VPH-NET

'Para muestra de hisopado cervical/uretral o lesiones sospechosas de VPH'

SCA 1223/01

REF DLVPH01

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 y 45) 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 y 45 tienen una prevalecía del 80% pues se asocian con lesiones precancerosas y cáncer cervical [3]. Existen diferentes tipos de pruebas para la detección de CCU como el Papanicolau y la colposcopía, 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 VPH-NET es un inmunoensayo cromatográfico de flujo lateral para la detección cualitativa de ADN viral correspondiente a los genotipos 16, 18, 31, 33 y 45 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 y 33 y en el tubo 2 los genotipos 31 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 la ésta por acción capilar. Si la muestra contiene ADN de VPH de los genotipos 16, 18, 31, 33 o 45 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 o 45) de VPH. Por el contrario, si no hay alguno de los genotipos (16, 18, 31, 33 o 45) 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.

Materiales

Incluidos (según presentación):

Presentación / Material	**10** reacciones/ cantidad	**20** reacciones/ cantidad	**30** reacciones/ cantidad
Instructivo de uso	1 pieza	1 pieza	1 pieza
Reactivo seco 1	10 tubos	20 tubos	30 tubos
Reactivo seco 2	10 tubos	20 tubos	30 tubos
Tubos con reactivo de corrimiento	10 tubos	20 tubos	30 tubos
Tira LF	20 tiras	40 tiras	60 tiras
Reactivo diluyente	1 tubo/ 500 µL	1 tubo/ 1000 µL	1 tubo/ 1500 µL
Control negativo	1 tubo/ 50 µL	1 tubo/ 100 µL	1 tubo/ 150 µL
Control positivo	1 tubo/ 50 µL	1 tubo/ 100 µL	1 tubo/ 150 µL

No incluidos:

- Kit de purificación de ADN
- Cronómetro
- Contenedor de RPBI
- Micropipetas
- Puntas nuevas y estériles para micropipeta.
- Termobloque, baño seco o incubador
- Guantes de nitrilo
- Equipo de protección personal
- Material para toma de muestra

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 la bolsa.
- No utilice la prueba después de la fecha de caducidad.

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.

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 H_2O grado biología molecular o Tris-HCl 10 mM pH 8.

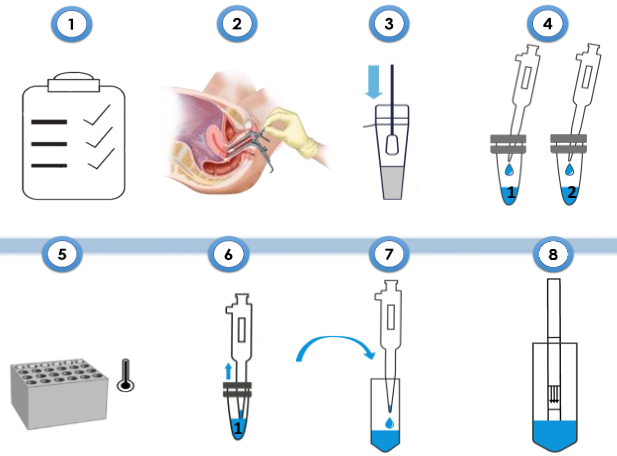
Instrucciones de uso

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 cómo 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 forma independiente para cada tubo:
   - **Control positivo (C+):** Coloque 20 µL de reactivo diluyente a un tubo de reactivo seco 1, luego 5 µL de control positivo y mezcle por pipeteo, al finalizar cierre el tubo y rotule con C+. Repita este paso pero usando un tubo con reactivo seco 2.
   - **Control negativo (C-):** Coloque 20 µL de reactivo diluyente a un tubo de reactivo seco 1, luego 5 µL de control negativo y mezcle por pipeteo, al finalizar cierre el tubo y rotule con C-. Repita este paso pero usando un tubo con reactivo seco 2.
   - **Muestra:** Coloque 20 µL de reactivo diluyente a un tubo de reactivo seco 1, luego 5 µL de muestra y mezcle por pipeteo, al finalizar cierre el tubo y rotule con M1. Repita este paso pero usando un tubo con reactivo seco 2.

Nota: se recomienda realizar duplicados por cada muestra a analizar. Cualquier cambio en el volumen de los reactivos, muestras o controles puede generar resultados erróneos.

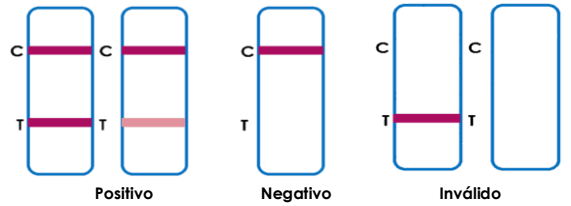
5. Coloque los tubos generados a 65 °C por 30 minutos en alguno de los siguientes equipos: termobloque, baño seco o incubador. Al finalizar saque los tubos del equipo.
6. Recolecte 10 µL de uno de los tubos del paso anterior (paso 5).
7. Transfiera los 10 µL recolectados previamente a un tubo de reactivo de corrimiento, homogenice por vortex o pipeteo y rotule como C+, C- o M1/M2 según el tubo donde recolecto los 10 µL. (Repita este paso para los tubos restantes siendo un tubo por separado).
8. Saque una Tira LF (o más según el número de tubos preparados del paso 7) de su contenedor y colóquela en un tubo con reactivo de corrimiento preparado en el punto anterior e 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.



ATENCIÓN: Un esquema simplificado de las instrucciones de uso se encuentran detallados e ilustrados en la página 3 de 3 de este instructivo.

Interpretación de resultados

- **Tira LF**



Positivo **Negativo** **Inválido**

Emita un dictamen en función de la siguiente tabla:

Control positivo	Resultado: Se visualiza una línea de color en la región de control (C) y otra línea de color en la región de prueba (T). Un resultado positivo indica que se siguió de manera correcta el procedimiento.
Control negativo	Resultado: Únicamente se visualiza una línea de color en la región de control (C). Un resultado negativo indica que se siguió de manera correcta el procedimiento.

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

Control de calidad

Un control interno está incluido en cada tira (LF). Una línea de color aparece en la región control (C), este es el control interno del procedimiento, su función es confirmar que hubo suficiente cantidad de muestra y el procedimiento fue correcto. Esta prueba incluye controles, por lo que, se recomienda emplearlos en cada análisis de muestra como buena práctica de laboratorio.

Limitaciones

- 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 y 45, esto no descarta la infección por cualquier otro genotipo de VPH.
- Esta prueba únicamente detecta los genotipos 16, 18, 31, 33 y 45 de ADN viral de VPH y 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 y 45 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 adquiera 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. Los resultados no mostraron reacción cruzada.

Sustancias interferentes

Se analizaron muestras cervicales positivas y negativas enriquecidas con sangre total hasta el 2%, células mononucleares de sangre periférica hasta 10^6 células/mL y moco cervical consideradas como interferentes endógenos que podrían estar presentes en las muestras cervicales; de la misma manera se probó con productos de higiene femenina y contracepción entre ellos geles y espumas anticonceptivas, duchas vaginales, cremas antifúngicas con 1% de clotrimazol, hidrocloruro de fenazopiridina, hidrocortisona al 1%, nitrato de miconazol al 2%, ungüento de tioconazol y benzocaína al 20%. No se encontró ninguna interferencia con alguna de las sustancias antes mencionadas.

Desempeño

Se evaluaron 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 y 45), 2 al genotipo 81, 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 tenidos relaciones sexuales, sangrado vaginal fuera del periodo 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.

Método		**qPCR**		**Resultados totales**
Prueba VPH-NET	**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

[1]. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J and Jemal A: Global cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin. 65:87–108. 2015.

[2]. López Rivera, M. G., Flores, M. O., Villalba Magdaleno, J. D., & Sánchez Monroy, V. (2012). Prevalence of human papillomavirus in women from Mexico City. Infectious diseases in obstetrics and gynecology, 2012, 384758.

[3]. Joura EA, Ault KA, Bosch FX, Brown D, Cuzick J, Ferris D, et al. Attribution of 12 high-risk human papillomavirus genotypes to infection and cervical disease. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2014;23(10):1997-2008.

[4]. Zaravinos A, Mammas IN, Sourvinos G and Spandidos DA: Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV). Int J Biol Marker. 24:215–222. 2009.

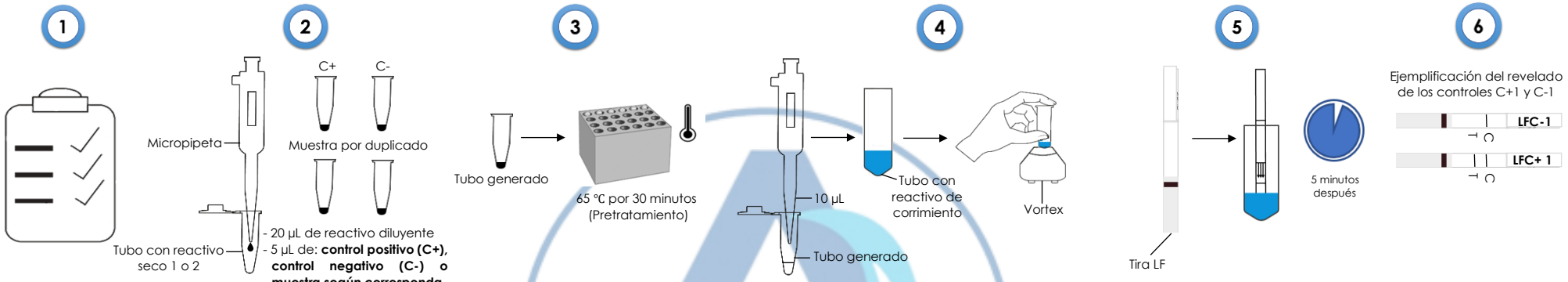
[5]. Kumvongpin, R., Jearanaikoon, P., Wilailuckana, C., Sae-Ung, N., Prasongdee, P., Daduang, S. ... Daduang, J. (2017). Detection assay for HPV16 and HPV18 by loop-mediated isothermal amplification with lateral flow dipstick tests. Molecular Medicine Reports, 15, 3203-3209.

[6]. Instituto Nacional del Cáncer. (2020). Explicación de las recomendaciones de la sociedad Americana contra el Cáncer sobre los exámenes de detección del cáncer d cuello uterino. Cancer.gov.

Índice de símbolos

	Consultar el instructivo de uso		Caducidad
	Solo para evaluación de desempeño *in vitro*	REF	Número de catálogo
2°C 30°C	Almacenar entre 2 – 30 °C	LOT	Número de lote
	No utilizar si el paquete está dañado		No reutilizar

Esquema de instrucciones de uso



- Identifique cada material y asegúrese de tener todo lo necesario.

Preparación de muestra:

- Tome un tubo con reactivo seco 1.
- Agregue 20 µL de reactivo diluyente al tubo.
- Agregue 5 µL de muestra (se recomienda hacer duplicado por cada muestra a analizar).
- Repita lo mismo pero con el tubo con reactivo seco 2.

Preparación de controles:

- Tome un tubo con reactivo seco 1 y agregue 5 µL del control positivo (C+).
- Repita lo mismo pero con el tubo con reactivo seco 2.
- Tome un tubo con reactivo seco 1 y agregue 5 µL del control negativo (C-).
- Repita lo mismo pero con el tubo con reactivo seco 2.

- Tome cada tubo generado (C+, C- y muestra) y colóquelos en cualquiera de los siguientes equipos: termobloque, baño seco o incubador.
- Programe el equipo para que alcance una temperatura de 65 °C y déjelos por 30 minutos.

- Tome uno de los tubos generados (C+, C- o muestra) y con ayuda de una micropipeta recolecte 10 µL después transfiéralos a un tubo con reactivo de corrimiento y rotule.
- Mezcle por medio de pipeteo o 5 segundos en vortex.
- Repita este paso para cada uno de los tubos generados restantes.

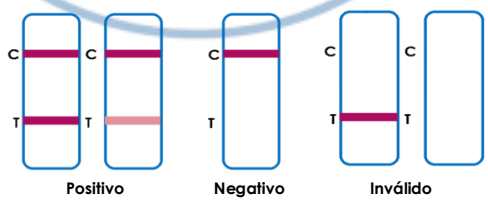
Tome una tira LF y rotúlela según el tubo con reactivo de corrimiento correspondiente elaborado en el paso anterior:

- Tira LF1 para el tubo con reactivo de corrimiento 1 con **muestra**.
- Tira LF2 para el tubo con reactivo de corrimiento 2 con **muestra**.
- Tira LFC+1 en el tubo con reactivo de corrimiento con **C+1**.
- Tira LFC+2 en el tubo con reactivo de corrimiento con **C+2**.
- Tira LFC-1 en el tubo con reactivo de corrimiento con **C-1**.
- Tira LFC-2 en el tubo con reactivo de corrimiento con **C-2**.

Inicie un cronómetro.

- Una vez hayan pasado 5 minutos saque la prueba del tubo, colóquela sobre una superficie plana y limpia

7



- Interprete los resultados conforme a la imagen superior.
  Nota: No interprete los resultados después de 10 minutos.