

	<p>INSTRUCTIVO PARAMETRIZADO</p>	<p>VERSION: 0</p> <p>CODIGO: IT-BM-03</p>
<p>Detección cualitativa de virus causante del papiloma humano PVH</p>		<p>FECHA: 08/May/2024</p>

1. Objeto

Determinación cualitativa mediante PCR de 14 genotipos de virus del papiloma humano de alto riesgo en muestras de ADN extraídas de zona cervical. El análisis identifica de forma expresa los tipos HPV16 y HPV18, al tiempo que detecta el resto de los genotipos de alto riesgo HR (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68).

2. Alcance

Desde que llega la muestra al servicio hasta la validación del resultado.

3. Enfoque diferencial

No aplica

4. Talento humano

Aplica para los bacteriólogos y/o microbiólogos que tienen la competencia en biología molecular para realizar esta prueba y está avalada por la dirección de acuerdo con los entrenamientos proporcionados y la evaluación de competencias. Prueba que se va a procesar solamente en la sede Tesoro.

5. Equipo biomédico

- Micropipetas y puntas estériles con filtro para aerosoles o puntas estériles de desplazamiento positivo (10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL).
- Nexttractor® NX-48S
- ELITe InGenius

6. Medicamentos

- Agua de calidad para biología molecular.

Este medicamento se utiliza para realizar las diluciones de las muestras.

7. Dispositivos médicos e insumos

- Tubos
- Guantes
- Microcentrifuga (spiner).

8. Propósito del análisis

Realizar un ensayo cualitativo de amplificación múltiple en tiempo real de ácidos nucleicos para la detección y la diferenciación del ADN de 14 tipos de virus del papiloma humano de alto riesgo en muestras de ADN extraídas de muestras cervicales. El análisis identifica de forma expresa los tipos HPV16 y HPV18, al tiempo que detecta el resto de genotipos de alto riesgo (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68). El producto High Risk HPV ELITe Panel se utiliza para el diagnóstico in vitro como ayuda en el diagnóstico de infecciones por el HPV, junto con los datos clínicos y los resultados de otras pruebas analíticas del paciente.

9. Principio del procedimiento

El procedimiento consiste en la realización de una reacción de amplificación múltiple en tiempo real con un termostato programable que se suministra con un sistema óptico de detección de fluorescencia (termociclador de amplificación en tiempo real). En cada pocillo, se realizan distintas reacciones de amplificación, comenzando con el ADN extraído por el equipo Nexttractor, para luego amplificar las dianas de PVH de alto riesgo con el equipo Ingenius.

- PVH16 descubierto mediante una sonda específica detectada por el instrumento en tiempo real en el canal para FAM.
- PVH18 descubierto mediante una sonda específica detectada por el instrumento en tiempo real en el canal para JOE/HEX
- PVH de alto riesgo (PVH31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) descubierto mediante una sonda específica detectada por el instrumento en tiempo real en el canal para Texas rojo/Cal Fluor rojo 610.

El kit también amplifica un control interno endógeno basado en el gen ABL, detectado por el instrumento en tiempo real en el canal para Cy5/Quasar 670. El ADN de la diana específica se amplifica mediante cebadores directos e inversos y Taq polimerasa. En la PCR en tiempo real, el producto amplificado se detecta mediante tinte fluorescente. El método se basa en una sonda de DNA con un marcador fluorescente en un extremo y un inhibidor de fluorescencia en el extremo opuesto de la sonda. La proximidad del marcador al inhibidor impide la detección

de su fluorescencia; la descomposición de la sonda por la actividad exonucleasa 5' a 3' de la Taq polimerasa interrumpe la proximidad marcador-inhibidor y permite así una emisión no inhibida de fluorescencia que puede detectarse. La emisión de fluorescencia aumenta a medida que los productos específicos de la reacción de amplificación aumentan y el instrumento la mide durante el procesamiento de la PCR en tiempo real. El ensayo se ha validado con los sistemas descritos en el manual uso.

## 10. Especificaciones de desempeño

**Sensibilidad:** El límite de detección establecido para la prueba permite detectar la presencia de unas 10 copias en 5 µL de ADN añadido a la reacción de amplificación. El proveedor analizó su sensibilidad procesando las siguientes muestras:

- . 9 muestras cervicouterinas que eran positivas para el HPV16
- . 21 muestras cervicouterinas que eran positivas para el HPV18
- . 76 muestras cervicouterinas que eran positivas para el HPV de alto riesgo

Estas muestras fueron previamente analizadas con un producto de amplificación en tiempo real certificado por el Ministerio de Seguridad de Alimentos y Medicamentos (MFDS) de Corea (OmniPlex-HPV, Genematrix, Corea). Y se obtuvieron los siguientes resultados:

Muestras	N	positivas	negativas	no válidas
Muestras cervicales positivas para el HPV16	29	29	0	0
Muestras cervicales positivas para el HPV18	21	21	0	0
Muestras cervicales positivas para el HPV de alto riesgo	76	76	0	0

En estos análisis, la sensibilidad diagnóstica del ensayo fue del 100 % para todas las dianas (126/126).

**Especificidad:** La especificidad se determinó con la confirmación de muestras clínicas negativas, se evaluó analizando lo siguiente:

- . 143 muestras cervicouterinas que fueron negativas para el HPV16
- . 151 muestras cervicouterinas que fueron negativas para el HPV18
- . 92 muestras cervicouterinas que fueron negativas para el HPV de alto riesgo.

Las muestras, analizadas previamente con un producto de amplificación en tiempo real certificado por el Ministerio de Seguridad de Alimentos y Medicamentos (MFDS) de Corea (OmniPlex-HPV, Genematrix, Corea), se analizaron en el ensayo utilizando el sistema ELITE InGenius en el modo de procesamiento «Extract + PCR».

Muestras	N	positivas	negativas	no válidas
Muestras cervicales negativas para el HPV16	143	0	143	0
Muestras cervicales negativas para el HPV18	151	0	151	0
Muestras cervicales negativas para el HPV de alto riesgo	92	1	91	0

En este análisis, una muestra cervicouterina presentó un resultado positivo diferente del resto. Este resultado puede explicarse por el bajo título del patógeno que podía ser inferior al límite de detección del método de referencia.

En estos análisis, la especificidad diagnóstica del ensayo fue del 100 % en el caso del HPV16, del 100 % en el caso del HPV18 y del 98,9 % en el caso del HPV de alto riesgo. El valor de corte del Ct del control interno se fija en 35 para cada matriz validada.

**Precisión:** Se evaluó mediante la repetibilidad de este ensayo, procesando 3 duplicados del control positivo, analizado a través del proceso de PCR en la misma sesión (una sesión/instrumento, con una muestra en tres duplicados/sesión). El análisis se realizó en cuatro instrumentos distintos. Los valores Ct de cada diana se utilizaron para calcular el %CV con el fin de evaluar la repetibilidad como imprecisión dentro de una misma sesión y entre sesiones. En las siguientes tablas se incluye un resumen de los resultados.

Repetibilidad dentro de una misma sesión										
Muestra	Sesión	g16 diana			g18 diana			HR diana		
		Ct medio	DE	%CV	Ct medio	DE	%CV	Ct medio	DE	%CV
CP	Instrumento 1	19.83	0.11	0.53	20.61	0.21	1.01	21.66	0.08	0.37
CP	Instrumento 2	19.15	0.03	0.16	20.14	0.05	0.26	20.96	0.05	0.23
CP	Instrumento 3	19.25	0.08	0.40	20.58	0.02	0.10	21.20	0.05	0.24
CP	Instrumento 4	20.02	0.13	0.63	21.72	0.23	1.04	22.26	0.18	0.81

La repetibilidad de este ensayo, como %CV dentro de una misma sesión, no superó el 2 % para todas las dianas.

La repetibilidad de este ensayo, como imprecisión entre sesiones, se analizó con el sistema ELITE InGenius procesando 3 duplicados del control positivo, analizados a través de un proceso de PCR con el mismo operador, el mismo lote de reactivos, el mismo instrumento, en el mismo entorno y en dos días distintos (1 sesión/día cada 2 días, con una muestra en tres duplicados/sesión). El análisis se realizó en dos laboratorios distintos. Los valores Ct de cada diana se utilizaron para calcular el %CV con el fin de evaluar la repetibilidad como imprecisión dentro de una misma sesión y entre sesiones. En las siguientes tablas se incluye un resumen de los resultados:

Repetibilidad entre sesiones										
Muestra	Sesión	g16 diana			g18 diana			HR diana		
		Ct medio	DE	%CV	Ct medio	DE	%CV	Ct medio	DE	%CV
CP	Sesión 1 + sesión 2	19.49	0.38	1.94	20.38	0.29	1.43	21.31	0.39	1.81
CP	Sesión 3 + sesión 4	19.91	0.22	1.10	21.56	0.25	1.15	22.24	0.20	0.88

La repetibilidad de este ensayo, como %CV dentro de una misma sesión, no superó el 2 % para todas las dianas.

### 11. Muestra recomendada

Las muestras cervicales para la extracción del ADN deben recogerse en un medio Thinprep o Cellpreserv e identificarse con el código de barras de la petición del laboratorio, así como transportarse y conservarse a temperatura ambiente (18°C a 25°C), o refrigerar de 2°C a 8°C durante un máximo de dos días. Las muestras cervicales pueden congelarse y conservarse a -20°C durante un máximo dos meses, o a -70°C hasta dos años.

### 12. Reactivos y suministros requeridos:

#### Para extracción (NX-48S Viral NA):

- . Nextractor® NX-48S
- . Placas de extracción Nextractor
- . Strips
- . Tubos Sarstedt de 0,5 mL con tapón roscado bordeado.

#### Para extracción (NX-48S Viral NA):

- . Nextractor® NX-48S
- . Placas de extracción Nextractor
- . Strips
- . Tubos Sarstedt de 0,5 mL con tapón roscado bordeado.

#### Manipulación del kit de reactivos:

El kit de reactivos para la amplificación se suministra listo para uso y deben almacenarse a -20 °C y no deben pasar por más de 10 ciclos de descongelación.

### 13. Procedimientos del control de calidad

Antes de analizar una muestra, es indispensable preparar y aprobar los controles de amplificación correspondientes para el lote en uso. Los resultados de los controles de amplificación, aprobados y guardados en la base de datos, se deben procesar cada 15 días, cuando se utiliza un nuevo lote de reactivos de amplificación, cuando los resultados de los análisis de control se encuentran fuera de las especificaciones o cuando se realiza una operación importante de mantenimiento en el instrumento ELITE InGenius.

Los controles que se utilizan son HR-HPV Positive Control (incluido en el kit de PVH suministrado por el proveedor) que se debe almacenar a -20 °C y como control negativo de amplificación, se usa agua de calidad para biología molecular, ambos se procesan con los protocolos HR-HPV ELITE\_NC.

Antes de analizar una muestra, comprobar que los controles de amplificación se han procesado con el lote de reactivos de amplificación pertinente y que los resultados se han aprobado y son válidos.

En las reacciones de amplificación del control positivo del HPV de alto riesgo, los valores de Ct se utilizan para validar la amplificación y la detección, tal como se describe en la siguiente tabla:

Reacción HR-HPV Positive Control Detector FAM «g16»	Resultado del ensayo	Amplificación/detección
22 ± 3	POSITIVO	CORRECTA
Reacción HR-HPV Positive Control Detector JOE «g18»	Resultado del ensayo	Amplificación/detección
22 ± 3	POSITIVO	CORRECTA
Reacción HR-HPV Positive Control Detector Texas rojo «HR»	Resultado del ensayo	Amplificación/detección
22 ± 3	POSITIVO	CORRECTA
Reacción HR-HPV Internal Control Detector Cy5 «HR»	Resultado del ensayo	Amplificación/detección
*ND o N/A	-	CORRECTA

En la reacción de amplificación del control negativo, el valor Ct del HPV se utiliza para validar la amplificación y la detección, tal como se describe en la siguiente tabla:

Reacción HR-HPV Negative Control Detector FAM «g16»	Resultado del ensayo	Amplificación/detección
*ND o N/A	NEGATIVO	CORRECTA
Reacción HR-HPV Negative Control Detector JOE «g18»	Resultado del ensayo	Amplificación/detección
*ND o N/A	NEGATIVO	CORRECTA
Reacción HR-HPV Negative Control Detector Texas rojo «HR»	Resultado del ensayo	Amplificación/detección
*ND o N/A	NEGATIVO	CORRECTA
Reacción HR-HPV Internal Control Detector Cy5 «HR»	Resultado del ensayo	Amplificación/detección
*ND o N/A	-	CORRECTA

Uso: Cuando se requiera procesar el control de calidad, sacar la alícuota del control positivo y la alícuota de agua molecular (control negativo) del congelador espere 20 minutos a temperatura ambiente y luego homogenice el material con pipeta utilizando punta desechable.

Una vez procesado retirar inmediatamente el control positivo y congelarlo nuevamente y retirar el control negativo y descartarlo.

#### 14. Interferencias

El potencial de interferencia de este ensayo se evaluó con sustancias que pueden encontrarse en muestras cervicouterinas (eritrocitos, lubricantes y lavados vaginales, geles anticonceptivos, cremas antifúngicas, espermicidas, mucosas). No se observó ninguna interferencia en el rendimiento de este ensayo en presencia de tales sustancias. La prueba no presenta interferencia con medicamentos.

Los posibles polimorfismos existentes en la región del ADN de la diana cubierto por los cebadores y las sondas del producto pueden afectar negativamente a la detección del ADN de la diana.

Como en cualquier otro producto sanitario para diagnóstico, existe un riesgo residual de obtener con él resultados no válidos, falsos positivos y falsos negativos. Este riesgo residual no puede eliminarse ni reducirse aún más. En determinadas situaciones, el riesgo residual puede hacer que se tomen decisiones incorrectas, con consecuencias potencialmente graves para el paciente.

**Reactividad cruzada:** Para evaluar la reactividad cruzada de este ensayo, se utilizaron un total de 80 cepas de referencia de microorganismos (bacterias, levaduras, virus, etc.) que no estaban relacionadas con las dianas de detección. Todas las muestras dieron un resultado negativo en el análisis.

#### 15. Principio para el cálculo de resultados

El ADN de la diana específica se amplifica mediante cebadores directos e inversos y Taq polimerasa. En la PCR en tiempo real, el producto amplificado se detecta mediante tinte fluorescente. El método se basa en una sonda de DNA con un marcador fluorescente en un extremo y un inhibidor de fluorescencia en el extremo opuesto de la sonda. La proximidad del marcador al inhibidor impide la detección de su fluorescencia; la descomposición de la sonda por la actividad exonucleasa 5' a 3' de la Taq polimerasa interrumpe la proximidad marcador-inhibidor y permite así una emisión no inhibida de fluorescencia que puede detectarse. La emisión de fluorescencia aumenta a medida que los productos específicos de la reacción de amplificación aumentan y el instrumento la mide durante el procesamiento de la PCR en tiempo real.

El software del instrumento analiza automáticamente e interpreta las señales de fluorescencia emitidas por las sondas de los genes diana («g16», «g18» y «HR») y por la sonda del control interno («IC») endógeno en las reacciones de amplificación de la muestra utilizando los parámetros incluidos en el protocolo de ensayo.

#### 16. Resultados

El límite de detección permite detectar la presencia de unas 10 copias en 5 µL de ADN añadido a la reacción de amplificación.

Resultado de la sesión de la muestra	Interpretación
g16: DNA Detected	Se ha detectado ADN de HPV16 en la muestra.
g18: DNA Detected	Se ha detectado ADN de HPV18 en la muestra.
HR: DNA Detected	Se ha detectado ADN de HPV de alto riesgo en la muestra.
g16: DNA Not Detected or below the LoD	No se ha detectado ADN de HPV16 en la muestra. La muestra es negativa válida para este patógeno o su concentración es inferior al límite de detección del ensayo.
g18: DNA Not Detected or below the LoD	No se ha detectado ADN de HPV18 en la muestra. La muestra es negativa válida para este patógeno o su concentración es inferior al límite de detección del ensayo.
HR: DNA Not Detected or below the LoD	No se ha detectado ADN de HPV de alto riesgo en la muestra. La muestra es negativa válida para este patógeno o su concentración es inferior al límite de detección del ensayo.
Invalid - Retest Sample.	Resultado no válido del ensayo causado por un fallo del control interno debido a una extracción incorrecta, al arrastre de inhibidores (o a un error de muestreo durante el uso del control interno endógeno). Es necesario repetir el análisis.

#### 17. Interpretación del resultado

El Virus del Papiloma Humano (VPH) es un virus de transmisión sexual que contiene ADN y que infecta en especial las mucosas orales y mucosas genitales. El VPH infecta las células escamosas que revisten las superficies internas de los órganos afectados. La mayoría de los cánceres relacionados con el VPH son un tipo de cáncer llamado carcinoma de células escamosas. Algunos cánceres de cuello uterino surgen de la infección por el VPH en las células glandulares del cuello uterino. Estos se llaman adenocarcinomas.

Existen más de 240 variedades diferentes del VPH, de los cuales 15 de ellos están relacionados con el cáncer de cuello uterino, de vagina, de vulva, de ano y orofaringe (parte posterior de la lengua, paladar, garganta y amígdalas). Entre las cepas más peligrosas están las 16 y 18, las cuales están relacionadas prácticamente en un 100% con las lesiones preneoplásicas e invasoras de cáncer de cuello.

La detección temprana de este virus es indispensable para brindar un tratamiento oportuno y prevenir el cáncer cervicouterino.

La evidencia muestra que las pruebas de VPH tienen una mayor sensibilidad y son más efectivas para detectar las lesiones precancerosas, ofreciendo una gran oportunidad para mejorar la efectividad, simplificando todo el proceso de detección temprana y tratamiento de estas lesiones; por lo cual la prueba de VPH es una herramienta clave para la prevención del cáncer cervicouterino.

Los resultados posibles en el procesamiento de esta prueba son detectado o no detectado, el análisis identifica de forma expresa los tipos HPV16 y HPV18, al tiempo que detecta el resto de tipos de alto riesgo (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68). La prueba se usa para el diagnóstico in vitro y como ayuda en el diagnóstico de infecciones por el HPV que, junto con los datos clínicos y los resultados de otras pruebas analíticas del paciente, permiten determinar el estado del paciente.

#### 18. Precauciones de seguridad

El personal del laboratorio que vaya a procesar debe usar todos los implementos de protección personal cuando manipulen sustancias infecciosas. Manipular y eliminar todas las muestras biológicas como si fueran potencialmente infecciosas. Evitar el contacto directo con las muestras biológicas. No derramar ni rociar ningún producto. Los materiales que entran en contacto con las muestras biológicas deben tratarse durante al menos 30 minutos con hipoclorito de sodio al 3 %, o tratarse en autoclave durante una hora a 121°C antes de su eliminación. Los residuos deben tratarse y eliminarse conforme a las normas de seguridad aplicables. El material desechable combustible debe incinerarse. Los residuos líquidos que contienen ácidos o bases deben neutralizarse antes de eliminarlos.

Para evitar la contaminación de las muestras, productos o equipos, limpiar el área antes de su uso.

Los pocillos en las placas de reactivo de extracción contienen etanol y sal caotrópica. Estas sustancias deben considerarse inflamables,

nocivas e irritantes. El Nextractor® NX-48S y las placas de reactivos están diseñados para usarse con sustancias potencialmente infecciosas.

19. Referencias

Organización Mundial de la Salud. Control integral del cáncer cervicouterino: guía de prácticas esenciales - 2ª ed. 2015.  
Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. Directrices de la OPS/OMS sobre tamizaje y tratamiento de las lesiones precancerosas para la prevención del cáncer cervicouterino.

Si este documento se encuentra impreso no se garantiza su vigencia, por lo tanto es copia NO CONTROLADA, la versión actual se encuentra en Isolución

VERSION		FECHA		RAZON DE LA ACTUALIZACION	
<div>⬆</div>					
ELABORO		REVISO		APROBO	
<div><div>Nombre:</div>Yulime Andrea Monsalve Martinez</div> <div><div>Cargo:</div>Dirección de Calidad</div> <div><div>Fecha:</div>08/May/2024</div>		<div><div>Nombre:</div>Uriel Alonso Hurtado Paez</div> <div><div>Cargo:</div>Bacteriólogo(a)</div> <div><div>Fecha:</div>08/May/2024</div>		<div><div>Nombre:</div>Carlos Gonzalo Robledo Restrepo</div> <div><div>Cargo:</div>Director General</div> <div><div>Fecha:</div>09/May/2024</div>	

COPIA CONTROLADA