19	0,17-0,21	0 (0/20)

Para las 6 muestras con un RLU/CO medio al menos un 20% por encima del valor de corte (n.<sup>os</sup> 1-6), 114 de los 120 duplicados (95,0%) resultaron positivos. Para las 7 muestras con un RLU/CO medio menos de un 20% por encima o por debajo del valor de corte del ensayo (n.<sup>os</sup> 7-13), 88 de los 139 duplicados (63,3%) resultaron positivos y 51 de los 139 (36,7%) resultaron negativos. Para las 4 muestras con un valor menos de un 10% por encima o por debajo del valor de corte (n.<sup>os</sup> 10-13), 41 de los 79 duplicados (51,9%) fueron positivos y 38 de los 79 duplicados (48,1%) fueron negativos. Para las 11 muestras con un RLU/CO medio más de un 20% por debajo del valor de corte del ensayo, 220 de los 220 duplicados (100%) resultaron negativos.

Así, las muestras con un RLU/CO medio al menos un 20% por encima del valor de corte fueron positivas más del 95% de las veces, mientras que las muestras con un RLU/CO medio al menos un 20% por debajo del valor de corte fueron negativas el 100% de las veces, lo que indica que se puede esperar que las muestras con un valor al menos un 20% por encima o por debajo del valor de corte produzcan resultados uniformes. Las muestras próximas al valor de corte produjeron un número aproximadamente igual de resultados positivos y negativos. Estos datos demuestran que las muestras recogidas en solución PreservCyt producen resultados reproducibles en la prueba *digene* HC2 HPV DNA.

### REPRODUCIBILIDAD DE LA PRUEBA *digene* HC2 HIGH-RISK HPV DNA CON MUESTRAS RECOGIDAS EN SOLUCIÓN CONSERVANTE SUREPATH

Se llevaron a cabo evaluaciones de la reproducibilidad para caracterizar la capacidad de tres laboratorios diferentes de obtener un resultado diagnóstico similar en distintos días y con diferentes series analíticas a partir de un grupo idéntico de muestras con un estado negativo/positivo respecto del VPH conocido aplicando un valor de corte del ensayo de 1,0 RLU/CO. El panel de muestras de reproducibilidad estaba compuesto por 5 muestras positivas para el VPH, 2 muestras con concentraciones de ADN del VPH cercanas al valor de corte del ensayo y 5 muestras negativas para el VPH.

Los componentes del panel se prepararon combinando muestras de pacientes recogidas en SurePath únicas con un estado negativo/positivo en relación con el VPH conocido para obtener los valores de RLU/CO diana deseados. Se analizó cada componente del panel por duplicado, dos veces por día durante un período de cinco días en cada uno de los tres laboratorios participantes.

**Tabla 19**  
**Estudio de reproducibilidad con muestras recogidas en SurePath:**  
**Resultados cualitativos por componente del panel**

Componente del panel	RLU/CO medio	Resultado esperado	VPH positivo n (%)	VPH negativo n (%)
1	0,20	negativo	0 (0)	60 (100)
2	0,21	negativo	0 (0)	60 (100)
3	0,22	negativo	0 (0)	60 (100)
4	0,28	negativo	2 (3,3)	58 (96,7)
5	0,36	negativo	2 (3,3)	58 (96,7)
6	0,83	negativo	13 (21,7)	47 (78,3)
7	1,17	positivo	26 (43,3)	34 (56,7)
8	19,47	positivo	60 (100)	0 (0)
9	25,65	positivo	60 (100)	0 (0)
10	81,52	positivo	60 (100)	0 (0)
11	154,18	positivo	60 (100)	0 (0)
12	765,29	positivo	60 (100)	0 (0)

### REPRODUCIBILIDAD DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON MUESTRAS RECOGIDAS EN SUREPATH CUANDO SE UTILIZA EL RAPID CAPTURE SYSTEM PARA EL PROCESAMIENTO DEL ENSAYO

Se comparó la reproducibilidad de los resultados de las muestras recogidas en SurePath utilizando el Rapid Capture System para el procesamiento del ensayo con los resultados obtenidos con el procesamiento manual del ensayo. Se llevaron a cabo dos pruebas comparativas con alícuotas separadas de la misma muestra procesada.

**Tabla 20**  
**Concordancia de resultados intramuestra recogida en SurePath con el RCS**  
**(RCS frente a ensayo manual)**

% de concordancia positiva IC del 95% (n/N)		% de concordancia negativa IC del 95% (n/N)	
Todos positivos	Subconjunto positivo alto (RLU/CO $\geq$ 2,5)	Todos negativos	Subconjunto negativo bajo RLU/CO (< 0,80)
99,0 417/421 97,6, 99,7	100 375/375 99,0, 100	97,7 1.057/1.079 96,9, 98,7	98,7 1.050/1.064 97,8, 99,28

## LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Para diagnóstico *in vitro*

Consulte el *Manual del usuario de Rapid Capture System* si desea ver limitaciones adicionales del procedimiento específicas del uso de ese sistema para el análisis de volúmenes altos de muestras.

- No se recomienda usar la prueba *digene* HC2 HPV DNA para los tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 del virus del papiloma humano para la evaluación de presuntos abusos sexuales.
- La prevalencia de infección por el VPH en una población puede afectar al rendimiento. Los valores predictivos de un resultado positivo disminuyen cuando se analizan poblaciones con una prevalencia baja o personas sin riesgo de infección.
- Un resultado negativo no excluye la posibilidad de infección por el VPH, ya que niveles muy bajos de infección o un error en la toma de la muestra pueden causar un resultado negativo falso.
- La prueba *digene* HC2 HPV DNA distingue dos grupos de tipos del VPH: VPH 6/11/42/43/44 y 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68. No distingue entre los distintos tipos virales dentro de estos grupos.
- La prueba *digene* HC2 HPV DNA solo puede usarse con muestras cervicouterinas obtenidas con el dispositivo *digene* HC2 DNA Collection Device o con biopsias recogidas en STM o muestras cervicouterinas obtenidas con un dispositivo de recogida de tipo cepillo o con una combinación de escobillón/espátula e introducidas en solución PreservCyt o muestras cervicouterinas recogidas en solución conservante SurePath. Las muestras de biopsia pueden analizarse solo si se introducen inmediatamente en STM y se conservan a una temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.
- El dispositivo *digene* HC2 DNA Collection Device no debe utilizarse para la recogida de muestras de mujeres embarazadas.
- La infección por el VPH no es un indicador definitivo de la presencia de enfermedad cervicouterina de alto grado ni implica en todos los casos que se desarrollará una enfermedad de alto grado o un cáncer.
- Existe un pequeño grado de hibridación cruzada entre los tipos 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 56, MM4, MM7, MM8 y MM9 del VPH y la sonda de VPH de alto riesgo. Las pacientes cuyas muestras contengan niveles elevados de estos tipos del VPH pueden ser derivadas incorrectamente para la realización de una colposcopia<sup>38</sup>.
- La prueba *digene* HC2 HPV DNA está diseñada para detectar tipos de bajo riesgo y de alto riesgo del VPH, incluidos los tipos 39, 58, 59 y 68. Estudios analíticos realizados por QIAGEN con ADN de plásmidos de VPH clonados demuestran que este ensayo detecta estos tipos en niveles entre 0,62 pg/ml y 1,39 pg/ml. Este rendimiento es equivalente a las características de detección de los otros tipos del VPH para los que está indicada la prueba *digene* HC2 HPV DNA. QIAGEN pudo validar la detección de estos tipos del VPH únicamente en un número limitado de muestras clínicas. Debido a la baja prevalencia de estos tipos en la población general (como demostraron Bosch y cols.<sup>36</sup>), no se han confirmado estadísticamente las características de rendimiento de la prueba *digene* HC2 HPV DNA para la detección de los tipos 39, 58, 59 y 68 del VPH.
- Si existen concentraciones altas de cremas antifúngicas, geles anticonceptivos o productos para ducha vaginal en el momento de obtener una muestra para el análisis del VPH, existe la posibilidad de obtener un resultado negativo falso si estas muestras contienen niveles de ADN del VPH que producen valores de RLU/CO próximos al valor de corte del ensayo.
- Es posible la reactividad cruzada entre la sonda de la prueba *digene* HC2 HPV DNA y el plásmido pBR322. Se ha descrito la presencia de secuencias homólogas al pBR322 en

muestras genitales humanas, y podrían obtenerse resultados positivos falsos en presencia de niveles altos de plásmidos bacterianos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Broker, T. R.; Botchan, M. Papillomaviruses: retrospectives and prospectives. In: *DNA Tumor Viruses*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1986: 17-36. From the 1985 Cancer Cells Conference at Cold Spring Harbor.
2. Lorincz, A. T.; Reid, R. Association of human papillomavirus with gynecologic cancer. *Current Opinion in Oncology* 1:123-132; 1989.
3. Jenson, A. B.; Kurman, R. J.; Lancaster, W. D. Human papillomaviruses. In: Belshe, R. B. *Textbook of Human Virology*. Littleton, MA: PSG-Wright; 1984: 951-968.
4. Becker, T. M.; Stone, K. M.; Alexander, E. R. Genital human papillomavirus infection: a growing concern. *Obstet Gynecol Clin North Am* 14(2):389-396; 1987.
5. McCance, D. J.; Walker, P. G.; Dyson, J. L.; Coleman, D. V.; Singer, A. Presence of human papillomavirus DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia. *Br Med J* 287:784-788; 1983.
6. Naghashfar, Z.; Sawada, E.; Kutcher, M. J.; Swancar, J.; Gupta, J.; Daniel, R.; Kashima, H.; Woodruff, J. D.; Shah, K. Identification of genital tract papillomaviruses HPV-6 and HPV-16 in warts of the oral cavity. *J Med Virol* 17:313-324; 1985.
7. Gissmann, L.; Wolnik, L.; Ikenberg, H.; Koldovsky, U.; Schnurch, H. G.; zur Hausen, H. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *PNAS USA* 80:560-563; 1983.
8. Munoz, N.; Bosch, F. X.; Shah, K. V.; Meheus, A., Eds. *The Epidemiology of Cervical Cancer and Human Papillomavirus*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 1992. IARC Scientific Publication No. 119.
9. Reid, R.; Greenberg, M.; Jenson, A. B.; Husain, M.; Willett, J.; Daoud, Y.; Temple, G.; Stanhope, C. R.; Sherman, A. I.; Phibbs, G. D.; Lorincz, A. T. Sexually transmitted papillomaviral infections. I. The anatomic distribution and pathologic grade of neoplastic lesions associated with different viral types. *Am J Obstet Gynecol* 156(1):212-222; 1987.
10. Fuchs, P. G.; Girardi, F.; Pfister, H. Human papillomavirus DNA in normal, metaplastic, preneoplastic and neoplastic epithelia of the cervix uteri. *Int J Cancer* 41:41-45; 1988.
11. Lorincz, A. T.; Temple, G. F.; Kurman, R. J.; Jenson, A. B.; Lancaster, W. D. Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. *JNCI* 79(4):671-677; 1987.
12. Lorincz, A. T.; Lancaster, W. D.; Temple, G. F. Cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus from a woman with dysplasia of the uterine cervix. *J Virol* 58(1):225-229; 1986.
13. Beaudenon, S.; Kremsdorf, D.; Croissant, O.; Jablonska, S.; Wain-Hobson, S.; Orth, G. A novel type of human papillomavirus associated with genital neoplasias. *Nature* 321:246-249; 1986.
14. Lorincz, A. T.; Quinn, A. P.; Lancaster, W. D.; Temple, G. F. A new type of papillomavirus associated with cancer of the uterine cervix. *Virology* 159:187-190; 1987.
15. Naghashfar, Z. S.; Rosenshein, N. B.; Lorincz, A. T.; Buscema, J.; Shah, K. V. Characterization of human papillomavirus type 45, a new type 18-related virus of the genital tract. *J gen Virol* 68:3073-3079; 1987.
16. Nuovo, G. J.; Crum, C. P.; de Villiers, E. M.; Levine, R. U.; Silverstein, S. J. Isolation of a novel human papillomavirus (type 51) from a cervical condyloma. *J Virol* 62(4):1452-1455; 1988.
17. Shimoda, K.; Lorincz, A. T.; Temple, G. F.; Lancaster, W. D. Human papillomavirus type 52: a new virus associated with cervical neoplasia. *J gen Virol* 69:2925-2928; 1988.
18. Lorincz, A. T.; Quinn, A. P.; Goldsborough, M. D.; McAllister, P.; Temple, G. F. Human papillomavirus type 56: a new virus detected in cervical cancers. *J gen Virol* 70:3099-3104; 1989.

19. Lorincz, A. T.; Quinn, A. P.; Goldsborough, M. D.; Schmidt, B. J.; Temple, G. F. Cloning and partial DNA sequencing of two new human papillomavirus types associated with condylomas and low-grade cervical neoplasia. *J Virol* 63(6):2829-2834; 1989.
20. Beaudenon, S.; Kremsdorf, D.; Obalek, S.; Jablonska, S.; Pehau-Arnaudet, G.; Croissant, O.; Orth, G. Plurality of genital human papillomaviruses: characterization of two new types with distinct biological properties. *Virology* 161:374-384; 1987.
21. Lorincz, A. T.; Reid, R.; Jenson, A. B.; Greenberg, M. D.; Lancaster, W.; Kurman, R. J. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 79:328-337; 1992.
22. Koutsky, L. A.; Holmes, K. K.; Critchlow, C. W.; Stevens, C. E.; Paavonen, J.; Beckmann, A. M.; DeRouen, T. A.; Galloway, D. A.; Vernon, D.; Kiviat, N. B. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 327:1272-1278; 1992.
23. Nieminen, P.; Aho, M.; Vesterinen, E.; Stellato, G.; Vaheri, A.; Soares, V. R. X.; Paavonen, J. Natural history of HPV infection: preliminary results of a cohort study [abstract]. In: 1991 Papillomavirus Workshop. Seattle, WA: 1991: 77.
24. Schulster, L. M.; Hollinger, F. B.; Dreesman, G. R.; Melnick, J. L. Immunological and biophysical alteration of hepatitis B virus antigens by sodium hypochlorite disinfection. *Appl Envir Microbiol* 42(5):762-767; 1981.
25. Spire, B.; Barré-Sinoussi, F.; Montagnier, L.; Chermann, J. C. Inactivation of lymphadenopathy associated virus by chemical disinfectants. *Lancet*; 1984 October 20: pp. 899-901.
26. Martin, L. S.; McDougal, J. S.; Loskoski, S. L. Disinfection and inactivation of the human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus. *J Infect Dis* 152(2):400-403; 1985.
27. Lorincz, A. T.; Schiffman, M. H.; Jaffurs, W. J.; Marlow, J.; Quinn, A. P.; Temple, G. F. Temporal associations of human papillomavirus infection with cervical cytologic abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 162(3):645-651; 1990.
28. Morrison, E. A. B.; Ho, G. Y. F.; Vermund, S. H.; Goldberg, G. L.; Kadish, A. S.; Kelley, K. F.; Burk, R. D. Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasia: a case-control study. *Int J Cancer* 49:6-13; 1991.
29. Pfister, H.; Hettich, I.; Runne, U.; Gissmann, L.; Chliff, G. N. Characterization of human papillomavirus type 13 from focal epithelial hyperplasia Heck lesions. *J Virol* 47:363-366; 1983.
30. Kahn, T.; Schwarz, E.; zur Hausen, H. Molecular cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus (HPV 30) from a laryngeal carcinoma. *Int J Cancer* 51:61-65; 1986.
31. Schiffman, M. Latest HPV findings: some clinical implications. *Cont. OB/GYN* 38(10):27-40; 1993.
32. Volpers, C.; Streeck, R. E. Genome organization and nucleotide sequence of human papillomavirus type 39. *Virology* 181:419-423; 1991.
33. Matsukura, T.; Sugase, M. Molecular cloning of a novel human papillomavirus (type 58) from an invasive cervical carcinoma. *Virology* 177:833-836; 1990.
34. Rho, J.; Roy-Burman, A.; Kim, H.; de Villiers, E.M.; Matsukura, T.; Choe, J. Nucleotide sequence and phylogenetic classification of human papillomavirus type 59. *Virology* 203:158-161; 1994.
35. Longuet, M.; Beaudenon, S.; Orth, G. Two novel genital human papillomavirus (HPV) types, HPV68 and HPV70, related to the potentially oncogenic HPV39. *J Clin Microbiol* 34(3):738-744; 1996.
36. Bosch, F.X.; Manos, M.M.; Munoz, N.; Sherman, M.; Jansen, A.M.; Peto, J.; Schiffman, M.H.; Moreno, V.; Kurman, R.; Shah, K.V.; International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *JNCI* 87(11):796-802; 1995.

37. Wheeler, C.M.; Stewart, A.M.; Gravitt, P.E.; Cheng, S. Generation of entire human papillomavirus genomes by long PCR: frequency of errors produced during amplification. *Genome Research* 5(1):79-88; 1995.
38. Meyer, T., et. al., Association of Rare Human Papillomavirus Types with Genital Premalignant and Malignant Lesions, *J. Infectious Diseases*, 178:252-255 (1998).
39. Vernon, S. D.; Unger, E. R.;and Williams, D.; Comparison of Human Papillomavirus Detection and Typing by Cycle Sequencing, Line Blotting, and Hybrid Capture, *JCM*, Feb. 2000, p. 651-655.
40. European Guidelines for the Quality Assurance in Cervical Screening. *The European Journal of Cancer*, ISSN 0944-1947, 29.A supp. 4; 1993
41. RD Burke, P Kelly, J Feldman, et. al., Declining Prevalence of Cervicovaginal Human Papillomavirus Infection With Age Is Independent of Other Risk Factors, *Sexually Transmitted Diseases*, July-August, 1996:333-341).
42. CDC. Recommendations for Prevention of HIV Transmission in Health-Care Settings. *MMWR* 1987;36(2S):3S-18S.
43. Schulster L.M., Hollinger F.B., Dreesman G.R., et al. Immunological and Biophysical Alteration of Hepatitis B Virus Antigens by Sodium Hypochlorite Disinfection. *Appl Envir Microbiol* 1981;42(5):762-7.



## GUÍA PARA LA RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Observación	Causas probables	Soluciones
<p><b>Cambio de color incorrecto o ausencia de cambio de color durante la desnaturalización.</b></p>	<p>El reactivo de desnaturalización no se preparó correctamente o</p> <p>No se ha añadido el reactivo de desnaturalización</p> <p>La muestra contiene sangre u otros materiales que enmascaran el cambio de color.</p> <p>El pH de la muestra puede ser inusualmente ácido.</p>	<p>Asegúrese de que el reactivo de desnaturalización contiene el tinte indicador y de que tiene un color morado oscuro.</p> <p>Mida el volumen de la muestra (debería ser de 1,5 ml) para asegurarse de que se ha añadido el reactivo de desnaturalización a la muestra. Si el volumen indica que no se ha añadido el reactivo de desnaturalización, añádale según corresponda, mezcle y continúe con el ensayo si ahora ya se observa el cambio de color apropiado.</p> <p>No se espera el cambio de color exacto descrito con estos tipos de muestras; los resultados de la prueba <i>digene</i> HC2 HPV DNA no deberían verse afectados negativamente.</p> <p>Si se descartan las demás causas, es posible que la muestra sea inusualmente ácida, en cuyo caso no se producirá el cambio de color esperado. Recoja una nueva muestra <b>antes de</b> la aplicación de ácido acético al cuello del útero, ya que un pH inadecuado de la muestra afectará negativamente a los resultados de la prueba.</p>
<p><b>Los controles de calidad producen resultados incorrectos</b></p>	<p>Se ha elegido un protocolo de software incorrecto (es decir, se ha utilizado un protocolo de CPC para un método de dos sondas)</p> <p>Los controles QC1-LR y QC2-HR se han colocado al revés.</p> <p>LRC y QC1-LR y/o HRC y QC1-HR se han colocado al revés.</p>	<p>Si el protocolo de software es incorrecto para la prueba que va a realizar, se debe volver a leer la placa en los 30 minutos siguientes a la adición del reactivo de detección 2, utilizando el protocolo correcto.</p> <p>Vuelva a analizar las muestras.</p> <p>Vuelva a analizar las muestras.</p>
<p><b>Se observa un cambio de color incorrecto durante la hibridación.</b></p>	<p>No se ha mezclado correctamente la mezcla de la sonda con los calibradores, los controles y/o las muestras desnaturalizadas, no se ha añadido la mezcla de la sonda o se ha añadido un volumen incorrecto de reactivo.</p> <p>La muestra contiene sangre u otros materiales que enmascaran el cambio de color.</p> <p>La muestra tenía &lt; 1.000 µl de STM.</p>	<p>Agite la microplaca de hibridación o la gradilla para microtubos durante 2 minutos más. Si aún quedan pocillos de color morado, añada 25 µl más de la mezcla de la sonda apropiada y mezcle bien. Si después de añadir las sondas y volver a mezclar no se produce el cambio de color apropiado y la muestra no contiene sangre u otros materiales, vuelva a analizar la muestra.</p> <p>No se espera el cambio de color exacto descrito con estos tipos de muestras; los resultados de la prueba <i>digene</i> HC2 HPV DNA no deberían verse afectados negativamente.</p> <p>Compruebe el volumen de la muestra original. El volumen debe ser de 1.350 µl ± 20 µl (después de quitar 75 µl para las sondas de VPH de bajo y de alto riesgo). Si el volumen es &lt; 1.350 µl, la muestra original contenía &lt; 1.000 µl de STM. Obtenga una muestra nueva.</p>

Observación	Causas probables	Soluciones
<p><b>El ensayo no cumple los criterios de validación. No se ha observado señal en el calibrador, los controles de calidad o las muestras.</b></p>	<p>No se ha añadido la sonda al diluyente de sonda.</p> <p>Sonda contaminada con ribonucleasa durante la preparación.</p> <p>No se ha mezclado correctamente la sonda con el diluyente de sonda.</p> <p>No se ha mezclado correctamente la sonda diluida con la muestra desnaturalizada.</p> <p>Tiempo o temperatura incorrectos durante el paso de hibridación.</p> <p>No se ha mezclado correctamente durante el paso de captura.</p> <p>Se han intercambiado las posiciones de los tubos de las sondas, de las mezclas de las sondas o de hibridación.</p> <p>No se ha añadido la cantidad correcta del reactivo de detección 1 o no se ha incubado durante el tiempo especificado.</p> <p>No se ha añadido la cantidad correcta del reactivo de detección 2 o no se ha incubado durante el tiempo especificado.</p> <p>Fallo de funcionamiento o programación incorrecta del luminómetro.</p>	<p>Prepare las mezclas de la sonda según se describe en estas instrucciones de uso. Etiquete los tubos con cuidado.</p> <p>Utilice puntas de pipeta con barrera contra aerosoles para pipetear la sonda y use guantes. Utilice únicamente depósitos desechables para reactivos nuevos limpios.</p> <p>Después de añadir la sonda al diluyente de sonda, mezcle muy bien en el agitador vorticial a alta velocidad durante al menos 5 segundos. Debe generarse un vórtice visible.</p> <p>Después de añadir la mezcla de la sonda y la muestra a cada pocillo de la microplaca de hibridación o a cada microtubo, agítelos en el Rotary Shaker I a <math>1.100 \pm 100</math> rpm durante <math>3 \pm 2</math> minutos. Compruebe que el color cambia de morado a amarillo en cada tubo o pocillo de la microplaca.</p> <p>Hibride durante <math>60 \pm 5</math> minutos a <math>65 \pm 2</math> °C. Compruebe la temperatura del Microplate Heater I o del baño María. Asegúrese de que el Microplate Heater I o el baño María estén preparados para calentar las muestras a la temperatura correcta y de que se precalienten durante 60 minutos antes de su uso. Asegúrese de que el nivel de agua sea suficiente para calentar las muestras a la temperatura correcta. Los baños María deben calibrarse periódicamente.</p> <p>Agite en un Rotary Shaker I durante <math>60 \pm 5</math> minutos a una temperatura de 20 °C a 25 °C según se describe en estas instrucciones de uso. Calibre el Rotary Shaker I para comprobar su velocidad tal como se indica en el apartado "Shaker Speed Calibration" (Calibración de la velocidad del agitador) del manual del usuario del Rotary Shaker I (<i>Rotary Shaker I User Manual</i>).</p> <p>Prepare las mezclas de las sondas con cuidado y etiquete los tubos de mezcla de la sonda correctamente. Tenga cuidado de añadir la sonda correcta al conjunto correcto de tubos de hibridación. Etiquete los tubos de mezcla de la sonda, los tubos de hibridación y/o las gradillas para reducir al mínimo la posibilidad de que se intercambien sus posiciones.</p> <p>Añada 75 µl de reactivo de detección 1 a cada pocillo usando una pipeta de 8 canales. Incube a una temperatura de 20 °C a 25 °C durante 30 a 45 minutos.</p> <p>Añada 75 µl de reactivo de detección 2 a cada pocillo usando una pipeta de 8 canales. Incube a una temperatura de 20 °C a 25 °C durante 15 a 30 minutos.</p> <p>Consulte el manual del usuario correspondiente para obtener más instrucciones o póngase en contacto con su representante local de QIAGEN.</p>

Observación	Causas probables	Soluciones
<p><b>Valores de RLU elevados en el calibrador, los controles de calidad y/o las muestras (<math>\geq 200</math> RLU en muchos o en todos los pocillos). Es posible que el ensayo no cumpla los criterios de validación.</b></p>	<p>No se ha añadido el reactivo de desnaturalización, se ha añadido un volumen de reactivo incorrecto o no se ha mezclado correctamente el reactivo de desnaturalización con las muestras o los calibradores.</p> <p>Hay una fuga de luz en el luminómetro. La puerta no está herméticamente cerrada. La junta que rodea la puerta está rota.</p> <p>Contaminación del reactivo de detección 2 o de los pocillos de la microplaca de captura con el reactivo de detección 1 o con fosfatasa alcalina exógena.</p> <p>El tampón de lavado está contaminado.</p> <p>El Automated Plate Washer está contaminado.</p> <p>Los pocillos de la microplaca de captura no se han lavado correctamente después de la incubación con el reactivo de detección 1.</p> <p>Los pocillos de la microplaca están contaminados con el reactivo de detección 1.</p> <p>Se ha secado la solución de hibridación en la misma zona de las toallitas Kimtowels o de las hojas de papel absorbente sin pelusa equivalentes.</p> <p>Se han utilizado hojas de papel absorbente inadecuadas para secar.</p>	<p>Asegúrese de que la pipeta repetidora dispensa con exactitud antes de añadir el reactivo de desnaturalización. Es fundamental que se utilicen pipetas calibradas. Añada a cada tubo la mitad del volumen del reactivo de desnaturalización y mezcle bien. Para evitar resultados positivos falsos, asegúrese de que el líquido lave toda la superficie interior del tubo. Los calibradores, los controles de calidad y las muestras deben adquirir un color morado después de añadir el reactivo de desnaturalización.</p> <p>Compruebe la lectura de fondo del luminómetro leyendo una microplaca vacía. Una lectura superior a 50 RLU indica que existe una fuga de luz. Consulte el manual del usuario correspondiente para obtener más instrucciones o póngase en contacto con su representante local de QIAGEN.</p> <p>Consulte el subapartado "Comprobación de la contaminación" en este apartado para la resolución de problemas.</p> <p>Consulte el subapartado "Comprobación de la contaminación" en este apartado para la resolución de problemas.</p> <p>Consulte el subapartado "Comprobación de la contaminación" en este apartado para la resolución de problemas.</p> <p>Lave bien los pocillos de la microplaca con el tampón de lavado 6 veces, haciendo rebosar los pocillos cada vez o utilizando el Automated Plate Washer. No debería verse un líquido rosa residual en los pocillos después del lavado. Consulte el documento <i>Automated Plate Washer Manual del usuario</i> si desea obtener instrucciones para comprobar si existen contaminación o fallos de funcionamiento.</p> <p>Asegúrese de que todas las superficies de trabajo están limpias y secas. Tenga cuidado cuando utilice el reactivo de detección 1. Evite generar aerosoles.</p> <p>No utilice para secar zonas de toallitas Kimtowels o de hojas de papel absorbente sin pelusa equivalentes previamente usadas.</p> <p>Utilice toallitas Kimtowels u hojas de papel absorbente sin pelusa equivalentes para secar.</p>

Observación	Causas probables	Soluciones
<p><b>Cociente PC/NC bajo o número elevado de muestras positivas bajas con cocientes &lt; 2,0 (&gt; 20%). Es posible que el ensayo no cumpla los criterios de validación.</b></p>	<p>Preparación inadecuada de la muestra.</p> <p>No se ha mezclado correctamente la sonda o no se ha añadido la cantidad suficiente de sonda a los ensayos.</p> <p>Se ha añadido un volumen de sonda diluida inadecuada a cada microtubo de hibridación.</p> <p>Pérdida de la actividad del reactivo de detección 1.</p> <p>Captura insuficiente.</p> <p>Lavado inadecuado.</p> <p>El tampón de lavado está contaminado.</p>	<p>Añada el volumen apropiado de reactivo de desnaturalización y mezcle bien mediante agitación vorticial. Para evitar resultados positivos falsos, asegúrese de que el líquido lave toda la superficie interior del tubo. Para las muestras recogidas en solución PreservCyt, asegúrese de que se realiza un mezclado apropiado y de que se vuelve a poner en suspensión el sedimento celular antes de la incubación de desnaturalización. Consulte las instrucciones de uso del kit <i>digene</i> HC2 Sample Conversion si desea obtener información detallada sobre el protocolo. Debe observarse un cambio evidente de color de transparente a morado oscuro. Incube durante <math>45 \pm 5</math> minutos a una temperatura de <math>65 \pm 2</math> °C.</p> <p>Prepare las mezclas de las sondas según se ha descrito. Mezcle bien mediante agitación vorticial, asegurándose de que se produce un vórtice visible. Las mezclas de las sondas deben añadirse a los tubos con una pipeta de desplazamiento positivo o con una pipeta multicanal para garantizar una dispensación exacta.</p> <p>Asegúrese de que la pipeta de 8 canales dispensa con exactitud antes de añadir la mezcla de la sonda a la microplaca de hibridación o a los microtubos. Añada 25 µl de mezcla de la sonda a cada pocillo de la microplaca o microtubo que contenga calibradores, controles de calidad o muestras clínicas desnaturalizados. Asegúrese de que la pipeta de 8 canales dispensa con exactitud antes de añadir la mezcla de la sonda a los pocillos de la microplaca de hibridación. El color debe cambiar de morado oscuro a amarillo al añadir y mezclar bien la mezcla de la sonda. Las muestras recogidas en solución PreservCyt deben adquirir un color rosa en vez de amarillo.</p> <p>Conserve el reactivo de detección 1 a una temperatura de 2 °C a 8 °C. Úselo antes de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja exterior del kit.</p> <p>El paso de captura debe llevarse a cabo con el Rotary Shaker I a <math>1.100 \pm 100</math> rpm. Calibre el agitador para validar su velocidad.</p> <p>Lave bien los pocillos de la microplaca con el tampón de lavado 6 veces, haciendo rebosar los pocillos cada vez o utilizando el Automated Plate Washer.</p> <p>Consulte el subapartado "Comprobación de la contaminación" en este apartado para la resolución de problemas.</p>
<p><b>Series de muestras positivas con valores de RLU aproximadamente iguales.</b></p>	<p>Contaminación de los pocillos de la microplaca de captura durante la manipulación del ensayo.</p> <p>Contaminación del reactivo de detección 2.</p> <p>Fallo de funcionamiento del Automated Plate Washer.</p>	<p>Cubra la microplaca de captura durante todas las incubaciones. Evite la exposición de los tubos a la contaminación por aerosoles al realizar el ensayo. Use guantes sin talco durante la manipulación.</p> <p>Tenga cuidado de no contaminar la solución madre al pipetear el reactivo de detección 2 en los pocillos de la microplaca de captura. Evite la contaminación del reactivo de detección 2 con aerosoles del reactivo de detección 1, con polvo del laboratorio, etc.</p> <p>Consulte el subapartado "Comprobación de la contaminación" en este apartado para la resolución de problemas o el documento <i>Automated Plate Washer Manual del usuario</i> si desea obtener instrucciones para comprobar si existen contaminación o fallos de funcionamiento.</p>
<p><b>%CV amplio entre duplicados.</b></p>	<p>Pipeteo inexacto.</p> <p>Mezclado insuficiente.</p> <p>Transferencia incompleta de líquido de los micropocillos de hibridación a los pocillos de la microplaca de captura.</p> <p>Condiciones de lavado incorrectas.</p> <p>Los pocillos de la microplaca están contaminados con el reactivo de detección 1.</p>	<p>Compruebe la pipeta para asegurarse de que se dispensan volúmenes reproducibles. Calibre las pipetas sistemáticamente.</p> <p>Mezcle bien en todos los pasos. Agite en el agitador vorticial antes de la incubación de desnaturalización y después de añadir la mezcla de la sonda. Asegúrese de que se produce un vórtice visible.</p> <p>Asegúrese de que se transfieren volúmenes reproducibles de los pocillos de la microplaca de hibridación o de los microtubos a los pocillos de la microplaca de captura.</p> <p>Lave bien los pocillos de la microplaca con el tampón de lavado 6 veces, haciendo rebosar los pocillos cada vez o utilizando el Automated Plate Washer y los protocolos correctos del Automated Plate Washer.</p> <p>Asegúrese de que todas las superficies de trabajo están limpias y secas. Tenga cuidado al utilizar el reactivo de detección 1. Evite generar aerosoles.</p>

Observación	Causas probables	Soluciones
<b>Obtención de resultados positivos falsos en muestras que se sabe que son negativas.</b>	<p>Contaminación del reactivo de detección 2.</p> <p>Los pocillos de la microplaca están contaminados con el reactivo de detección 1.</p> <p>Se han secado varias filas en la misma zona de las toallitas Kimtowels o de hojas de papel absorbente sin pelusa equivalentes.</p> <p>Preparación inadecuada de la muestra.</p> <p>Condiciones de lavado incorrectas.</p> <p>Contaminación de la punta de la pipeta con material no desnaturalizado durante la transferencia de la muestra desnaturalizada al microtubo o al pocillo de la microplaca utilizado para la hibridación de la sonda de VPH.</p>	<p>Tenga cuidado de no producir una contaminación cruzada de las muestras al añadir el reactivo de detección 2 a las muestras. Si únicamente se necesita utilizar parte de un kit, transfiera el volumen necesario para el ensayo a un depósito desechable para reactivos limpio antes de llenar la pipeta.</p> <p>Lave bien los pocillos de la microplaca con el tampón de lavado 6 veces, haciendo rebosar los pocillos cada vez o utilizando el Automated Plate Washer. No debería verse un líquido rosa residual en los pocillos de la microplaca después del lavado.</p> <p>No seque en una zona que haya utilizado previamente, ya que podría producirse una contaminación.</p> <p>Añada el volumen apropiado de reactivo de desnaturalización y mezcle bien mediante agitación vorticial. Para evitar resultados positivos falsos, asegúrese de que el líquido lava toda la superficie interior del tubo con el método manual o con el método del MST Vortexer 2 (para el método manual de agitación vorticial, invierta el tubo una vez). Para las muestras recogidas en solución PreservCyt, asegúrese de que se realiza un mezclado apropiado y de que se vuelve a poner en suspensión el sedimento celular antes de la incubación de desnaturalización. Consulte las instrucciones de uso del kit <i>digene</i> HC2 Sample Conversion si desea obtener información detallada sobre el protocolo. En todas las muestras debe observarse un cambio evidente de color a morado oscuro. Incube durante <math>45 \pm 5</math> minutos a <math>65 \pm 2</math> °C. Para las muestras recogidas en SurePath, asegúrese de que las muestras se incuban durante <math>90 \pm 5</math> minutos a <math>65 \pm 2</math> °C.</p> <p>Lave bien los pocillos de la microplaca con el tampón de lavado 6 veces, haciendo rebosar los pocillos cada vez o utilizando el Automated Plate Washer y los protocolos correctos del Automated Plate Washer.</p> <p>El paso de desnaturalización del procedimiento de procesamiento de las muestras debe realizarse según se indica en estas instrucciones de uso. Una técnica incorrecta en la agitación vorticial de las muestras o en la inversión y agitación de los tubos puede provocar una desnaturalización incompleta de híbridos inespecíficos de ARN:ADN endógenos de las muestras cervicouterinas. En concreto, cuando se utilicen muestras recogidas en solución PreservCyt o en solución conservante SurePath, es probable que estos híbridos estén presentes en las paredes interiores del tubo de desnaturalización de muestras. Con el fin de evitar el posible arrastre de este material celular no desnaturalizado, la punta de la micropipeta no debe tocar las paredes del tubo de desnaturalización de muestras durante la transferencia de la muestra desnaturalizada al microtubo o al pocillo de la microplaca utilizado para la hibridación de la sonda de VPH.</p>
<b>Valores negativos elevados de RLU del calibrador (&gt; 200 RLU). El resto del ensayo se realiza según lo previsto.</b>	<p>El reactivo de detección 2 se ha incubado a una temperatura superior a 20-25 °C.</p> <p>El reactivo de detección 2 se ha incubado durante más de 30 minutos.</p> <p>El reactivo de detección 2 o el tampón de lavado se han contaminado con fosfatasa alcalina o con el reactivo de detección 1.</p>	<p>Vuelva a realizar la prueba y asegúrese de que los pasos de captura y detección se incuban a una temperatura de 20 °C a 25 °C.</p> <p>Lea la placa después de 15 minutos de incubación (en ningún caso después de más de 30 minutos de incubación) a una temperatura de 20 °C a 25 °C.</p> <p>Consulte el subapartado "Comprobación de la contaminación" en este apartado para la resolución de problemas.</p>
<b>El ensayo no cumple los criterios de validación. Cociente PC/NC alto.</b>	<p>Se han colocado al revés el HRC y el QC2-HR y/o el LRC y el QC1-LR.</p>	<p>Vuelva a analizar las muestras. Para evitar colocar al revés estos reactivos, lea atentamente las etiquetas de los viales de calibrador y de control de calidad.</p>

## COMPROBACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN

Reactivo evaluado	Procedimiento de comprobación de la contaminación	Interpretación de los resultados
<b>Nota:</b> Para evitar que se produzca contaminación, tenga cuidado al pipetear el reactivo de detección 2. Use guantes y evite tocar con las puntas de las pipetas cualquier superficie de trabajo.		
<b>Reactivo de detección 2</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pipetee 75 µl del reactivo de detección 2 alícuotado, residual y/o contenido en el vial original a un pocillo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>El control del reactivo de detección 2 debe tener un valor &lt; 50 RLU.</li> </ul>

	<p>vacío de la microplaca de captura.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Incube a una temperatura de 20 °C a 25 °C durante 15 minutos. Evite la exposición a la luz directa del sol.</li> <li>• Lea los pocillos de la microplaca en el luminómetro.</li> </ul> <p><b>Nota:</b> El análisis del reactivo de detección 2 por triplicado proporciona una valoración óptima del rendimiento.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Si los valores del reactivo de detección 2 son &lt; 50 RLU, el reactivo de detección 2 puede usarse para repetir el ensayo.</li> <li>• Si está contaminado (&gt; 50 RLU), obtenga un kit nuevo y repita el ensayo.</li> </ul>
<b>Aparato de tampón de lavado y/o suministro de agua</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pipetee 75 µl de reactivo de detección 2 en 4 pocillos de la microplaca de captura.</li> <li>• Etiquete los pocillos del 1 al 4.</li> <li>• El pocillo 1 sirve como control del reactivo de detección 2.</li> <li>• Pipetee 10 µl de tampón de lavado del frasco de lavado en el pocillo 2.</li> <li>• Deje fluir el tampón de lavado por los tubos del lavador.</li> <li>• Pipetee 10 µl del tampón de lavado de los tubos en el pocillo 3.</li> <li>• Obtenga una porción del agua usada para preparar el tampón de lavado. Pipetee 10 µl del agua en el pocillo 4.</li> <li>• Incube a una temperatura de 20 °C a 25 °C durante 15 minutos. Evite la exposición a la luz directa del sol.</li> <li>• Lea los pocillos de la microplaca en el luminómetro.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El control del reactivo de detección 2 (pocillo 1) debe tener un valor &lt; 50 RLU.</li> <li>• Compare el valor de RLU de los pocillos 2, 3 y 4 con el valor de RLU del control del reactivo de detección 2 (pocillo 1). Los valores de RLU individuales de los pocillos 2, 3 y 4 no deben superar en más de 50 RLU el valor de RLU del control del reactivo de detección 2 (pocillo 1).</li> <li>• Los valores que superen en más de 50 RLU el valor de RLU del control del reactivo de detección 2 indican la presencia de contaminación. Si desea obtener instrucciones sobre el lavado y el mantenimiento del aparato de lavado, consulte el apartado Preparación y conservación de los reactivos.</li> </ul>
<b>Automated Plate Washer</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pipetee 75 µl de reactivo de detección 2 en 5 pocillos de la microplaca de captura.</li> <li>• Etiquete los pocillos del 1 al 5.</li> <li>• El pocillo 1 sirve como control del reactivo de detección 2.</li> <li>• Pipetee 10 µl de tampón de lavado del frasco del lavador de placas etiquetado como <i>Wash</i> (Lavado) en el pocillo 2.</li> <li>• Pipetee 10 µl de líquido de enjuague del frasco del lavador de placas etiquetado como <i>Rinse</i> (Enjuague) en el pocillo 3.</li> <li>• Presione la tecla Prime (Cebado) en el teclado numérico del lavador de placas y deje que el tampón de lavado fluya por los tubos.</li> <li>• Pipetee 10 µl del tampón de lavado de la cubeta en el pocillo 4.</li> <li>• Presione la tecla Rinse en el teclado numérico del lavador de placas y deje que el líquido de enjuague fluya por los tubos.</li> <li>• Pipetee 10 µl del tampón de lavado de la cubeta en el pocillo 5.</li> <li>• Cubra e incube durante 15 minutos a una temperatura de 20 °C a 25 °C. Evite la exposición a la luz directa del sol.</li> <li>• Lea los pocillos de la microplaca en el luminómetro.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El control del reactivo de detección 2 (pocillo 1) debe tener un valor &lt; 50 RLU.</li> <li>• Compare el valor de RLU de los pocillos 2, 3, 4 y 5 con el valor de RLU del control del reactivo de detección 2 (pocillo 1). Los valores de RLU individuales de los pocillos 2, 3, 4 y 5 no deben superar en más de 50 RLU el valor de RLU del control del reactivo de detección 2 (pocillo 1).</li> <li>• Los valores que superen en más de 50 RLU el valor del control del DR2 indican contaminación del lavador de placas.</li> <li>• Consulte el apartado relativo al procedimiento de descontaminación en el documento <i>Automated Plate Washer Manual del usuario</i>.</li> </ul>

## INFORMACIÓN DE CONTACTO DE QIAGEN

Utilice la hoja de información de contacto facilitada con este producto para ponerse en contacto con su representante local de QIAGEN.

Marcas comerciales: QIAGEN®, *digene*®, Hybrid Capture®, Rapid Capture® (QIAGEN Group); CDP-Star® (Tropix, Inc.); Corning® (Corning Incorporated); DuraSeal™ (Diversified Biotech); Eppendorf®, Repeater® (Eppendorf AG); Excel®, Microsoft® (Microsoft Corporation); Kimtowels® (Kimberly-Clark Corporation); Parafilm® (BEMIS Company, Inc.); PrepStain®, SurePath® (Becton, Dickinson and Company); PreservCyt®, ThinPrep® (Hologic, Inc.); VWR® (VWR International, Inc.).

No debe considerarse que los nombres registrados, marcas comerciales, etc., que se utilizan en este documento no están protegidos por la ley aunque no se hayan identificado específicamente como tales.

Este producto y su método de uso están cubiertos por una o más de las siguientes patentes:

**Números de patente del VPH en Estados Unidos**

5,643,715 • 5,712,092 • 5,876,922 • 5,952,487 • 5,958,674 • 5,981,173 • 6,107,086

**Número de patente de Hybrid Capture en Estados Unidos**

6,228,578B1





# Resumen de la prueba digene HC2 HPV DNA

**IMPORTANTE:** Es importante que esté plenamente familiarizado con el procedimiento detallado antes de utilizar este resumen.

## Procedimiento

	<b>Método de agitación vorticial manual</b>	<b>Método del Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2</b>
<b>DESNATURALIZACIÓN</b>  (Para las muestras recogidas en solución PreservCyt, consulte las instrucciones de uso del kit <i>digene</i> HC2 Sample Conversion)	<p>Etiquete los microtubos de hibridación. Prepare el reactivo de desnaturalización.</p> <p>↓</p> <p>Pipetee el reactivo de desnaturalización (el volumen equivale a la mitad del volumen de la muestra) en los calibradores, controles de calidad y muestras.</p> <p>Agite con el agitador vorticial cada muestra, calibrador y control de calidad individualmente durante 5 segundos a alta velocidad (consulte estas instrucciones de uso si desea información detallada). Compruebe que todos los tubos presentan un color morado.</p> <p>↓</p> <p>Incube a <math>65 \pm 2</math> °C durante <math>45 \pm 5</math> minutos.</p> <p>↓</p> <p>Prepare la mezcla de la sonda de VPH.</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p>	<p>Etiquete la placa de hibridación. Prepare el reactivo de desnaturalización.</p> <p>↓</p> <p>Pipetee el reactivo de desnaturalización (el volumen equivale a la mitad del volumen de la muestra) en los calibradores, controles de calidad y muestras.</p> <p>Compruebe que todos los tubos presentan un color morado.</p> <p>↓</p> <p>Cubra la gradilla con una lámina selladora y con la tapa.</p> <p>↓</p> <p>Agite en el agitador vorticial durante 10 segundos.</p> <p>↓</p> <p>Incube a <math>65 \pm 2</math> °C durante <math>45 \pm 5</math> minutos.</p> <p>↓</p> <p>Prepare la mezcla de la sonda de VPH.</p> <p>↓</p>
<b>HIBRIDACIÓN</b>  Método del cóctel de sondas combinadas    Método de dos sondas	<p><b>Método del baño María</b></p> <p>Mezcle bien la muestra desnaturalizada y pipetee 75 µl en los tubos.</p> <p>↓</p> <p>Incube durante 10 minutos a 20-25 °C.</p> <p>↓</p> <p>Pipetee 25 µl del cóctel de sondas combinadas en los microtubos de hibridación.</p> <p>O BIEN</p> <p>Mezcle bien la muestra desnaturalizada y pipetee 75 µl en los tubos "LR". Mezcle bien la muestra desnaturalizada y pipetee 75 µl en los tubos "HR".</p> <p>↓</p> <p>Incube durante 10 minutos a 20-25 °C.</p> <p>↓</p> <p>Pipetee 25 µl de la mezcla de la sonda de VPH de bajo riesgo en los tubos "LR". Pipetee 25 µl de la mezcla de la sonda de VPH de alto riesgo en los tubos "HR".</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>Cubra los microtubos con sellador de placas y agítelos en el Rotary Shaker I a <math>1.100 \pm 100</math> rpm durante <math>3 \pm 2</math> minutos. Compruebe que todos los tubos presentan un color amarillo.</p> <p>↓</p> <p>Incube a <math>65 \pm 2</math> °C durante <math>60 \pm 5</math> minutos. Prepare la microplaca de captura.</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p>	<p><b>Método del Microplate Heater I</b></p> <p>Mezcle bien la muestra desnaturalizada y pipetee 75 µl en los pocillos de la microplaca.</p> <p>↓</p> <p>Incube durante 10 minutos a 20-25 °C.</p> <p>↓</p> <p>Pipetee 25 µl del cóctel de sondas combinadas en los pocillos de la microplaca de hibridación.</p> <p>O BIEN</p> <p>Mezcle bien la muestra desnaturalizada y pipetee 75 µl en los pocillos "LR" de la microplaca y 75 µl en los pocillos "HR" de la microplaca.</p> <p>↓</p> <p>Incube durante 10 minutos a 20-25 °C.</p> <p>↓</p> <p>Pipetee 25 µl de mezcla de la sonda de VPH de bajo riesgo en los pocillos "LR" de la microplaca. Pipetee 25 µl de mezcla de la sonda de VPH de alto riesgo en los pocillos "HR" de la microplaca.</p> <p>↓</p> <p>Cubra la microplaca con una tapa de placa y agítela en el Rotary Shaker I a <math>1.100 \pm 100</math> rpm durante <math>3 \pm 2</math> minutos. Compruebe que todos los tubos presentan un color amarillo.</p> <p>↓</p> <p>Incube a <math>65 \pm 2</math> °C durante <math>60 \pm 5</math> minutos. Prepare la microplaca de captura.</p> <p>↓</p>
<b>CAPTURA DE LOS HÍBRIDOS</b>	<p>Transfiera el contenido de cada pocillo de la placa de hibridación o microtubo al pocillo correspondiente de la microplaca de captura utilizando una pipeta de 8 canales. Cubra con una tapa de placa o con sellador de placas.</p> <p>Agite a <math>1.100 \pm 100</math> rpm a una temperatura de 20 °C a 25 °C durante <math>60 \pm 5</math> minutos. Prepare el tampón de lavado.</p> <p>↓</p> <p>Decante y seque la microplaca de captura (consulte estas instrucciones de uso si desea información detallada).</p> <p>↓</p>	
<b>DETECCIÓN DE LOS HÍBRIDOS</b>	<p>Pipetee 75 µl del reactivo de detección 1 en cada pocillo de la microplaca de captura. Cubra la microplaca de captura con una tapa de placa, con Parafilm o con un material equivalente. Incube a una temperatura de 20 °C a 25 °C durante 30-45 minutos. Lave la placa con el método que desee.</p> <p>↓</p>	
<b>LAVADO</b>	<p><b>Método de lavado manual</b></p> <p>Decante y seque la microplaca de captura (consulte estas instrucciones de uso si desea información detallada).</p> <p>↓</p> <p>Lave 6 veces.</p> <p>↓</p> <p>Seque con hojas de papel absorbente sin pelusa</p> <p>↓</p>	<p><b>Método del Automated Plate Washer</b></p> <p>Coloque la placa en el lavador y pulse "START/STOP" (Iniciar/Parar) para comenzar.</p> <p>↓</p> <p>Vaya al siguiente paso.</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p>
<b>AMPLIFICACIÓN DE LA SEÑAL</b>	<p>Pipetee 75 µl del reactivo de detección 2 en cada pocillo de la microplaca de captura. Incube a una temperatura de 20 °C a 25 °C durante 15-30 minutos.</p> <p>↓</p>	
<b>LECTURA</b>	<p>Lea la microplaca de captura en el instrumento DML.</p> <p>↓</p> <p>Valide el ensayo e interprete los resultados de las muestras.</p>	