

Prueba VPH-NET

LVP 0523/01
REF DIVPH01

Uso deseado

La prueba VPH-NET es un inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral para la detección cualitativa de ADN viral del virus de papiloma humano correspondiente a los genotipos de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 45 y 81) en muestras de hisopado cervical/uretral o lesiones sospechosas de VPH.

Resumen

El cáncer cérvico uterino (CCU) es el cuarto tipo de cáncer que más causa decesos en mujeres en todo el mundo y el segundo en México, dónde se estima que aproximadamente el 18% están infectadas [1, 2]. Se estima que el 99% de los casos de CCU están asociados con la infección por el virus de papiloma humano (VPH) específicamente por los genotipos de alto riesgo (VPH-HR) de los cuales se han identificado más de 200 genotipos, aunque algunos son de bajo riesgo [6 y 11] que se asocian con verrugas genitales y otros cambios celulares benignos, sin embargo, los genotipos 16, 18, 31, 33, 45 y 81 tienen una prevalencia del 80% pues se asocian con lesiones precancerosas y cáncer cervical [3]. Existen diferentes tipos de pruebas para la detección de CCU como el Papanicolaou y la colposcopia, siendo las pruebas más populares de tamizaje. Cuando hay presencia de lesiones sospechosas se busca la presencia de VPH mediante métodos de amplificación de ADN como el PCR o las pruebas de captura de híbridos, no obstante, la PCR en tiempo real es la más utilizada debido a su alta sensibilidad y especificidad [4], por otro lado, existen otros métodos capaces de detectar o amplificar el ácido nucleico mediante temperatura constante permitiendo identificar la presencia de los genotipos más frecuentes de VPH [5]. La Sociedad Americana contra el cáncer recomienda realizarse una prueba de VPH cada 5 años a partir de los 25 hasta los 65 años [6].

Principio

La prueba rápida VPH-NET es un inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral para la detección cualitativa de ADN viral correspondiente a los genotipos 16, 18, 31, 33, 45 y 81 del VPH. La prueba VPH-NET consta de una prueba que posee dos regiones: la primera es la región control (C) que tiene impresos anticuerpos anti-ratón y una segunda región de prueba (T) en la que se encuentran impresos anticuerpos anti-biotina, la prueba también cuenta con un conjugado que contiene partículas recubiertas con anticuerpos anti-fluoresceína. Una vez que la muestra es obtenida y procesada mediante el pretratamiento enzimático en dos tubos de reactivo seco donde se detectan en el tubo 1 los genotipos 16, 18, 31 y 81 y en el tubo 2 los genotipos 33 y 45, una vez concluido el pretratamiento ambos se diluyen en el reactivo de corrimiento en el cual se colocará la prueba para que la muestra migre a través de ésta por acción capilar. Si la muestra contiene ADN de VPH de los genotipos 16, 18, 31, 33, 45 y 81 superior al límite de detección, estos reaccionarán con las partículas recubiertas de anticuerpos anti-fluoresceína presentes en el conjugado, luego continuará migrando hasta encontrarse con los anticuerpos anti-biotina en la región de prueba (T), estos reaccionarán formando una línea de color en la región de prueba (T), esto indica un resultado positivo debido a que fue detectado alguno de los genotipos (16, 18, 31, 33, 45 y 81) de VPH. Por el contrario, si no hay alguno de los genotipos (16, 18, 31, 33, 45 y 81) de VPH o está por debajo del límite de detección no se formará la línea de color en la región de prueba (T), esto indica un resultado negativo. La prueba posee un control (C) que indica que se ha agregado la cantidad de muestra correcta y el procedimiento se ha realizado con éxito.

Reactivos

La prueba contiene anticuerpos anti-biotina como reactivos de captura y partículas recubiertas con anti-fluoresceína como detección, anticuerpos anti-ratón, además de una mezcla enzimática en los tubos de reactivo seco 1 y 2.

Almacenamiento y estabilidad de la prueba

- Almacene la prueba de acuerdo con las indicaciones de cada componente impresos en su etiqueta individual.
- La prueba es estable hasta la fecha de caducidad impresa en el tubo.
- No utilice la prueba después de la fecha de caducidad.

Materiales

Materiales incluidos:

- Instructivo de uso
- Prueba VPH-NET
- Tubos con reactivo seco 1
- Tubos con reactivo seco 2
- Tubos con reactivo de corrimiento
- Control positivo
- Control negativo
- Reactivo diluyente

Materiales requeridos, pero no incluidos:

- Temporizador
- Contenedor de RPBI
- Micropipetas
- Puntas para micropipeta
- Termobloque, baño seco o incubador
- Guantes de nitrilo
- Equipo de protección personal
- Material para toma de muestra

Materiales opcionales:

- Kit de purificación de ADN

Recolección de la muestra

Recolecte la muestra siguiendo las técnicas internacionales para obtención de muestras de hisopados cervicales/uretrales para diagnóstico de VPH, las muestras pueden ser de zonas distintas a las antes mencionadas y deben ser recolectadas en recipiente estéril.

Precauciones

- Evite tener relaciones sexuales 2 o 3 días antes de la prueba.
- Evite el uso de tampones, espumas anticonceptivas, medicamentos por vía vaginal, duchas vaginales y cremas o polvos vaginales ya que estos podrían eliminar células anormales o disminuir la carga viral.
- No realice la toma de muestra durante los 5 días posteriores al periodo menstrual para evitar una alta concentración de sangre.

Almacenamiento de la muestra

- Una vez colectada la muestra solo puede almacenarse hasta por dos horas a temperatura ambiente y hasta por 7 días en refrigeración (4 °C).
- Almacene la muestra a -20 °C si su almacenamiento será a largo plazo.
- El ADN purificado debe almacenarse a -20 °C para su uso a largo plazo.
- Inactive con cloro la muestra una vez procesada.
- Para un mejor desempeño, analice las muestras inmediatamente después de su recolección, una manipulación, almacenamiento o transporte incorrecto puede generar desviaciones en los resultados.

Preparación de la muestra

Se recomienda realizar la purificación de la muestra para obtener resultados certeros.

Purificación de ADN:

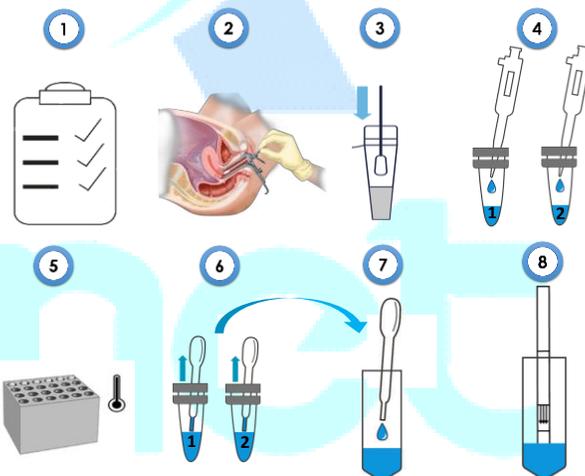
Purificar el ADN de la muestra siguiendo las instrucciones del kit de purificación, al final eluya el ADN purificado (preferentemente) en H₂O grado biología molecular o Tris-HCl 10 mM pH 8.

Instrucciones de uso

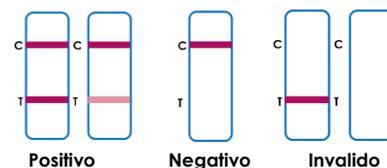
Permita que los componentes se atemperen o alcancen temperatura ambiente (18-30 °C) antes de su uso. Prepare una superficie limpia y nivelada para realizar el procedimiento.

1. Reconozca cada uno de los materiales y asegúrese que cuenta con todo lo necesario.
2. Recolecte la muestra como se menciona en la sección 'recolección de la muestra'.
3. Prepare la muestra cómo se indica en la sección 'preparación de la muestra'.
4. Pretratamiento de la muestra:
 - Coloque 20 µL de reactivo diluyente a cada tubo de reactivo seco (1 y 2).
 - Coloque 5 µL de muestra o control (positivo y negativo) a cada tubo (1 y 2) previamente hidratados.Nota: se recomienda realizar duplicados (dos tubos de cada uno) por cada muestra a analizar. Cualquier cambio en el volumen de los reactivos, muestras o controles puede generar resultados erróneos.
5. Coloque los tubos generados a 65 °C por 30 minutos en alguno de los siguientes equipos: termobloque, baño seco o incubador. Al finalizar saque los tubos del equipo.
6. Recolecte la muestra pretratada en el paso anterior (tubos 1 y 2), llene el gotero proporcionado hasta la marca (5 µL aproximadamente de cada uno).
7. Transfiera la muestra de cada uno a un tubo de reactivo de corrimiento y homogenice por vortex o pipeteo.
8. Saque una prueba VPH-NET de su contenedor y colóquela en un tubo con reactivo de corrimiento preparado en el punto anterior. Inicie un temporizador.
9. Después de 5 minutos saque la tira del tubo, colóquela sobre una superficie limpia e interprete resultados.

NOTA: No interprete resultados después de 10 minutos.



Interpretación de resultados



(Refiera a la imagen de arriba)

POSITIVO: Dos líneas distintas de color aparecen. Una línea coloreada debe estar en la región control (C) y otra línea coloreada debe estar en la región de prueba (T). Un resultado positivo indica que se detectó uno o más genotipos (16, 18, 31, 33, 45 o 81) del ADN de VPH.

NOTA: La intensidad del color de la línea en la región de prueba (T) varía en función de la cantidad de ADN viral presente en la muestra. Por lo tanto, cualquier tonalidad de color de la línea en la región de prueba (T) debe considerarse como un resultado positivo.

NEGATIVO: Una línea de color aparece en la región control (C). Ninguna línea aparece en la región de prueba (T). Un resultado negativo indica que se no detectó ninguno de los genotipos (16, 18, 31, 33, 45 o 81) del ADN de VPH.

CONTROL POSITIVO: Dos líneas distintas de color aparecen. Una línea coloreada debe estar en la región control (C) y otra línea coloreada debe estar en la región de prueba (T). Un resultado positivo indica que se siguió de manera correcta el procedimiento.

CONTROL NEGATIVO: Una línea de color aparece en la región control (C). Ninguna línea aparece en la región de prueba (T).

-INVÁLIDO: La línea en la región control (C) no aparece. Cantidad de muestra insuficiente o técnicas de procedimiento incorrectas son las razones más probables para la falla de la línea en la región control (C). Revise el procedimiento y repita la prueba con una nueva. Si el problema persiste suspenda el uso de la prueba inmediatamente y contacte a su distribuidor local.

Control de calidad

Un control interno está incluido en la prueba. Una línea de color aparece en la región control (C), este es un control interno del procedimiento. Confirma que hubo suficiente cantidad de muestra y el procedimiento fue realizado correctamente. Esta prueba incluye controles (positivo y negativo) se recomienda utilizarlos como buena práctica de laboratorio en cada análisis de muestra.

Limitaciones

- Los resultados deben ser interpretados por personal calificado.
- La prueba VPH-NET es solo para uso profesional *in vitro*. Esta prueba cualitativa no puede determinar el valor cuantitativo ni la tasa de aumento en la concentración de ADN viral de VPH.
- La prueba VPH-NET solo proporciona un resultado positivo o negativo a los genotipos 16, 18, 31, 33, 45 y 81, esto no descarta la infección por cualquier otro genotipo de VPH.
- Esta prueba únicamente detecta los genotipos 16, 18, 31, 33, 45 y 81 de ADN viral de VPH y solo debe ser usada para dichos genotipos y no para otros patógenos.
- La prueba VPH-NET sólo indica la presencia de los genotipos de 16, 18, 31, 33, 45 y 81 en la muestra y no debe usarse como único criterio para el diagnóstico o exclusión de la infección por VPH o para informar el estado de la infección.
- Como con todas las pruebas de tamizaje, los resultados deben considerarse con toda información clínica disponible para el médico o personal calificado.
- Si el resultado de la prueba es negativo y los síntomas clínicos persisten se sugieren pruebas de seguimiento adicionales con otras pruebas diagnósticas como la PCR en tiempo real, los resultados deben ser interpretados por un médico.
- La tonalidad que adquiere la membrana no interfiere en el resultado, mientras la línea en la región control (C) se visualice el resultado es válido.
- Los resultados negativos no descartan la infección por VPH ya que la mayor sensibilidad esperada es 250 copias.
- Particularmente en aquellos pacientes que han estado en contacto con el virus, se deben de utilizar pruebas de diagnóstico molecular para descartar la infección en estos individuos.
- El desempeño de la prueba se ha evaluado bajo las condiciones y características mencionadas en este manual. Se recomienda seguir las instrucciones para asegurar la precisión de los resultados.

Características de presentación

Precisión Intra-Ensayo

La repetibilidad de la prueba se determinó realizando 20 réplicas con diferentes concentraciones incluyendo una libre de ADN viral de VPH, se utilizó solución de corrimiento como muestra. Las muestras fueron correctamente identificadas el 99% de las veces.

Inter-Ensayo

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

Reactividad cruzada

La prueba VPH-NET se ha probado con muestras positivas a 95 cepas de bacterias y virus correspondientes a los microorganismos del microbiota frecuente en uretra, cérvix u oral, algunos patógenos relacionados, además de ADN sintético con las secuencias características de los genotipos 6, 11, 26, 30, 34, 40, 42, 53, 54, 55B, 61, 62, 64, 67, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 85 y 89 de VPH y los resultados no mostraron reacción cruzada con ninguno de éstos genotipos. La muestra presentó reactividad cruzada con la secuencia perteneciente al VPH genotipo 59.

Sustancias interferentes

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

Precisión con muestras clínicas

Se evaluaron 164 muestras de hisopado cervical con la prueba VPH-NET, los resultados fueron comparados con la prueba comercial cobas® HPV únicamente con los mismos genotipos de VPH que la prueba VPH-NET es capaz de detectar. A continuación, se reportan los resultados: De acuerdo a la prueba comercial cobas® HPV de los 164 pacientes se obtuvieron: 15 positivos correspondientes a los mismos genotipos que detecta VPH-NET (16, 18, 31, 33, 45 y 81), 2 al genotipo 59, 1 al genotipo 51 y 1 al genotipo 61 de los VPH de alto riesgo, 13 al genotipo 11 y 8 al genotipo 6 de los VPH de bajo riesgo, del resto (124) no se detectó ninguno de los genotipos de VPH mencionados previamente. Las personas infectadas con genotipos de VPH de alto riesgo presentaron dos o más de los siguientes síntomas: verrugas genitales, dolor durante o después de haber tenido relaciones sexuales, sangrado vaginal fuera del período menstrual, descarga vaginal anormal, picazón o irritación en la zona genital y ardor al orinar.

Tabla de contingencia de los resultados obtenidos por la prueba VPH-NET y Cobas® HPV.

Prueba VPH-NET	Método		Prueba cobas® HPV		Resultados totales
	Resultado	Positivo	Negativo		
		Positivo	15	2	17
	Negativo	1	146	147	
Resultados totales		16	148	164	

Sensibilidad Relativa: **93.75%** (95% IC: 88.95% - 96.55%)

Especificidad Relativa: **98.65%** (95% IC: 95.46% - 99.61%)

Precisión Global: **98.17%** (95% IC: 94.76% - 99.38%)

IC: Intervalo de confianza

Consideraciones adicionales

- Asegúrese de utilizar la cantidad indicada de muestra para la prueba, ya que demasiada o muy poca muestra puede conducir a una desviación de los resultados.
- Es necesaria la purificación de ADN viral previo al análisis para obtener mejores resultados.
- El pretratamiento de la muestra es sensible al tiempo y temperatura. Para evitar resultados incorrectos, se recomienda seguir tal cual los pasos enunciados en el presente documento.
- No intercambie reactivos de diferentes lotes ni use reactivos de otras pruebas disponibles comercialmente. Los componentes de esta prueba se combinan con precisión para un rendimiento óptimo.
- Las micropipetas y consumibles deben ser estériles. Se recomienda irradiar con luz UV por 15 minutos antes de su uso, las micropipetas previamente limpiadas con cloro y etanol asegúrese de no dejar residuos.
- Se recomienda el uso de equipo de protección al trabajar muestras.
- PRECAUCIÓN:** Permita que los reactivos y las muestras se descongelen completamente antes de su uso. Mezcle el reactivo suavemente antes de usar teniendo la precaución de no generar espuma. Regrese a su temperatura de almacenamiento después de su uso.
- PRECAUCIÓN:** No deje abierto el contenedor de las pruebas VPH-NET, solo ábrala hasta su uso, la presencia de humedad puede afectar el desempeño de la prueba.
- Evite interrupciones prolongadas de los pasos del ensayo. Asegure las mismas condiciones de trabajo para todos los tubos.
- Calibre las micropipetas con frecuencia para asegurar la precisión de la distribución de muestras/reactivos. Use puntas diferentes de micropipeta en cada muestra y reactivo para evitar contaminación cruzada.
- La prueba podría verse afectada por el polvo, reactivos químicos y/o sustancias como hipoclorito de sodio, ácidos, álcalis, etanol, etc. No realice el ensayo en presencia de estas sustancias y utilice puntas nuevas de preferencia con filtro.
- Todas las muestras de origen humano deben considerarse potencialmente infecciosas. El cumplimiento estricto de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) puede garantizar la seguridad del personal.
- Todos los productos de desecho generados por este Kit deben disponerse de acuerdo a la NOM-087 vigente sobre el manejo de Residuos Biológico infecciosos.

Referencias

- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J and Jemal A: Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 65:87-108, 2015.
- López Rivera, M. G., Flores, M. O., Villalba Magdaleno, J. D., & Sánchez Monroy, V. (2012). Prevalence of human papillomavirus in women from Mexico City. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*, 2012, 384758.
- Joura EA, Ault KA, Bosch FX, Brown D, Cuzick J, Ferris D, et al. Attribution of 12 high-risk human papillomavirus genotypes to infection and cervical disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(10):1997-2008.
- Zaravinos A, Mammias IN, Sourvinos G and Spandidos DA: Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV). *Int J Biol Marker.* 24:215-222, 2009.
- Kumvongpin, R., Jearanaikoon, P., Wilailuckana, C., Sae-Ung, N., Prasongdee, P., Daduang, S. ... Daduang, J. (2017). Detection assay for HPV16 and HPV18 by loop-mediated isothermal amplification with lateral flow dipstick tests. *Molecular Medicine Reports*, 15, 3203-3209.
- Instituto Nacional del Cáncer. (2020). Explicación de las recomendaciones de la sociedad Americana contra el Cáncer sobre los exámenes de detección del cáncer d cuello uterino. *Cancer.gov*.

Índice de símbolos

	Consultar el instructivo de uso
	Solo para evaluación de desempeño <i>in vitro</i>
	Almacenar entre 2 - 30 °C
	No utilizar si el paquete está dañado

	Caducidad
	Número de catálogo
	Número de lote
	No reutilizar