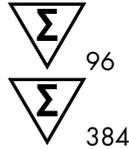


Agosto 2015

Instrucciones de uso para la prueba *digene*[®] HC2 High-Risk HPV DNA



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 13 tipos de alto riesgo del virus del papiloma humano (VPH) en muestras del cuello uterino y vaginales

Para utilizar con:

- *digene* HC2 DNA Collection Device
- *digene* Specimen Transport Medium
- Hologic PreservCyt[®] Solution
- BD SurePath[®] Preservative Fluid



REF

5197-1330 (kit de 1 placa)
618111 (kit de 4 placas)



QIAGEN
19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874
USA

EC REP

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
ALEMANIA

1058538ES Rev. 02

Cambios principales respecto de la versión previa de las instrucciones de uso:

- Se ha añadido el procedimiento de preparación de muestras de sedimento celular de posgradiente recogidas en SurePath utilizando el kit QIAasymphony® DSP HPV Media junto con los datos de rendimiento asociados.
- Actualización en relación con el cumplimiento de las directrices del *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* (GHS, Sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos).

Índice

| | |
|---|----|
| Uso previsto..... | 8 |
| Resumen y explicación..... | 9 |
| Información sobre el patógeno | 10 |
| Principio del procedimiento | 10 |
| Preparación de las muestras en el QIAasymphony SP | 12 |
| Preparación de las muestras con el kit QIAasymphony DSP HPV Media | 12 |
| Preparación de las muestras con el kit QIAasymphony DSP AXpH DNA..... | 13 |
| Análisis con el sistema Rapid Capture System (RCS)..... | 13 |
| Materiales suministrados | 16 |
| Kit de 1 placa..... | 16 |
| Kit de 4 placas | 16 |
| Contenido del kit..... | 17 |
| Materiales necesarios pero no suministrados | 19 |
| Equipo y materiales para diagnóstico <i>in vitro</i> | 19 |
| Equipo y materiales de uso general en el laboratorio | 20 |
| Equipo y materiales adicionales para la preparación de muestras recogidas en PreservCyt | 22 |
| Equipo y materiales adicionales para la preparación de muestras recogidas en SurePath | 22 |
| Advertencias y precauciones | 23 |
| Advertencias | 23 |
| Muestras | 23 |
| Azida sódica..... | 24 |
| Tampón N2 | 24 |
| Análisis automatizado con el sistema RCS | 25 |
| Frasas sobre seguridad y riesgo en relación con los componentes | 25 |
| Precauciones | 26 |

| | |
|---|----|
| Conservación y manipulación de los reactivos | 28 |
| Componentes del kit | 28 |
| Reactivos preparados | 28 |
| Recogida y preparación de las muestras | 29 |
| Muestras cervicales y vaginales en STM | 29 |
| Biopsias cervicales | 30 |
| Muestras cervicales en solución PreservCyt..... | 30 |
| Muestras cervicales en la solución conservante SurePath..... | 31 |
| Preparación automática de muestras recogidas en SurePath | 32 |
| Preparación automática de muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath | 33 |
| Preparación manual de muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath | 33 |
| Procedimiento | 34 |
| Reagent preparation | 34 |
| Reactivo de desnaturalización | 36 |
| Reactivo de desnaturalización 2 | 37 |
| Mezcla de la sonda | 38 |
| Tampón de lavado | 39 |
| Creación del diseño de placa..... | 40 |
| Preparación de las muestras | 42 |
| Preparación de las muestras en PreservCyt con el kit QIAasymphony DSP HPV Media. | 42 |
| Preparación de muestras recogidas en SurePath y de muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath con el kit QIAasymphony DSP HPV Media | 43 |
| Preparación de las muestras en PreservCyt con el kit QIAasymphony DSP AXpH DNA43 | 44 |
| Preparación manual de muestras recogidas en PreservCyt..... | 44 |
| Preparación manual de muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath | 44 |
| Desnaturalización e hibridación de muestras preparadas con QIAasymphony SP..... | 47 |
| Desnaturalización de calibradores, controles de calidad y eluidos de ADN para una prueba manual | 47 |

| | |
|--|----|
| Punto de detención opcional de los eluidos de ADN | 49 |
| Hibridación de los eluidos de ADN..... | 49 |
| Desnaturalización e hibridación de muestras recogidas en STM y de muestras de sedimento celular de posgradiente con PreservCyt y SurePath preparadas manualmente | 49 |
| Desnaturalización de calibradores, controles de calidad y muestras recogidas en STM | 50 |
| Punto de detención opcional de muestras recogidas en STM preparadas y de muestras de sedimento celular de posgradiente con PreservCyt y SurePath preparadas manualmente..... | 52 |
| Hibridación de muestras recogidas en STM preparadas y de muestras de sedimento celular de posgradiente con PreservCyt y SurePath preparadas manualmente | 53 |
| Hibridación con una microplaca y el Microplate Heater I | 53 |
| Hibridación con microtubos y baño María | 55 |
| Captura de los híbridos | 56 |
| Detección de los híbridos | 58 |
| Lavado..... | 60 |
| Método del Automated Plate Washer | 60 |
| Método de lavado manual | 61 |
| Amplificación de la señal..... | 62 |
| Medición de la microplaca de captura y generación de resultados | 63 |
| Interpretación de los resultados | 64 |
| Resultados del análisis de muestras recogidas en STM..... | 64 |
| Resultados del análisis de muestras recogidas en SurePath | 64 |
| Resultados del análisis de muestras recogidas en PreservCyt | 64 |
| Valor de RLU/CO próximo a 1,0..... | 65 |
| Otros tipos del VPH | 65 |
| Verificación de la calibración del ensayo..... | 65 |
| Calibrador negativo | 66 |
| Calibrador positivo | 66 |
| Media del calibrador positivo/media del calibrador negativo..... | 66 |
| Cálculo del valor de corte | 67 |
| Controles de calidad | 67 |

| | |
|--|-----|
| Limitaciones | 69 |
| Características del rendimiento | 71 |
| Rendimiento clínico en el cribado de pacientes con resultados normales en la citología cervical como ayuda en la evaluación del riesgo para el tratamiento de las pacientes ... | 71 |
| Rendimiento clínico en el cribado de pacientes con resultados de ASC-US en la citología cervical para determinar la necesidad de derivación a colposcopia | 76 |
| Sensibilidad y especificidad clínicas para la determinación del riesgo de padecer lesiones de alto grado en mujeres con resultados de LSIL o HSIL en la citología | 79 |
| Rendimiento con muestras vaginales o recogidas por la paciente | 83 |
| Sensibilidad analítica | 84 |
| Equivalencia entre tipos de muestras | 85 |
| Equivalencia entre muestras recogidas en STM y muestras recogidas en PreservCyt.. | 85 |
| Equivalencia entre la preparación manual de muestras recogidas en PreservCyt y la preparación de muestras recogidas en PreservCyt con ayuda del kit QIASymphony DSP HPV Media..... | 85 |
| Equivalencia entre la preparación manual de muestras recogidas en PreservCyt y la preparación de muestras recogidas en PreservCyt con ayuda del kit QIASymphony DSP AXpH DNA | 86 |
| Equivalencia entre la preparación de muestras recogidas en STM y la preparación manual de muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath..... | 86 |
| Equivalencia entre la preparación manual de muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath y la preparación de muestras recogidas en SurePath con el kit QIASymphony DSP HPV Media | 88 |
| Equivalencia entre la preparación manual de muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath y la preparación de muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath con el kit QIASymphony DSP HPV Media | 89 |
| Concordancia entre métodos de análisis..... | 89 |
| Reproducibilidad..... | 93 |
| Reproducibilidad global del análisis manual | 93 |
| Reproducibilidad con muestras clínicas recogidas en STM..... | 94 |
| Reproducibilidad con muestras clínicas recogidas en PreservCyt | 97 |
| Reproducibilidad con muestras clínicas recogidas en SurePath | 108 |
| Reactividad cruzada..... | 114 |

| | |
|--|-----|
| Hibridación cruzada | 116 |
| Efecto de la sangre y de otras sustancias sobre las muestras recogidas en STM | 116 |
| Efecto de la sangre y de otras sustancias sobre las muestras recogidas en PreservCyt. 117 | |
| Preparación manual de las muestras | 117 |
| Preparación de las muestras con el kit QIAAsymphony DSP HPV Media | 117 |
| Preparación de las muestras con el kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA..... | 118 |
| Efecto de la sangre y de otras sustancias sobre las muestras recogidas en SurePath ... | 119 |
| Preparación de las muestras recogidas en SurePath con el kit QIAAsymphony DSP HPV Media | 119 |
| Preparación de muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath con el kit QIAAsymphony DSP HPV Media..... | 120 |
| Arrastre..... | 120 |
| Estabilidad de los reactivos en el instrumento | 122 |
| Bibliografía | 125 |
| Símbolos | 130 |
| Guía de resolución de problemas..... | 131 |
| Control de contaminación del DR2..... | 139 |
| Control de contaminación del aparato de lavado y/o de la fuente de agua | 139 |
| Control de contaminación del Automated Plate Washer | 140 |
| Información de contacto..... | 142 |

Uso previsto

Para uso diagnóstico *in vitro* (IVD).

La prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA con la tecnología Hybrid Capture® 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 13 tipos de alto riesgo del VPH en muestras cervicales y vaginales.

Las muestras cervicales y vaginales que pueden analizarse con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA son las siguientes:

- Muestras cervicouterinas recogidas por un médico con el dispositivo de recogida de ADN *digene* HC2 DNA Collection Device.
- Muestras vaginales recogidas por la propia paciente con el dispositivo de recogida de ADN *digene* HC2 DNA Collection Device.
- Biopsias recogidas en *digene* Specimen Transport Medium (STM, medio de transporte de muestras).
- Muestras recogidas con un dispositivo de recogida de tipo cepillo o con un dispositivo de recogida combinado de escobillón/espátula y posteriormente colocadas en la solución PreservCyt o en la solución conservante SurePath.

El uso de esta prueba está indicado:

- 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, para identificar a las mujeres que presentan un mayor riesgo de desarrollo de cáncer de cuello uterino o de presencia de lesiones cervicales de alto grado. A medida que aumenta la edad, el diagnóstico del VPH es progresivamente indicativo de lesiones cervicales.
- Como prueba de seguimiento para pacientes que hayan obtenido resultados anormales en una citología previa o con lesiones cervicales, con el fin de determinar la necesidad de solicitar una colposcopia u otros procedimientos de seguimiento.
- Como prueba de seguimiento para los 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 cervical antes de la colposcopia. En estas pacientes, el resultado de la prueba

digene HC2 High-Risk HPV DNA ayudará al médico en el tratamiento de la paciente al facilitar la evaluación del riesgo mediante la determinación de la ausencia de lesiones de alto grado.

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 cervicales, vaginales y vulvares (1-3). Generalmente se acepta que estos virus se transmiten principalmente por contacto sexual y que los tipos de alto riesgo del VPH son el principal factor de riesgo reconocido para el desarrollo de cáncer de cuello uterino (4-8).

Hasta la fecha no se puede cultivar el VPH *in vitro*, y las pruebas inmunológicas son insuficientes para determinar la presencia de infección del cuello uterino 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 citologías cervicales. 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 (8-10). Se ha demostrado que los tipos 31, 33 y 35 del VPH tienen una asociación intermedia con el cáncer (2,11-14). Esta asociación intermedia se debe a que estos tipos se detectan con mayor frecuencia en las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado que en los carcinomas. Por consiguiente, la inducción de carcinomas por la presencia de estos tipos es menos probable que en el caso de la presencia de ADN de tipos de alto riesgo del VPH (15). En conjunto, estos 5 tipos de VPH son responsables de aproximadamente el 73% de las infecciones por el VPH (16, 17). Se han identificado otros tipos de VPH, como los tipos 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68, como los principales tipos de VPH detectables en el resto de las lesiones (17-27). Estos tipos de VPH también pueden clasificarse en grupos de riesgo intermedio y de riesgo alto según su distribución relativa en varias categorías de diagnóstico histopatológico (16, 17, 24-28).

Se ha demostrado la presencia de ADN del VPH en aproximadamente el 10% de las mujeres que tienen un epitelio cervical normal, pero la prevalencia real en grupos específicos de mujeres depende en gran medida de la edad y de otras variables demográficas (2, 10, 16, 29). Estudios prospectivos han demostrado que en el 15-28% de las mujeres con un resultado positivo en el análisis de ADN del VPH aparecieron lesiones intraepiteliales escamosas (SIL, *squamous intraepithelial lesions*) en los dos años siguientes, en comparación con únicamente el 1-3% de las

mujeres con un resultado negativo en dicho análisis (30, 31). 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 (30).

Información sobre el patógeno

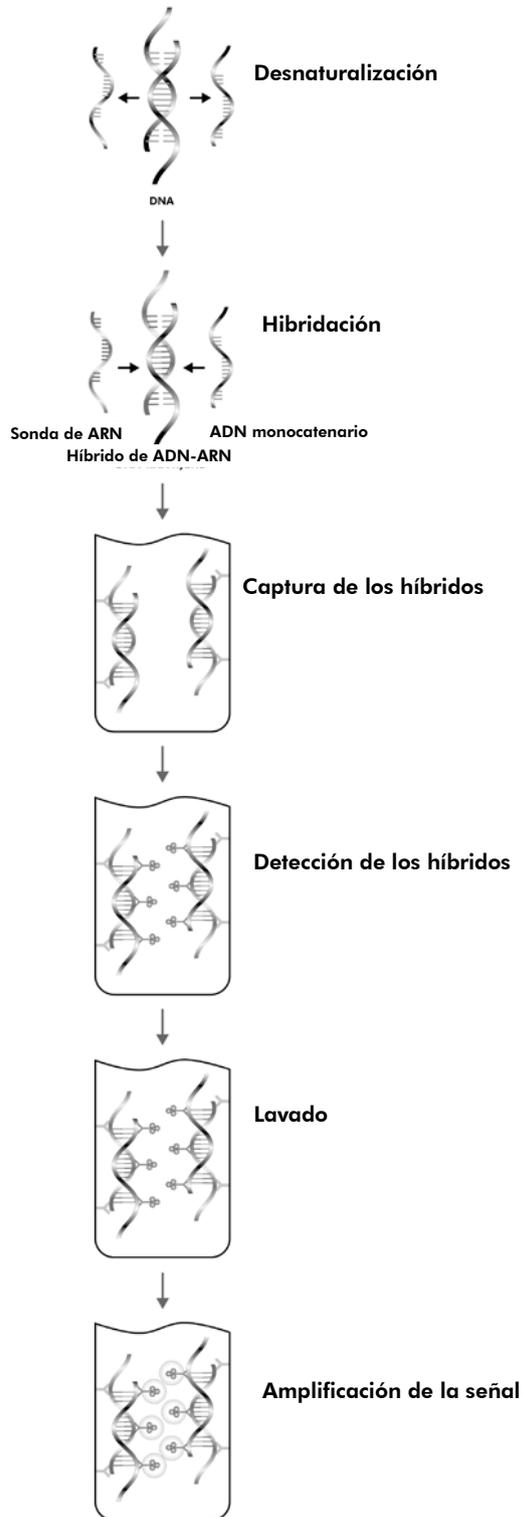
El virus del papiloma humano está compuesto por una partícula viral icosaédrica (virión) que contiene una molécula circular de ADN bicatenario de 8.000 pares de bases rodeada de una cápside proteínica. Tras la infección de las células epiteliales, el ADN viral se establece en todo el espesor del epitelio, 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.

Principio del procedimiento

La prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, que utiliza la tecnología HC2, es un ensayo de hibridación de ácidos nucleicos con amplificación de la señal y detección por quimioluminiscencia en microplaca. Las muestras que contienen el ADN diana se hibridan con una sonda de ARN del VPH específica. Los híbridos de ARN-ADN resultantes se capturan en la superficie del pocillo de una microplaca recubierto con anticuerpos específicos para los híbridos de ARN-ADN. A continuación, los híbridos inmovilizados reaccionan con anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina específicos para los híbridos ARN-ADN 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 divide el sustrato, se emite luz que se mide en unidades relativas de luz (RLU, *relative light units*) en un instrumento *digene* Microplate Luminometer (DML). La intensidad de la luz emitida indica la presencia o ausencia del ADN diana en la muestra.

Una medición de RLU igual o superior al valor de corte (CO, *cutoff*) del ensayo indica la presencia de secuencias de ADN del VPH de alto riesgo en la muestra. Una medición de RLU inferior al valor de corte del ensayo indica la ausencia de las secuencias de ADN de VPH de alto riesgo específicas analizadas o la presencia de niveles de ADN del VPH inferiores al límite de detección del ensayo.

Flujo de trabajo de la captura de híbridos



Preparación de las muestras en el QIAAsymphony SP

La preparación automática de muestras recogidas en PreservCyt puede realizarse en el instrumento QIAAsymphony SP con el kit QIAAsymphony DSP HPV Media o el kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA.

Preparación de las muestras con el kit QIAAsymphony DSP HPV Media

El kit QIAAsymphony DSP HPV Media proporciona extractos de muestra sobre la microplaca de hibridación que están listos para el examen automático con ayuda del sistema Rapid Capture® (RCS) con la prueba de ADN del VPH digene HC2 High-Risk HPV DNA. El instrumento QIAAsymphony SP efectúa todos los pasos del procedimiento de preparación de las muestras para un máximo de 88 muestras, en lotes de hasta 24, en una única serie analítica.

El QIAAsymphony SP procesa 88 muestras de PreservCyt en 2 horas y 15 minutos, y no se requiere la intervención del usuario una vez que el instrumento está cargado con muestras.

El QIAAsymphony SP procesa 88 muestras de SurePath en 1 hora y 45 minutos, y no se requiere la intervención del usuario una vez que el instrumento está cargado con muestras. Inmediatamente después de la preparación de las muestras con el QIAAsymphony SP, se efectúa una incubación durante 90 minutos de los extractos de muestra en la microplaca de hibridación, sobre un calentador de microplacas. Durante la incubación de los extractos de muestra, los calibradores y los controles de calidad se desnaturalizan por separado en un baño María y, a continuación, se pipetea manualmente a la primera columna de la microplaca de hibridación una vez finalizada la incubación de los extractos de muestra. La preparación de las muestras recogidas en SurePath con el instrumento QIAAsymphony SP y con el kit QIAAsymphony DSP HPV Media puede realizarse antes de iniciar el procesamiento citológico o una vez finalizado este.

Importante: Los extractos de muestra producidos a consecuencia de la preparación de las muestras de PreservCyt y SurePath con el uso del kit QIAAsymphony DSP HPV Media solo se pueden examinar con el uso del sistema RCS. No se ha validado el desempeño manual de la prueba con extractos de muestras.

Si va a efectuar la preparación automática de las muestras en el instrumento QIAAsymphony, consulte los manuales del usuario correspondientes del instrumento QIAAsymphony y el Manual de uso del kit QIAAsymphony DSP HPV (*QIAAsymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)*), además de estas instrucciones de uso, para obtener información necesaria descriptiva y relacionada con los procedimientos.

Preparación de las muestras con el kit QIASymphony DSP AXpH DNA

El kit QIASymphony DSP AXpH DNA proporciona eluidos de ADN en la microplaca de hibridación listos para el análisis manual o para el análisis automatizado con el sistema RCS con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. El instrumento QIASymphony SP efectúa todos los pasos del procedimiento de preparación de las muestras para un máximo de 88 muestras, en lotes de hasta 24, en una única serie analítica. El QIASymphony SP procesa 88 muestras en 4 horas y 30 minutos, y no se requiere la intervención del usuario una vez que el instrumento está cargado con muestras.

Si va a realizar la preparación automática de las muestras en el instrumento QIASymphony, consulte los manuales del usuario correspondientes del instrumento QIASymphony y el Manual de uso del kit QIASymphony DSP AXpH DNA (*QIASymphony DSP AXpH DNA Kit Handbook*), además de estas instrucciones de uso, para obtener información necesaria descriptiva y relacionada con los procedimientos.

Análisis con el sistema Rapid Capture System (RCS)

Puede realizarse un análisis de un volumen alto de muestras con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA utilizando el sistema RCS. El kit de 4 placas (n.º de cat. 618111) solo se puede usar con el RCS y no se puede usar para análisis manuales.

El RCS es un sistema de dilución y pipeteado automático de uso general que puede usarse con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA para el análisis de volúmenes altos de muestras. Este sistema procesa hasta 352 muestras en un período de 8 horas, incluido un período de 3,5 horas durante el cual no se requiere la intervención del usuario, y se pueden generar hasta 704 resultados de muestras en un período de 13 horas.

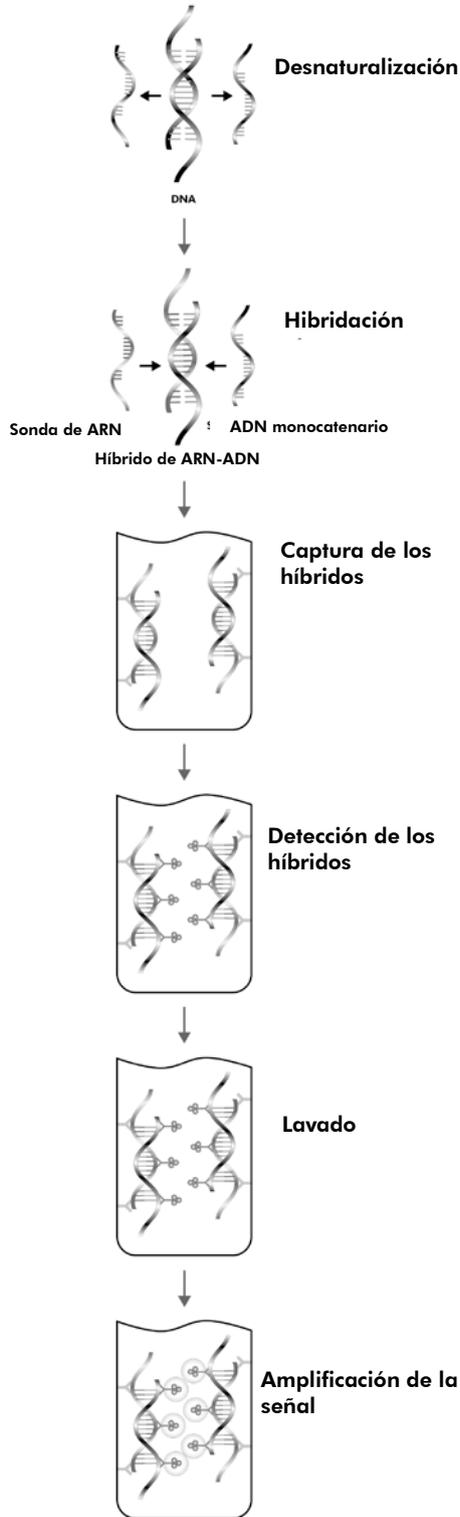
La preparación de las muestras se realiza de manera independiente del sistema RCS antes de la colocación en la plataforma del RCS. Además, la detección de la señal quimioluminiscente y la notificación de resultados se realizan con un instrumento DML sin conexión común para el análisis manual y para el análisis automatizado con el sistema RCS.

Todos los pasos de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA se realizan en la secuencia exacta del análisis manual. El sistema RCS permite el procesamiento escalonado de hasta 4 microplacas; cada microplaca contiene muestras, y los controles de calidad y los calibradores necesarios para el ensayo.

Si va a realizar el análisis automatizado con el sistema RCS, consulte el manual del usuario del Rapid Capture System (*Rapid Capture System User Manual*) y el Manual del usuario de Rapid

Capture System — Realización de pruebas *digene* HC2 DNA con eluidos de ADN (*Rapid Capture System User Manual — Performing digene HC2 DNA Tests Using QIAasymphony SP Processed Samples*), además de estas instrucciones de uso, para obtener información necesaria relacionada con los procedimientos y descriptiva.

Flujo de trabajo de la captura de híbridos



Preparación manual de las pruebas

Proceso automatizado en el Rapid Capture System

Materiales suministrados

Kit de 1 placa

Hay 96 pruebas en la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA de 1 placa (n.º cat. 5197-1330).

Si se realiza el análisis manual con el kit de una placa, el número mínimo de pruebas recomendado para cada uso es 24. Si se desea realizar menos de 24 pruebas por uso, se puede reducir el número total de pruebas por kit debido al volumen limitado de los reactivos. El número de resultados de pacientes variará según el número de usos por kit, tal como se indica a continuación:

| Número de usos | Número de resultados de pacientes |
|----------------|-----------------------------------|
| 1 | 88 |
| 2 | 80 |
| 3 | 72 |
| 4 | 64 |

Si se efectuar el análisis automatizado con el kit de una placa, el uso del kit completo requiere el análisis de una microplaca completa (88 muestras) por serie analítica del RCS. Se permite el análisis de microplacas parciales; no obstante, se utiliza todo el kit debido al volumen de vacío necesario para el funcionamiento del instrumento.

Kit de 4 placas

Hay 384 pruebas en la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA de 4 placas (n.º cat. 618111).

El kit de 4 placas solo puede utilizarse para el análisis automatizado con el sistema RCS. Para conseguir 384 pruebas, el kit de 4 placas debe utilizarse en 1 o 2 series analíticas del sistema RCS. Si se desea realizar más de 2 series analíticas, se puede reducir el número total de pruebas por kit debido al volumen limitado de los reactivos

Contenido del kit

| digene HC2 High-Risk HPV DNA Test | | |
|--|------------------|---------------|
| N.º de catálogo | 5197-1330 | 618111 |
| Número de pruebas | 96 | 384 |
| Indicator Dye (colorante indicador) Contiene azida sódica al 0,05% (p/v) | 0.35 ml | 2.0 ml |
| Denaturation Reagent* (Reactivo de desnaturalización) Solución diluida de hidróxido de sodio (NaOH) | 50 ml | 2 x 100 ml |
| Probe Diluent* (Diluyente de sonda) Solución tamponada con azida sódica al 0,05% (p/v) | 5 ml | 20 ml |
| High-Risk HPV Probe (Sonda de VPH de alto riesgo) Sonda de ARN de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 en solución tamponada (tapa roja) | 200 µl | 3 x 200 µl |
| Low-Risk HPV Quality Control (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 STM con azida sódica al 0,05% (p/v) | 1 ml | 1 ml |
| High-Risk HPV Quality Control (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 STM con azida sódica al 0,05% (p/v) | 1 ml | 1 ml |
| Negative Calibrator (Calibrador negativo) ADN transportador en STM con azida sódica al 0,05% (p/v) | 2 ml | 2 ml |
| High-Risk HPV Calibrator (Calibrador de VPH de alto riesgo) 1 pg/ml de ADN del VPH 16 clonado y ADN transportador en STM con 0,05% (p/v) de azida sódica | 1 ml | 2 ml |
| Capture Microplate (Microplaca de captura) Recubierta con anticuerpos policlonales de cabra anti-híbridos de ARN-ADN | 1 | 4 |
| Detection Reagent 1 (Reactivo de detección 1) Anticuerpos anti-híbridos de ARN-ADN conjugados con fosfatasa alcalina en solución tamponada con azida sódica al 0,05% (p/v) | 12 ml | 40 ml |

| digene HC2 High-Risk HPV DNA Test | | |
|---|------------------|---------------|
| N.º de catálogo | 5197-1330 | 618111 |
| Número de pruebas | 96 | 384 |
| Detection Reagent 2 (Reactivo de detección 2) CDP-Star® con Emerald II (sustrato quimioluminiscente) | 12 ml | 40 ml |
| Wash Buffer Concentrate* (Tampón de lavado concentrado) Contiene azida sódica al 1,5% (p/v) | 100 ml | 2 x 100 ml |

* Consulte el apartado "Advertencias y precauciones", en la página 23, si desea obtener información sobre la salud y la seguridad.

Materiales necesarios pero no suministrados

Importante: Asegúrese de que los instrumentos utilizados en este procedimiento hayan sido verificados y calibrados siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Equipo y materiales para diagnóstico *in vitro*

QIAGEN únicamente pone a su disposición equipos y materiales validados con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

- *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 (optional)*
- Gradilla de conversión y tapa (opcional)*
- Gradilla de muestras y tapa *digene* (opcional)*
- Pipeta EXPAND-4 y soporte (opcional)†
- Dispensador de láminas selladoras de tubos y dispositivo de corte (opcional, se utiliza con el MST Vortexer 2)
- Sistema de captura rápida (necesario para el uso con el kit de 4 placas, opcional para el kit de 1 placa)
- Aparato de lavado
- Microplacas de hibridación
- Tapas para microplacas
- Tiras de pocillos para microplacas del RCS*

* Necesario para realizar el análisis automatizado con el sistema RCS.

† Elemento personalizado que se utiliza para la transferencia de muestras recogidas en STM a la microplaca de hibridación. Pueden utilizarse otras pipetas multicanal expansibles personalizadas siempre que pueda conseguirse una separación de las puntas de 3,2 cm en expansión.

- Recipientes de reactivos del RCS*
- Tapas para recipientes de reactivos del RCS*
- Puntas desechables del RCS*
- Tapas de ajuste superior del RCS*
- Tampón N2†
- Tampón D2†
- Bandeja lavadora Blue TCS‡
- Puntas de pipeta extralargas
- Tubos de recogida de muestras
- Gradilla para tubos de recogida de muestras
- Tapas roscadas para tubos de recogida de muestras
- Depósitos desechables para reactivos
- Lámina selladora de tubos DuraSeal™
- Microtubos de hibridación§
- Gradilla para microtubos§
- Selladores de placas§

Equipo y materiales de uso general en el laboratorio

- Baño María a 65 ± 2 °C de tamaño suficiente para contener una gradilla de muestras (21 cm de ancho x 32 cm de profundidad x 18 cm de alto)
- Microcentrifugadora
- Agitador vorticial con accesorio cóncavo
- Pipeta monocal; ajustes variables para volúmenes de 20 a 200 µl y de 200 a 1.000 µl
- Pipeta repetidora de desplazamiento positivo, como la pipeta Eppendorf® Repeater®
- Pipeta de 8 canales; ajustes variables para volúmenes de 25 a 200 µl
- Reloj temporizador
- Solución de hipoclorito sódico al 0,5% v/v
- Parafilm® o equivalente
- Puntas de pipeta desechables resistentes a aerosoles para pipeta monocal (volúmenes de 20 a 200 µl y de 200 a 1.000 µl)

* Necesario para realizar el análisis automatizado con el sistema RCS.

† Requerido para efectuar análisis con muestras procesadas con ayuda del kit QIASymphony DSP AXpH DNA.

‡ Necesaria para efectuar análisis automático en el RCS con muestras preparadas con ayuda del kit QIASymphony DSP HPV.

§ Necesarios para efectuar hibridación con microtubos y baño maría.

-
- Puntas desechables para pipeta repetidora de desplazamiento positivo (12,5, 5, 2,5 y 1,25 ml)
 - Puntas desechables para pipeta de 8 canales (de 25 a 200 μ l)
 - Toallitas Kimtowels® u hojas de papel absorbente de poca pelusa equivalentes
 - Funda desechable para la mesa de trabajo
 - Guantes desechables, no empolvados
 - Tubos de polipropileno de 5 ml y/o 15 ml con tapa a presión y fondo redondeado
 - Gradilla para tubos de 10 ml o 15 ml
 - Tubos cónicos de polipropileno de 50 ml

Equipo y materiales adicionales para la preparación de muestras recogidas en PreservCyt

 Para la preparación automática de muestras con el kit QIAasymphony DSP HPV Media, consulte el manual del kit QIAasymphony DSP HPV Media (*QIAasymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)*).

 Para la preparación automática de muestras con el kit QIAasymphony DSP AXpH DNA, consulte el manual del kit QIAasymphony DSP AXpH DNA Kit (*QIAasymphony DSP AXpH DNA Kit Handbook*).

 Consulte las instrucciones de uso del kit *digene* HC2 Sample Conversion para obtener información sobre la preparación manual de muestras.

Equipo y materiales adicionales para la preparación de muestras recogidas en SurePath

 Para la preparación automática de muestras con el kit QIAasymphony DSP HPV Media, consulte el manual del kit QIAasymphony DSP HPV Media (*QIAasymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)*).

La preparación manual de muestras con el SurePath requiere el siguiente equipo y materiales adicionales:

- Centrifugadora de rotor basculante que pueda alcanzar $800 \pm 15 \times g$ y alojar tubos cónicos de polipropileno de 15 ml para centrifugadora
- Tubos *digene* HC2 Sample Conversion* o tubos de polipropileno VWR® o Corning® de 15 ml

Importante: Los tubos *digene* HC2 Sample Conversion distribuidos por QIAGEN deben utilizarse con el MST Vortexer 2 o con el sistema RCS.

- Pipetas de transferencia de punta convencional de 7 ml o equivalentes
- *digene* Specimen Transport Medium

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Lea atentamente todas las instrucciones antes de utilizar la prueba.

Advertencias

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Si desea obtener más información, consulte las fichas de datos de seguridad (SDS) correspondientes. Dichas fichas están disponibles online en un formato PDF cómodo y compacto en www.qiagen.com/safety, donde podrá encontrar, ver e imprimir la ficha de datos de seguridad de cada kit de QIAGEN y de cada componente del kit.

Muestras

PRECAUCIÓN



Riesgo de agentes infecciosos

Las muestras pueden contener agentes infecciosos y deben manipularse consecuentemente. Considere todas las muestras como 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:

- No pipetee con la boca.
- No fume, coma ni beba en áreas en las que se manipulen reactivos o muestras.
- Use guantes desechables sin talco al manipular reactivos o muestras. Lávese bien las manos después de realizar la prueba.
- Limpie y desinfecte todos los derramamientos de muestras con un desinfectante tuberculicida, como el hipoclorito sódico al 0,5% v/v, u otro desinfectante adecuado (32, 33).

- Descontamine y deseche todas las muestras, todos los reactivos y todos los demás materiales potencialmente contaminados conforme a la normativa nacional y local.

Tras la desnaturalización y la incubación, las muestras dejan de considerarse infecciosas (34); no obstante, el personal del laboratorio deberá seguir cumpliendo las precauciones nacionales y locales.

Azida sódica

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 desagües antiguos en los que se sospeche la acumulación de azida, la U.S. Occupational Safety and Health Administration (Administración para la salud y la seguridad profesional de Estados Unidos) recomienda lo siguiente:

1. Drene el líquido del colector utilizando un tubo de goma o de plástico.
2. Llene con una solución de hidróxido de sodio al 10% v/v.
3. Deje reposar durante 16 horas.
4. Vierta abundante agua.

Tampón N2

PRECAUCIÓN



Riesgo de compuestos de alta reactividad

No añada lejía ni soluciones ácidas directamente a soluciones o residuos que contengan tampón N2.

El tampón N2 contiene clorhidrato de guanidina, que puede formar compuestos altamente reactivos en combinación con lejía.

Si se derrama algún líquido que contenga estas soluciones tampón, límpielo con agua y un detergente de laboratorio adecuado. Si el líquido derramado contiene agentes potencialmente infecciosos, limpie primero la zona afectada con agua y detergente de laboratorio y, a continuación, con hipoclorito de sodio al 1% (v/v).

Análisis automatizado con el sistema RCS

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

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 High-Risk HPV DNA Test:

Tampón de lavado concentrado



Contiene azida sódica. ¡Advertencia! Nocivo por ingestión. Nocivo para los organismos acuáticos con efectos a largo plazo. Evítese su liberación al medio ambiente. Elimínense el contenido y su recipiente en un punto de eliminación de residuos autorizado

Denaturation Reagent (reactivo de desnaturalización)



Contiene: sodium hydroxide. Peligro! Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. Puede ser corrosivo para los metales. Eliminar el contenido/ el recipiente en una planta de eliminación de residuos aprobada. EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitarse inmediatamente las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua o ducharse. Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACION TOXICOLOGICA o a un médico. Guardar bajo llave. Llevar guantes/ prendas/ gafas/ máscara de protección.

Probe Diluent (diluyente de sonda)



Contiene: acetic acid; Polyacrylic acid. Peligro! Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. Eliminar el contenido/ el recipiente en una planta de eliminación de residuos aprobada. EN CASO DE CONTACTO CON

LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitarse inmediatamente las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua o ducharse. Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACION TOXICOLOGICA o a un médico. Guardar bajo llave. Llevar guantes/ prendas/ gafas/ máscara de protección.

High-Risk HPV Calibrator (calibrador para VPH de alto riesgo)

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

High-Risk HPV Quality Control (control de calidad para VPH de alto riesgo)

¡Atención! Provoca una leve irritación cutánea. En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.

Low-Risk HPV Quality Control (control de calidad para VPH de bajo riesgo)

¡Atención! Provoca una leve irritación cutánea. En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.

Negative Calibrator (calibrador negativo)

¡Atención! Provoca una leve irritación cutánea. En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.

Precauciones

El usuario debe seguir siempre las siguientes precauciones al realizar la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA:

- No use los reactivos después de la fecha de caducidad indicada junto al símbolo  en la etiqueta de la caja externa o después de la fecha de caducidad de los reactivos preparados.
- Si se realiza la prueba fuera de los plazos de tiempo y de los intervalos de temperatura indicados, pueden obtenerse resultados no válidos. Las pruebas no realizadas dentro de los plazos de tiempo y de los intervalos de temperatura establecidos no son válidas y deben repetirse.
- Deben seguirse meticulosamente el procedimiento, la calibración del ensayo, el control de calidad y la interpretación de los resultados de las muestras de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA para obtener resultados fiables.
- Es importante pipetear el volumen exacto de reactivos indicado y mezclar bien después de cada adición de reactivo. De lo contrario, los resultados de la prueba podrían ser erróneos. La comprobación de que tienen lugar los cambios de color señalados confirmará que se han cumplido estas condiciones.
- Con la excepción del tampón de lavado concentrado, los componentes del kit se han probado como una unidad. No intercambie componentes de otras fuentes o de lotes diferentes. No obstante, es aceptable combinar componentes de kits del mismo número de lote para disponer de los volúmenes de reactivos necesarios para procesar varias microplacas en una única serie analítica del RCS.
- 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 no empolvados al realizar todos los pasos de la prueba.
- Asegúrese de evitar la contaminación de la microplaca de captura y del reactivo de detección 2 (DR2) con fosfatasa alcalina exógena durante la realización de la prueba. Las sustancias que pueden contener fosfatasa alcalina son, entre otras, el reactivo de detección 1 (DR1), 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 DR2, debido a que la fosfatasa alcalina exógena puede reaccionar con el DR2 y producir resultados positivos falsos.
- Proteja el DR2 de una exposición prolongada a la luz directa. Use el DR2 justo después de dispensarlo y evite su exposición a la luz directa del sol.
- Ceebe la pipeta repetidora antes de la dispensación del reactivo y compruebe periódicamente si hay burbujas grandes de aire. 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 el manual del usuario de la pipeta si desea obtener instrucciones de uso específicas.

- Dispense con la pipeta multicanal utilizando la técnica de pipeteado inverso (para la dispensación de DR1 y DR2, consulte «Detección de los híbridos» en la página 58). Compruebe que el ajuste y el llenado de todas las puntas de pipeta de la pipeta multicanal son correctos.
- Asegúrese de lavar minuciosamente cada pocillo de la microplaca de captura (consulte «Lavado» en la página 60). Un lavado insuficiente causará un aumento del fondo y podría provocar resultados positivos falsos. La presencia de tampón de lavado residual en los pocillos de la microplaca de captura puede causar una disminución de la señal o una reproducibilidad deficiente.

Conservación y manipulación de los reactivos

Componentes del kit

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. Todos los reactivos se suministran listos para usar, excepto el reactivo de desnaturalización (DNR, *denaturation reagent*), la mezcla de la sonda y el tampón de lavado.

Reactivos preparados

Una vez preparado, el DNR es estable durante 3 meses a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C.

Una vez preparado, el tampón de lavado permanece estable durante 3 meses, a una temperatura de 2 °C a 30 °C.

Si se analizan muestras con el PreservCyt procesadas con el kit QIAasymphony DSP HPV Media o el kit QIAasymphony DSP AXpH DNA, los calibradores y controles de calidad abiertos y no desnaturalizados permanecen estables durante 3 meses, a una temperatura entre 2 °C y 8 °C.

Si se analizan muestras procesadas con el kit QIAasymphony DSP AXpH DNA, el reactivo de desnaturalización 2 (DNR2) preparado permanece estable durante 8 horas, a una temperatura entre 15 °C y 30 °C.

Recogida y preparación de las muestras

Recoja y transporte las muestras del cuello uterino y vaginales para analizarlas con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA utilizando uno de los siguientes dispositivos de recogida de muestras:

- *digene* HC2 DNA Collection Device (formado por un escobillón cervical y STM).
- Biopsias recogidas en *digene* STM.
- Dispositivo de recogida de tipo cepillo o dispositivo de recogida combinado de escobillón/espátula colocado en solución PreservCyt o en solución conservante SurePath.

No se han validado para el uso con esta prueba las muestras obtenidas utilizando otros dispositivos de recogida de muestras ni las transportadas en otros medios de transporte. Las características de rendimiento de esta prueba se establecieron únicamente con los kits de recogida indicados.

El *digene* HC2 DNA Collection Device no debe usarse en mujeres embarazadas. Las muestras cervicales deben recogerse antes de la aplicación de ácido acético o yodo si se realiza una exploración colposcópica. Consulte las instrucciones de uso del *digene* HC2 DNA Collection Device para obtener información adicional sobre los procedimientos para la recogida y la manipulación de las muestras.

Las muestras cervicales y vaginales recogidas en STM no requieren conversión antes de su análisis con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Las muestras recogidas en PreservCyt y en SurePath requieren conversión antes de su análisis con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Muestras cervicales y vaginales en STM

Importante: No obtenga una muestra cervical o vaginal recogida en STM si hay concentraciones altas de crema antifúngica, gel anticonceptivo o productos para ducha vaginal.

Las muestras recogidas en STM pueden conservarse durante un máximo de 2 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 entre 2 °C y 8 °C, si la prueba va a realizarse en el plazo de una semana. Si la prueba va a realizarse después de más de 1 semana, cubra las tapas de los tubos de muestras con Parafilm y conserve

las muestras a -20°C durante un máximo de 3 meses. Cuando extraiga las muestras del congelador para el análisis, sustituya inmediatamente las tapas por tapas roscadas para tubos de recogida de muestras.

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 microorganismos o de las células.

Biopsias cervicales

La prueba digene HC2 High-Risk HPV DNA permite analizar muestras de 2 a 5 mm de grosor recién obtenidas mediante biopsia cervical. No utilice biopsias de menos de 2 mm de grosor. Coloque inmediatamente la muestra de biopsia en 1,0 ml de STM, cubra la tapa del tubo de muestra con Parafilm para evitar que salte la tapa y conserve la muestra congelada a -20°C . Envíe las muestras de biopsia a una temperatura de 2°C a 30°C para su entrega al día siguiente al laboratorio de análisis.

En el laboratorio de análisis, conserve las muestras a -20°C , hasta su procesamiento. Cuando extraiga las muestras del congelador para su análisis, sustituya inmediatamente las tapas por tapas roscadas para tubos de recogida de muestras.

Muestras cervicales en solución PreservCyt

Importante: No recoja una muestra cervical en PreservCyt para la preparación de muestras con el kit QIASymphony DSP HPV Media si hay concentraciones altas de crema antifúngica, gel lubricante vaginal o sangre.

Importante: No obtenga una muestra cervical recogida en PreservCyt para la preparación de muestras con el kit QIASymphony DSP AXpH DNA si hay gel anticonceptivo.

Recoja las muestras de la manera habitual y prepare las extensiones para la prueba ThinPrep® Pap conforme a las instrucciones de uso facilitadas por el fabricante.

Tras su obtención, conserve las muestras recogidas en PreservCyt durante un máximo de 3 meses a una temperatura de $2-30^{\circ}\text{C}$ antes de preparar las muestras para la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Las muestras recogidas en PreservCyt no pueden congelarse.

Se dispone de los siguientes métodos para la preparación de las muestras:

- Preparación automática de las muestras con el instrumento QIASymphony SP y el kit QIASymphony DSP HPV Media.

El resultado es un extracto de muestra (que contiene partículas magnéticas, STM y DNR) que está listo para el paso de desnaturalización de la prueba.

- Preparación automática de las muestras con el instrumento QIAasymphony SP y el kit QIAasymphony DSP AXpH DNA.
- El resultado es un eluido de ADN listo para el paso de desnaturalización de la prueba.
Preparación manual de las muestras con el kit *digene* HC2 Sample Conversion. El resultado de la preparación manual de las muestras es una muestra desnaturalizada lista para el paso de hibridación de la prueba

Los requisitos de volumen de las muestras se basan en el siguiente método de preparación de las muestras:

- La preparación automática de muestras con el kit QIAasymphony DSP HPV Media requiere 3 ml de muestra.
- La preparación automática de muestras con el kit QIAasymphony DSP AXpH DNA requiere 4 ml de muestra.
- La preparación manual con el kit *digene* HC2 Sample Conversion requiere por lo menos 4 ml de muestra.

Las muestras que tienen un volumen de muestra inferior al necesario una vez realizada la preparación de la prueba de Papanicoláu no contienen suficiente material para el análisis y podrían generar un resultado negativo falso en la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Muestras cervicales en la solución conservante SurePath

Importante: No obtenga una muestra cervicouterina recogida en SurePath para la preparación de muestras con el kit QIAasymphony DSP HPV Media en caso de presencia de gel anticonceptivo, crema antifúngica o crema antiinflamatoria.

Recoja las muestras en solución conservante SurePath siguiendo las instrucciones de uso correspondientes.

La preparación de las muestras recogidas en SurePath puede realizarse antes de iniciar el procesamiento citológico o una vez finalizado este.

Si se realiza antes del procesamiento citológico, utilice una fracción de la muestra recogida en SurePath original que no se haya procesado con ningún otro método diagnóstico, incluidos los productos BD PrepMate® System y BD PrepStain® Slide Processor. En estas instrucciones de uso se

hace referencia a estas muestras como "muestras recogidas en SurePath" para evitar confusiones.

Si se realiza una vez finalizado el procesamiento citológico, utilice una fracción del sedimento celular de posgradiente restante después de haber preparado una muestra recogida en SurePath conforme a las instrucciones correspondientes para los productos BD PrepMate® System y BD PrepStain® Slide Processor. En estas instrucciones de uso se hace referencia a estas muestras como "muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath" para evitar confusiones.

Se dispone de los siguientes métodos para la preparación de las muestras:

- Preparación automática de muestras recogidas en SurePath con el instrumento QIASymphony SP y el kit QIASymphony DSP HPV Media.
El resultado es un extracto de muestra desnaturalizado (que contiene partículas magnéticas, STM y DNR) que está listo para el paso de hibridación de la prueba.
- Preparación automática de muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath con el instrumento QIASymphony SP y el kit QIASymphony DSP HPV Media.
El resultado es un extracto de muestra desnaturalizado (que contiene partículas magnéticas, STM y DNR) que está listo para el paso de hibridación de la prueba.
- Preparación manual de muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath.
El resultado de la preparación manual de las muestras es una muestra desnaturalizada lista para el paso de hibridación de la prueba.

Los requisitos de volumen de las muestras se basan en el método de preparación de las muestras según se indica a continuación:

- La preparación automática de muestras con el kit QIASymphony DSP HPV Media requiere 950 µl.
- La preparación manual de muestras requiere 2,8 ml de muestra de sedimento celular de posgradiente de muestra recogida en SurePath.

El uso de un volumen inferior al necesario podría causar un resultado negativo falso en la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Preparación automática de muestras recogidas en SurePath

Tras su obtención, conserve las muestras recogidas en SurePath durante un máximo de 4 semanas a una temperatura de 5 °C a 25 °C antes de preparar las muestras utilizando el instrumento QIASymphony SP y el kit QIASymphony DSP HPV Media. La muestra recogida en SurePath no debe haberse procesado con ningún otro método diagnóstico, incluidos los

productos BD PrepMate y BD PrepStain Slide Processor. La preparación automática de las muestras requiere 950 µl de la muestra recogida en SurePath.

Preparación automática de muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath

Importante: Justo después de la preparación de las extensiones para la prueba de Papanicoláu SurePath, pipetee 2,0 ml de solución conservante SurePath en el tubo de la centrifugadora que contiene el sedimento celular de posgradiente. De esta manera se preserva la integridad del sedimento celular de posgradiente para el rendimiento de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

El sedimento celular de posgradiente con solución conservante SurePath puede conservarse durante un máximo de 4 semanas a una temperatura de 5 °C a 25 °C antes de la preparación de la muestra para la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. La preparación automática de las muestras requiere 950 µl del sedimento celular de posgradiente con SurePath.

Preparación manual de muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath

Importante: Justo después de la preparación de las extensiones para la prueba de Papanicoláu SurePath, pipetee 2,0 ml de solución conservante SurePath en el tubo de la centrifugadora que contiene el sedimento celular residual. De esta manera se preserva la integridad del sedimento celular de posgradiente para el rendimiento de la prueba *digene* HC2 High-Risk 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 High-Risk HPV DNA.

Las muestras de sedimento celular de posgradiente recogidas en 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

Antes de comenzar

- Para el análisis manual, deje transcurrir al menos 60 minutos para que el 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 deja transcurrir el tiempo necesario para 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 más instrucciones.
- Si se utiliza un baño maría durante los pasos de desnaturalización e hibridación, asegúrese de que el baño maría se encuentre a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ y de que el nivel de agua sea suficiente para sumergir todo el volumen de la muestra del tubo.

Reagent preparation

- Extraiga del frigorífico las muestras y todos los reactivos necesarios antes de comenzar la prueba. Deje que alcancen una temperatura de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 15-30 minutos. Prepare las muestras recogidas en PreservCyt y SurePath antes de estabilizar los reactivos y las muestras previamente desnaturalizadas a temperatura ambiente.
- Si combina reactivos listos para usar para una serie analítica del sistema RCS de múltiples placas, mezcle bien los frascos individuales y, a continuación, combine el volumen adecuado del reactivo en un tubo cónico de polipropileno desechable limpio.
- Para el análisis manual, los reactivos tampón de lavado y mezcla de la sonda se preparan durante pasos específicos del análisis. Para el análisis automatizado con el sistema RCS, todos los reactivos se preparan antes de iniciar el análisis con el RCS y se colocan en la plataforma del RCS.
- Prepare los reactivos DNR y DNR2, según proceda, antes de preparar otros reactivos.
- Deseche todos los reactivos preparados (a menos que se indique lo contrario) y las porciones de reactivos al final de la prueba.
- Utilice las tablas 1-5, presentadas más adelante, para determinar el volumen necesario para cada reactivo en función del número de pruebas/microplacas y del método de análisis. Los volúmenes para el análisis automatizado con el sistema RCS incluyen el volumen de vacío del reactivo que requiere el instrumento.

Tabla 1. Volúmenes necesarios de reactivos preparados y listos para usar para el análisis manual de muestras recogidas en STM, y muestras recogidas en PreservCyt y SurePath, preparadas manualmente.

| Número de pruebas/tiras | Mezcla de la sonda | Tampón de lavado | DR1 | DR2 |
|-------------------------|--------------------|------------------|-------|-------|
| 24/3 | 1.04 ml | >1 litro | 3 ml | 3 ml |
| 48/6 | 2.08 ml | >1 litro | 5 ml | 5 ml |
| 72/9 | 3.12 ml | >1 litro | 7 ml | 7 ml |
| 96/12 | 4.16 ml | >1 litro | 12 ml | 12 ml |

Tabla 2. Volúmenes necesarios de reactivos preparados y listos para usar para el análisis automático con el RCS de muestras STM, muestras preparadas manualmente en PreservCyt y SurePath, y muestras en SurePath preparadas con el kit QIA Symphony DSP HPV Media

| Número de microplacas | Mezcla de la sonda | Tampón de lavado | DR1 | DR2 |
|-----------------------|--------------------|------------------|-------|-------|
| ≤1 | 5.20 ml | 3 litros | 10 ml | 10 ml |
| ≤1.5 | 6.24 ml | 3 litros | 14 ml | 14 ml |
| ≤2 | 8.32 ml | 3 litros | 18 ml | 18 ml |
| ≤2.5 | 9.36 ml | 6 litros | 22 ml | 22 ml |
| ≤3 | 10.40 ml | 6 litros | 26 ml | 26 ml |
| ≤3.5 | 12.48 ml | 6 litros | 30 ml | 30 ml |
| ≤4 | 13.52 ml | 6 litros | 34 ml | 34 ml |

Tabla 3. Volúmenes necesarios de reactivos preparados y listos para usar para el análisis automático con el RCS de muestras en PreservCyt, preparadas con el kit QIA Symphony DSP HPV Media

| Número de microplacas | DNR | Mezcla de la sonda | Tampón de lavado | DR1 | DR2 |
|-----------------------|--------|--------------------|------------------|-------|-------|
| ≤1 | 2.2 ml | 5.20 ml | 3 litros | 10 ml | 10 ml |
| ≤1.5 | 2.2 ml | 6.24 ml | 3 litros | 14 ml | 14 ml |
| ≤2 | 2.4 ml | 8.32 ml | 3 litros | 18 ml | 18 ml |
| ≤2.5 | 2.4 ml | 9.36 ml | 6 litros | 22 ml | 22 ml |
| ≤3 | 2.6 ml | 10.40 ml | 6 litros | 26 ml | 26 ml |
| ≤3.5 | 2.6 ml | 12.48 ml | 6 litros | 30 ml | 30 ml |
| ≤4 | 2.8 ml | 13.52 ml | 6 litros | 34 ml | 34 ml |

Tabla 4. Volúmenes necesarios de reactivos preparados y listos para usar para el análisis manual de muestras en PreservCyt, preparadas con el kit QIASymphony DSP AXpH DNA

| Número de pruebas/tiras | DNR | DNR2 | Mezcla de la sonda | Tampón de lavado | DR1 | DR2 |
|-------------------------|--------|--------|--------------------|------------------|-------|-------|
| 24/3 | 0.6 ml | 1.0 ml | 1.04 ml | >1 litro | 3 ml | 3 ml |
| 48/6 | 0.6 ml | 2.0 ml | 2.08 ml | >1 litro | 5 ml | 5 ml |
| 72/9 | 0.6 ml | 2.5 ml | 3.12 ml | >1 litro | 7 ml | 7 ml |
| 96/12 | 0.6 ml | 5.0 ml | 4.16 ml | >1 litro | 12 ml | 12 ml |

Tabla 5. Volúmenes necesarios de reactivos preparados y listos para usar para el análisis automático con el RCS, de muestras en PreservCyt, preparadas con el kit QIASymphony DSP AXpH DNA

| Número de microplacas | DNR | DNR2 | Mezcla de la sonda | Tampón de lavado | DR1 | DR2 |
|-----------------------|--------|---------|--------------------|------------------|-------|-------|
| ≤1 | 2.2 ml | 5.0 ml | 5.20 ml | 3 litros | 10 ml | 10 ml |
| ≤1.5 | 2.2 ml | 5.5 ml | 6.24 ml | 3 litros | 14 ml | 14 ml |
| ≤2 | 2.4 ml | 6.5 ml | 8.32 ml | 3 litros | 18 ml | 18 ml |
| ≤2.5 | 2.4 ml | 7.7 ml | 9.36 ml | 6 litros | 22 ml | 22 ml |
| ≤3 | 2.6 ml | 8.8 ml | 10.40 ml | 6 litros | 26 ml | 26 ml |
| ≤3.5 | 2.6 ml | 10.0 ml | 12.48 ml | 6 litros | 30 ml | 30 ml |
| ≤4 | 2.8 ml | 11.0 ml | 13.52 ml | 6 litros | 34 ml | 34 ml |

Reactivo de desnaturalización

El kit de 1 placa contiene 50 ml de reactivo de desnaturalización y el kit de 4 placas contiene 2 x 100 ml de reactivo de desnaturalización. Asegúrese de preparar el DNR según el volumen proporcionado con el kit correspondiente.

Notas:

- Una vez preparado, el DNR es estable durante 3 meses a una temperatura de 2 °C a 8 °C.
- Si el color se desvanece, añada 3 gotas adicionales de tinte indicador y mezcle bien antes de utilizarlo.

Frasco de 50 ml

1. Añada 5 gotas de tinte indicador al frasco de 50 ml de reactivo de desnaturalización.
2. Mezcle bien.

El DNR debe presentar un color morado oscuro uniforme.

3. Rotule el DNR con la nueva fecha de caducidad.

Frasco de 100 ml

1. Añada 10 gotas de tinte indicador al frasco de 100 ml de reactivo de desnaturalización.
2. Mezcle bien.

El DNR debe presentar un color morado oscuro uniforme.

3. Rotule el DNR con la nueva fecha de caducidad.

Reactivo de desnaturalización 2

Nota: El DNR2 solo se requiere para el análisis con muestras en PreservCyt procesadas con ayuda del kit QIA Symphony DSP AXpH DNA.

1. Etiquete un tubo cónico de polipropileno desechable limpio como "DNR2".
2. Añada el volumen necesario de tampón N2 (consulte la tabla 6, más adelante) al recipiente etiquetado.

Tabla 6. Preparación del DNR2.

| Volumen de DNR2 necesario | Volumen de tampón N2 | Volumen de tampón D2 | Tinte indicador |
|---------------------------|----------------------|----------------------|-----------------|
| 1.0 ml | 0.4 ml | 0.6 ml | 1-2 gotas |
| 2.0 ml | 0.8 ml | 1.2 ml | 1-2 gotas |
| 2.5 ml | 1.0 ml | 1.5 ml | 1-2 gotas |
| 5.0 ml | 2.0 ml | 3.0 ml | 1-2 gotas |
| 5.5 ml | 2.2 ml | 3.3 ml | 1-2 gotas |
| 6.5 ml | 2.6 ml | 3.9 ml | 1-2 gotas |
| 7.7 ml | 3.1 ml | 4.6 ml | 1-2 gotas |
| 8.8 ml | 3.5 ml | 5.3 ml | 1-2 gotas |
| 10.0 ml | 4.0 ml | 6.0 ml | 1-2 gotas |
| 11.0 ml | 4.4 ml | 6.6 ml | 1-2 gotas |

3. Añada el volumen necesario de tampón D2 (consulte la tabla 6 más arriba) al recipiente etiquetado.
4. Añada la cantidad necesaria de tinte indicador (consulte la tabla 6 más arriba) al recipiente etiquetado.

Nota: Utilice el tinte indicador que se suministra con el kit *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

5. Mezcle mediante agitación vorticial durante al menos 10 segundos.

Nota: Una vez preparado, el DNR2 se mantiene estable durante 8 horas, a una temperatura entre 15 °C y 30 °C

Mezcla de la sonda

- Para el análisis manual, prepare la mezcla de la sonda durante la incubación de desnaturalización de la muestra (según proceda, consulte “Desnaturalización de calibradores, controles de calidad y muestras recogidas en STM” en la página 50 o “Desnaturalización de calibradores, controles de calidad y eluidos de ADN para una prueba manual” en la página 47).
- Tenga extremo cuidado para impedir la contaminación con ARNasa. Utilice puntas de pipeta con barrera contra aerosoles para pipetear la sonda.
- El diluyente de sonda es viscoso. Asegúrese de conseguir un vórtice visible al preparar la mezcla de la sonda; un mezclado incompleto puede reducir la señal.
- Si combina varios viales de la sonda para el análisis automatizado con el sistema RCS, combine la sonda en un solo vial y mézclelo mediante pipeteado.

1. Para evitar el atrapamiento de la sonda en la tapa del vial, centrifugue brevemente cada vial de sonda para llevar el líquido al fondo del vial.
2. Golpee suavemente el vial para mezclar el contenido.
3. Determine la cantidad de mezcla de la sonda necesaria:

Recomendación: Prepare una cantidad adicional de mezcla de la sonda para tener en cuenta el volumen que puede perderse en las puntas de pipeta o en la pared del vial. Los volúmenes indicados en las tablas 1-5, más arriba, incluyen el volumen adicional recomendado.

Análisis manual: Determine los volúmenes necesarios para una dilución de 1:25 de la sonda en diluyente de sonda para preparar la mezcla de la sonda (25 µl/prueba). Los volúmenes se indican en la Tabla 1, página 35, y en la Tabla 4, página 36, según proceda.

Análisis automatizado con el sistema RCS: Utilice los volúmenes especificados en la Tabla 2, página 35, Tabla 3, página 35, o en la Tabla 5, página 36, según proceda..

4. Etiquete un recipiente desechable nuevo como “Mezcla de la sonda de VPH de alto riesgo”. Según el número de pruebas, se recomienda usar un tubo de polipropileno de fondo redondo y cierre por presión de 5 ml o de 15 ml.
5. Añada la cantidad necesaria de diluyente de sonda (consulte la tabla 7 más adelante) al tubo etiquetado.

6. Pipetee la cantidad necesaria de la sonda de VPH de alto riesgo en el diluyente de sonda (consulte la tabla 7 más adelante) colocando la punta de pipeta en contacto con la pared interna del tubo justo por encima del menisco y expulsando el contenido.

Importante: No sumerja la punta en el diluyente de sonda.

Tabla 7. Preparación de la mezcla de la sonda.

| Volumen de mezcla de la sonda necesario | Volumen de diluyente de sonda | Volumen de sonda de VPH de alto riesgo |
|---|-------------------------------|--|
| 1.04 ml | 1.0 ml | 40 µl |
| 2.08 ml | 2.0 ml | 80 µl |
| 3.12 ml | 3.0 ml | 120 µl |
| 4.16 ml | 4.0 ml | 160 µl |
| 5.20 ml | 5.0 ml | 200 µl |
| 6.24 ml | 6.0 ml | 240 µl |
| 8.32 ml | 8.0 ml | 320 µl |
| 9.36 ml | 9.0 ml | 360 µl |
| 10.40 ml | 10.0 ml | 400 µl |
| 12.48 ml | 12.0 ml | 480 µl |
| 13.52 ml | 13.0 ml | 520 µl |

7. Agite durante 5 segundos como mínimo a velocidad máxima para mezclar bien.

Debe generarse un vórtice visible.

Tampón de lavado

- Para el análisis manual, prepare el tampón de lavado durante el paso de captura de los híbridos (consulte "Captura de los híbridos" en la página 56).
- Para minimizar la exposición, añada agua al tampón de lavado concentrado al prepararlo.
- Para el método de lavado manual de la microplaca, prepare 3 litros de tampón de lavado en el aparato de lavado.

Recomendación: Cada 3 meses, limpie el aparato de lavado y los tubos con una solución de hipoclorito sódico al 0,5%, y enjuáguelos bien con agua destilada o desionizada, para evitar una posible contaminación por la fosfatasa alcalina presente en bacterias y mohos.

- Para el Automated Plate Washer, prepare el tampón de lavado y consérvelo en un recipiente tapado, o prepare un litro y colóquelo en el depósito de lavado del Automated Plate Washer.
- Para el análisis automatizado con el sistema RCS, prepare la cantidad indicada (según proceda, consulte la Tabla 2, página 35, Tabla 3, página 35, o Tabla 5, página 36) en el frasco de lavado de RCS.

1. Mezcle bien el tampón de lavado concentrado y añada el volumen necesario de tampón de lavado concentrado (consulte la tabla 8 más adelante) al recipiente especificado.
2. Añada el volumen necesario de agua desionizada o destilada (consulte la tabla 8 más adelante) al recipiente especificado.

Tabla 8. Preparación del tampón de lavado.

| Volumen de tampón de lavado necesario | Cantidad de tampón de lavado concentrado | Volumen de agua destilada o desionizada |
|---------------------------------------|--|---|
| 1 liter | 33.3 ml | 966.7 ml |
| 2 liters | 66.6 ml | 1933.4 ml |
| 3 liters | 100.0 ml | 2900.0 ml |
| 6 liters | 200.0 ml | 5800.0 ml |

3. Coloque una hoja limpia de papel absorbente de poca pelusa sobre las aberturas del recipiente y mezcle bien.
4. Cierre herméticamente el recipiente para evitar la contaminación o la evaporación, o colóquelo en el instrumento correspondiente, según proceda.
5. Rotule el tampón de lavado con la nueva fecha de caducidad.

Nota: Una vez preparado, el tampón de lavado permanece estable durante 3 meses, a una temperatura de 2 °C a 30 °C.

Creación del diseño de placa

1. Cree un diseño de placa por medio del software de análisis de ensayos *digene* con los protocolos de ensayo *digene* para el VPH.

Consulte el manual del software correspondiente si desea obtener instrucciones acerca de cómo crear un diseño de placa con las posiciones apropiadas para los calibradores, los controles de calidad y las muestras.

Notas:

- Los calibradores, los controles de calidad y las muestras se procesan en una configuración de columnas de 8 pocillos.
- Analice los calibradores y los controles de calidad en las siguientes posiciones de la microplaca (consulte la Figura 1, página 41):
 - Duplicados del calibrador negativo (NC) en los pocillos A1, B1 y C1 de la microplaca.
 - Duplicados del calibrador para VPH de alto riesgo (HRC) en los pocillos D1, E1 y F1 de la microplaca.

- Control de calidad para VPH de bajo riesgo (QC1-LR) en el pocillo G1 de la microplaca.
- Control de calidad para VPH de alto riesgo (QC2-HR) en el pocillo H1 de la microplaca.

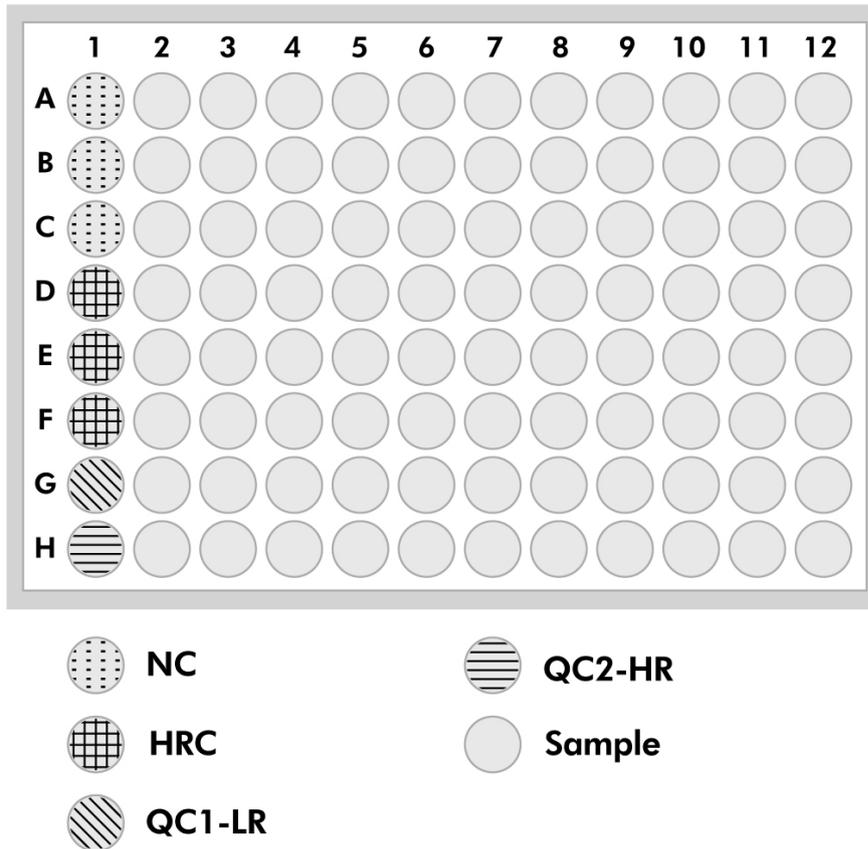


Figura 1. Posición de los calibradores, los controles de calidad y las muestras en la microplaca

Importante: Si realiza el análisis automatizado con el sistema RCS, utilice protocolos de ensayo específicos del RCS para crear el diseño de placa y generar resultados. Los parámetros definidos de los protocolos de ensayo específicos del RCS son diferentes de los parámetros para los protocolos de ensayo de análisis manual (consulte "Cálculo del valor de corte" en la página 67).

2. Coloque los calibradores, los controles de calidad y las muestras que se van a analizar en una gradilla para tubos de recogida de muestras o gradilla de muestras en el orden en el que se analizarán.

Importante: Si realiza el análisis automatizado con el sistema RCS, es fundamental que el diseño de placa coincida con las muestras correctas analizadas para evitar la notificación de resultados inexactos de las muestras. Para cada gradilla de muestras y tapa usadas, confirme que los números de serie coinciden y, cuando proceda, etiquete cada gradilla de muestras y

tapa según el orden en el que se analizarán en el RCS. Utilice un rotulador que no se borre y una etiqueta que no se desprenda en el baño María a 65 °C

Preparación de las muestras

Las muestras recogidas en PreservCyt y en SurePath requieren preparación antes de su análisis con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Según el tipo de preparación de las muestras realizada, las muestras preparadas estarán listas para diferentes pasos de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Los métodos disponibles de preparación de las muestras son los siguientes:

- Preparación automática de las muestras en PreservCyt con el kit QIASymphony DSP HPV Media.
- Preparación automática de muestras recogidas en SurePath y de muestras de sedimento celular de posgradiente con el kit QIASymphony DSP HPV Media
- Preparación automática de las muestras en PreservCyt con el kit QIASymphony DSP AXpH DNA.
- Preparación manual de muestras recogidas en PreservCyt.
- Preparación manual de muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath

Preparación de las muestras en PreservCyt con el kit QIASymphony DSP HPV Media.

 Para la preparación automática de muestras en PreservCyt con el kit QIASymphony DSP HPV Media, consulte el manual del kit QIASymphony DSP HPV Media (*QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)*).

Importante: Los extractos de muestra producidos a consecuencia de la preparación de las muestras en PreservCyt con el uso del kit QIASymphony DSP HPV Media solo se pueden examinar con el uso del sistema RCS. No se ha validado el desempeño manual de la prueba con extractos de muestras.

El resultado de la preparación de muestras en PreservCyt con el kit QIASymphony DSP HPV Media es la obtención de extractos de muestras en una microplaca de hibridación con la primera columna vacía. Los extractos de muestra contienen partículas magnéticas, STM y DNR, y están listos para el análisis automático con el sistema RCS, en el paso de desnaturalización. Los calibradores, controles de calidad y extractos de muestra se desnaturalizan al mismo tiempo en la microplaca de hibridación durante el análisis automático en el sistema RCS (véase “Desnaturalización e hibridación de muestras preparadas con QIASymphony SP”, página 47).

 Cuando efectúe el análisis automatizado con el sistema RCS de eluidos de ADN, consulte el Manual del usuario de Rapid Capture System — Realización de pruebas *digene* HC2 DNA con eluidos de ADN (*Rapid Capture System User Manual — Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*) para obtener instrucciones para finalizar el análisis.

Preparación de muestras recogidas en SurePath y de muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath con el kit QIASymphony DSP HPV Media

 Consulte el manual de instrucciones de uso del kit QIASymphony DSP HPV Media (*QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use [Handbook]*) si desea obtener instrucciones acerca de cómo preparar muestras recogidas en SurePath y muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath con el kit QIASymphony DSP HPV Media.

Importante: Los extractos de muestra producidos a consecuencia de la preparación de las muestras en SurePath con el uso del kit QIASymphony DSP HPV Media solo se pueden examinar con el uso del sistema RCS. No se ha validado el desempeño manual de la prueba con extractos de muestras.

El resultado de la preparación de muestras a partir de muestras recogidas en SurePath y de muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath con el kit QIASymphony DSP HPV Media son calibradores, controles de calidad y extractos de muestras en una microplaca de hibridación listos para el análisis automatizado con el RCS en el paso de hibridación del análisis.

 Cuando efectúe el análisis automatizado con el sistema RCS de pruebas preparadas con el QIASymphony SP; consulte el Manual del usuario de Rapid Capture System — Realización de pruebas *digene* HC2 DNA con muestras procesadas en QIASymphony SP (*Rapid Capture System User Manual — Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*) para obtener instrucciones para finalizar el análisis.

Preparación de las muestras en PreservCyt con el kit QIASymphony DSP AXpH DNA

 Consulte el Manual del kit QIASymphony DSP AXpH DNA (*QIASymphony DSP AXpH DNA Kit Handbook*) si desea obtener instrucciones para la preparación de muestras recogidas en PreservCyt.

El resultado de la preparación de muestras en PreservCyt con el kit QIASymphony DSP AXpH DNA es la obtención de eluidos de ADN en una microplaca de hibridación con la primera columna vacía. Los eluidos de ADN están listos para el paso de desnaturalización de la prueba.

Desnaturalice los calibradores, los controles de calidad y los eluidos de ADN al mismo tiempo en la microplaca de hibridación (consulte “Desnaturalización e hibridación de muestras preparadas con QIASymphony SP” en la página 47).

Preparación manual de muestras recogidas en PreservCyt

 Consulte las instrucciones de uso del kit *digene* HC2 Sample Conversion para obtener información sobre la preparación manual de muestras recogidas en PreservCyt.

La preparación manual de muestras recogidas en PreservCyt con el uso del kit *digene* HC2 Sample Conversion da lugar a muestras listas para el paso de hibridación de la prueba. Prepare los calibradores y los controles de calidad por separado (consulte “Desnaturalización de calibradores, controles de calidad y muestras recogidas en STM” en la página 50).

Preparación manual de muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath

La preparación manual de muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath da lugar a muestras listas para el paso de hibridación de la prueba. Prepare los calibradores y los controles de calidad por separado ((consulte “Desnaturalización de calibradores, controles de calidad y muestras recogidas en STM” en la página 50).

Importante: Si el sedimento celular de posgradiente de la muestra recogida en SurePath parece contener menos de 1 ml, el sedimento celular de posgradiente no es adecuado para el análisis con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, ya que no se ha añadido la solución conservante SurePath después de la citología.

1. Estabilice los sedimentos celulares de posgradiente con SurePath a temperatura ambiente y confirme que el volumen de líquido observado es de aproximadamente 2,8 ml.
2. Centrifugue los sedimentos celulares de posgradiente con SurePath en un rotor basculante a $800 \pm 15 \times g$ durante 10 ± 1 minutos.
3. Extraiga los tubos de la centrifugadora.
4. Justo después de la centrifugación, decante con cuidado el sobrenadante y seque suavemente cada tubo unas 3 veces con toallitas Kimtowels u hojas de papel absorbente de poca pelusa equivalentes para eliminar el exceso de líquido. Observe el sedimento de cada tubo.

Importante: No permita que los sedimentos celulares se deslicen hacia abajo por el tubo durante el secado.

5. Coloque los tubos en la gradilla.

6. Añada 200 µl de STM a cada sedimento, utilizando una pipeta monocal o repetidora.
7. 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 5-30 segundos más o hasta que el sedimento flote suelto del fondo del tubo y parezca disolverse.

Nota: Los tubos pueden mezclarse sin tapar.
8. Pipetee 100 µl de DNR en cada muestra recogida en SurePath utilizando una pipeta monocal o repetidora.

Importante: Asegúrese de no tocar la pared del tubo, ya que de lo contrario podría producirse una contaminación cruzada de las muestras.
9. Mezcle bien cada tubo de forma individual mediante agitación vorticial a alta velocidad durante 5 segundos.

Nota: Los tubos pueden mezclarse sin tapar.
10. Etiquete tubos *digene* HC2 Sample Conversion o tubos cónicos de 15 ml con los correspondientes identificador y tipo de la muestra (por ejemplo, «SP» para una muestra recogida en SurePath) y coloque los tubos en una gradilla para tubos.

Nota: Para el análisis automatizado con el sistema RCS deben utilizarse tubos *digene* HC2 Sample Conversion.
11. Transfiera todo el volumen al tubo cónico correspondiente, de 15 ml, utilizando una pipeta de transferencia de punta convencional de 7 ml, desechable, o equivalente.
12. Tape los tubos cónicos y colóquelos en una gradilla para tubos.
13. Incube los tubos en un baño María a 65 ± 2 °C durante 90 ± 5 minutos.

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

Si el análisis va a completarse el mismo día, desnaturalice los calibradores y los controles de calidad (consulte “Desnaturalización de calibradores, controles de calidad y muestras recogidas en STM” en la página 50).
14. Extraiga la gradilla para tubos del baño María tras la incubación.

Si utiliza una gradilla de muestras, no deje que se enfríe antes de quitar la tapa de la gradilla. De inmediato, realice el análisis o quite la tapa de la gradilla y la lámina selladora de tubos DuraSeal.

Nota: Si la gradilla de muestras se enfría, los tubos podrían adherirse a la tapa de la gradilla y derramarse.

- Analizadas inmediatamente (continúe en “Hibridación de muestras recogidas en STM preparadas y de muestras de sedimento celular de posgradiente con PreservCyt y SurePath preparadas manualmente” en la página 53).
- Conservadas (consulte el apartado “Punto de detención opcional de muestras recogidas en STM preparadas y de muestras de sedimento celular de posgradiente con PreservCyt y SurePath preparadas manualmente
- “ en la página 52).

Desnaturalización e hibridación de muestras preparadas con QIASymphony SP

El resultado de la preparación de muestras en el QIASymphony SP es una microplaca de hibridación que contiene, al menos, las muestras preparadas.

Si se han preparado muestras recogidas en PreservCyt con ayuda del QIASymphony SP, la primera columna de la microplaca de hibridación está vacía. El contenido de la microplaca está listo para el paso de desnaturalización de la prueba. Los calibradores y los controles de calidad se añaden a la microplaca de hibridación manualmente o durante la prueba automatizada con el sistema RCS, y luego, se efectúa el paso de desnaturalización.

Si las muestras recogidas en SurePath o las muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath se han preparado con el QIASymphony SP, la placa contiene las muestras preparadas con los calibradores y controles de calidad desnaturalizados pipeteados en la primera columna de la microplaca de hibridación. El contenido de la microplaca está listo para la prueba automatizada con el sistema RCS en el paso de desnaturalización de la prueba.

Importante: Los extractos de muestra producidos a consecuencia de la preparación de las muestras con el kit QIASymphony DSP HPV Media solamente se pueden analizar con el sistema RCS. No se ha validado el rendimiento manual de la prueba con extractos de muestras.

 Cuando efectúe el análisis automatizado con el sistema RCS de pruebas preparadas con el QIASymphony SP, consulte el Manual del usuario de Rapid Capture System — Realización de pruebas *digene* HC2 DNA con muestras procesadas en QIASymphony SP (*Rapid Capture System User Manual — Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*) para obtener instrucciones para finalizar el análisis.

Desnaturalización de calibradores, controles de calidad y eluidos de ADN para una prueba manual

- Este procedimiento es para el análisis manual de muestras recogidas en PreservCyt, procesadas con ayuda del kit QIASymphony DSP AXpH DNA. Cuando efectúe el análisis automatizado con el sistema RCS, consulte el Manual del usuario de Rapid Capture System — Realización de pruebas *digene* HC2 DNA con muestras procesadas en QIASymphony SP (*Rapid Capture System User Manual — Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*) para obtener instrucciones para finalizar el análisis.
- La desnaturalización de los calibradores y de los controles de calidad se realiza con el DNR, mientras que la desnaturalización de los eluidos de ADN se realiza con el DNR2.

1. Agite con el agitador vorticial cada calibrador y cada control de calidad durante 10 segundos, a la máxima potencia.
2. Invierta cada tubo para recuperar el material de la tapa del tubo.
3. Retire las tapas de los tubos de los calibradores y los controles de calidad y deséchelas.
4. Utilizando una pipeta monocanal, añada 50 µl del calibrador o control de calidad adecuado al fondo del pocillo vacío de la microplaca de hibridación, conforme al diseño de placa creado.

Si el calibrador y los controles de calidad se van a utilizar para análisis adicionales, tape los tubos con tapas roscadas nuevas para tubos de recogida de muestras, rotúelos con una nueva fecha de caducidad y almacénelos a una temperatura de 2 °C a 8 °C.

Nota: Una vez abiertos, los controles de calidad y los calibradores no desnaturalizados se mantienen estables durante 3 meses a una temperatura de 2 °C a 8 °C.

5. Mezcle bien mediante agitación vorticial el DNR y el DNR2 preparados y dispénelos en un depósito desechable para reactivos debidamente etiquetado.

Importante: Asegúrese de añadir el reactivo correcto a la columna correcta de la microplaca de eluidos.

6. Utilizando una pipeta de 8 canales, añada 25 µl de DNR a la primera columna de la microplaca de hibridación que contiene los calibradores y los controles de calidad.
7. Utilizando una pipeta de 8 canales, añada 25 µl de DNR2 a cada pocillo de la microplaca de hibridación que contiene un eluido de ADN.
8. Cubra la microplaca de hibridación con una tapa para microplaca y agítela durante 30 segundos en el Rotary Shaker I, configurado en 1100 ± 100 rpm.
9. Coloque la microplaca de hibridación en el Microplate Heater I estabilizado a 65 ± 2 °C, asegurándose de no producir salpicaduras. Incube la microplaca de hibridación durante 45 ± 5 minutos.

Prepare la mezcla de la sonda durante esta incubación (consulte "Mezcla de la sonda" en la página 38).

10. Extraiga la microplaca de hibridación del Microplate Heater I.

Los calibradores, los controles de calidad y los eluidos de ADN desnaturalizados pueden ser:

- Almacenados (consulte "Punto de detención opcional de los eluidos de ADN" en la página 49).
- Analizados inmediatamente (continúe en "Hibridación de los eluidos de ADN" en la página 49).

Punto de detención opcional de los eluidos de ADN

Los eluidos de ADN desnaturalizados, incluidos los calibradores y los controles de calidad, cubiertos con una tapa para microplaca pueden conservarse a una temperatura de 2 °C a 8 °C durante 2 semanas.

Hibridación de los eluidos de ADN

1. Si se ha almacenado la microplaca de hibridación que contiene los calibradores, controles de calidad y eluidos de ADN desnaturalizados, retire la tapa de la microplaca y deje que la microplaca de hibridación se establezca a una temperatura entre 20 °C y 25°C.
2. Mezcle bien mediante agitación vorticial la mezcla de la sonda y dispénsela en un depósito desechable para reactivos.
3. Pipetee con cuidado 25 µl de la mezcla de la sonda en cada pocillo de la microplaca de hibridación, utilizando una pipeta de 8 canales y puntas nuevas para cada adición de mezcla de la sonda.

Evite salpicar y tocar la pared de los pocillos de la microplaca de hibridación.

4. Cubra la microplaca de hibridación con una tapa para microplaca y agítela durante 3 ± 2 minutos en el Rotary Shaker I configurado en 1.100 ± 100 rpm.

Después de agitar, los calibradores, los controles de calidad y los eluidos de ADN deberían adquirir un color amarillo.

Las muestras que se mantengan moradas pueden no haber recibido la cantidad apropiada de mezcla de la sonda. Añada 25 µl más de mezcla de la sonda a las muestras que permanezcan moradas y agítelas de nuevo. Si una muestra permanece morada después de seguir este procedimiento, analice de nuevo la muestra.

5. Coloque la microplaca de hibridación en el Microplate Heater I estabilizado a 65 ± 2 °C, asegurándose de no producir salpicaduras. Incube la microplaca de hibridación durante 60 ± 5 minutos.
6. Prosiga en "Captura de los híbridos", en la página 56, para continuar el análisis.

Desnaturalización e hibridación de muestras recogidas en STM y de muestras de sedimento celular de posgradiente con PreservCyt y SurePath preparadas manualmente

- Si se analizan muestras de sedimento celular de posgradiente con PreservCyt y SurePath preparadas manualmente, no se requiere el paso de desnaturalización para las muestras.

- Determinadas muestras recogidas en STM pueden contener sangre u otros materiales biológicos que pueden ocultar los cambios de color cuando se añade el DNR. Es posible que las muestras que presentan un color oscuro antes de la adición del DNR no muestren los cambios de color correctos durante este paso. En estos casos, la imposibilidad de visualizar el cambio de color correcto no afectará a los resultados de la prueba. El mezclado correcto puede verificarse observando el cambio de color de los calibradores y de los controles de calidad.

Desnaturalización de calibradores, controles de calidad y muestras recogidas en STM

- No extraiga el dispositivo de recogida de muestras del tubo de muestras en ningún momento.
- Para evitar resultados positivos falsos, es fundamental que todo el material de la muestra entre en contacto con el DNR. El mezclado tras la adición del DNR es un paso crítico.
- Las muestras recogidas en STM desnaturalizadas con el método del MST Vortexer 2 deben utilizar el método "Hibridación con una microplaca y el Microplate Heater I" descrito en la página 53. El método "Hibridación con microtubos y baño María" (página 55) no se ha validado con muestras recogidas en STM desnaturalizadas con el MST Vortexer 2.

1. Quite y deseche las tapas de los tubos.

Importante: Considere potencialmente infecciosas las tapas quitadas de tubos de muestras recogidas en STM (consulte "Advertencias y precauciones" en la página 23 si desea obtener más información).

2. Pipetee el volumen indicado (consulte la tabla 9 más adelante) de DNR en los tubos utilizando una pipeta repetidora o ajustable.

Asegúrese de no tocar la pared de los tubos, ya que de lo contrario podría producirse una contaminación cruzada de las muestras.

Importante: Los kits de una y de cuatro placas tienen volúmenes distintos del calibrador High-Risk HPV. Asegúrese de añadir el volumen correcto de DNR.

Nota: El volumen de DNR añadido equivale a la mitad del volumen de líquido del tubo.

Tabla 9. Adición del DNR

| Calibrador, control de calidad o muestra recogida en STM | Volumen de DNR necesario |
|--|--------------------------|
| Calibrador negativo, 2 ml | 1000 µl |
| Calibrador para VPH de alto riesgo, 1 ml | 500 µl |
| Calibrador para VPH de alto riesgo, 2 ml | 1000 µl |
| Control de calidad para VPH de bajo riesgo o para VPH de alto riesgo, 1 ml | 500 µl |
| Muestra recogidas en STM, 1 ml | 500 µl |

3. Mezcle los tubos por medio del método del MST Vortexer 2 o por medio del método de agitación vorticial manual de tubos individuales.

Método del MST Vortexer 2

- Cubra los tubos con una lámina selladora de tubos DuraSeal, extendiendo la lámina sobre los tubos en la gradilla de muestras.
- Coloque la tapa de la gradilla sobre los tubos cubiertos con la lámina y fije la tapa con las dos pinzas laterales. Corte la lámina con el dispositivo de corte.
- Mueva la palanca de mango rojo a la posición superior de manera que quede horizontal.
- Coloque firmemente la gradilla de muestras dentro de las guías del MST Vortexer 2, con la esquina escotada más grande de la gradilla en la esquina frontal derecha. Asegure la gradilla de muestras moviendo la palanca de mango rojo a la posición inferior de manera que quede vertical.
- Asegúrese de que el valor de configuración de la velocidad es 100 (velocidad máxima) y encienda el MST Vortexer 2.
- Agite los tubos en el agitador vorticial durante 10 segundos.
- Apague el MST Vortexer 2.
- Extraiga la gradilla de muestras del MST Vortexer 2 moviendo la palanca de mango rojo a la posición superior.

Método de agitación vorticial manual de tubos individuales

- Vuelva a tapar los tubos con tapas roscadas nuevas para tubos de recogida de muestras.
- Mezcle bien cada tubo de forma individual mediante agitación vorticial a alta velocidad durante 5 segundos.

Importante: Durante el mezclado debe observarse un vórtice visible de líquido que lava toda la superficie interna del tubo.

- Invierta cada tubo una vez para lavar el interior del tubo, la tapa y el reborde.

d. Vuelva a colocar el tubo en la gradilla.

El líquido del tubo debe adquirir un color morado.

4. Incube los tubos en una gradilla en un baño María a 65 ± 2 °C durante 45 ± 5 minutos.

Para el análisis manual, prepare la mezcla de la sonda durante esta incubación (consulte “Mezcla de la sonda” en la página 38).

5. Extraiga los tubos del baño María tras la incubación.

Si utiliza una gradilla de muestras, no deje que se enfríe antes de quitar la tapa de la gradilla. De inmediato, realice el análisis o quite la tapa de la gradilla y la lámina selladora de tubos DuraSeal.

Nota: Si la gradilla de muestras se enfría, los tubos podrían adherirse a la tapa de la gradilla y derramarse.

Los calibradores, los controles de calidad y las muestras recogidas en STM

- Conservadas (consulte el apartado “Punto de detención opcional de muestras recogidas en STM preparadas y de muestras de sedimento celular de posgradiente con PreservCyt y SurePath preparadas manualmente” en la página 52).
- Analizadas inmediatamente (continúe en “Hibridación de muestras recogidas en STM preparadas y de muestras de sedimento celular de posgradiente con PreservCyt y SurePath preparadas manualmente” en la página 53).

Punto de detención opcional de muestras recogidas en STM preparadas y de muestras de sedimento celular de posgradiente con PreservCyt y SurePath preparadas manualmente

Importante: No almacene ni envíe en nieve carbónica muestras desnaturalizadas.

Todas las muestras preparadas, incluidos los calibradores y los controles de calidad, 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. Se pueden realizar como máximo 3 ciclos de congelación/descongelación, con un máximo de 2 horas a temperatura ambiente durante cada ciclo de descongelación.

Para el almacenamiento hasta el día siguiente a una temperatura de 2 °C a 8 °C en la gradilla de muestras, cubra las muestras con una lámina selladora de tubos DuraSeal y vuelva a colocar la tapa de la gradilla.

Para la conservación a -20 °C en la gradilla de muestras, quite la tapa de la gradilla y la lámina selladora de tubos DuraSeal, y coloque a los tubos una tapa correcta.

Hibridación de muestras recogidas en STM preparadas y de muestras de sedimento celular de posgradiente con PreservCyt y SurePath preparadas manualmente

 Cuando realice el análisis automatizado con el sistema RCS de muestras recogidas en STM o de muestras de sedimento celular de posgradiente con PreservCyt y SurePath preparadas manualmente, consulte el manual del usuario del Rapid Capture System (*Rapid Capture System User Manual*) para obtener instrucciones para finalizar el análisis.

Si se han almacenado los calibradores, controles de calidad o muestras desnaturalizados, déjelos que se estabilicen a una temperatura de 20 °C a 25 °C y, si se han almacenado en una gradilla de muestras, quite y deseche las tapas de los tubos.

- Se dispone de dos métodos de hibridación para las muestras recogidas en STM y para las muestras de sedimento celular de posgradiente con PreservCyt y SurePath preparadas manualmente: “Hibridación con microplaca y el Microplate Heater I” e “Hibridación con microtubos y baño María”.
- Las muestras recogidas en STM desnaturalizadas con el método del MST Vortexer 2 deben utilizar el método “Hibridación con microplaca y el Microplate Heater I” descrito en la página 53. El método “Hibridación con microtubos y baño María” (página 535) no se ha validado con muestras recogidas en STM desnaturalizadas con el MST Vortexer 2.
- La mezcla de la sonda es viscosa. 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 de hibridación o microtubo de hibridación.
- Al transferir la muestra a la microplaca de hibridación o al microtubo de hibridación, evite tocar la pared de los pocillos de la microplaca de hibridación o de los microtubos de hibridación, ya que pueden producirse resultados positivos falsos si no se transfieren con cuidado las muestras. Limite la formación de burbujas de aire. Utilice una punta de pipeta extralarga y limpia para cada transferencia, para evitar una contaminación cruzada.

Hibridación con una microplaca y el Microplate Heater I

1. Obtenga una microplaca de hibridación y etiquétela.
2. Mezcle mediante agitación vorticial utilizando uno de los métodos siguientes:
Calibradores, controles de calidad o muestras recogidas en STM con el MST Vortexer 2
 - a. Según proceda, cubra los tubos con una lámina selladora de tubos DuraSeal y fije la tapa de la gradilla a la gradilla de muestras.

- b. Agite la gradilla de muestras durante al menos 5 segundos, a la velocidad máxima.
- c. Coloque la gradilla de muestras inmediatamente sobre la mesa de trabajo y abra los cierres. Levante la tapa de la gradilla aproximadamente 1 cm y desplácela con cuidado hacia la izquierda y hacia la derecha para soltar los tubos que se hayan podido adherir a la lámina selladora de tubos DuraSeal. Retire la tapa de la gradilla levantándola verticalmente hasta desprenderla de la gradilla de muestras.
- d. Retire con cuidado la lámina selladora de tubos DuraSeal de la tapa de la gradilla y deséchela.

Muestras de sedimento celular de posgradiente con PreservCyt o SurePath con el MST

Vortexer 2

- a. Según proceda, cubra los tubos con una lámina selladora de tubos DuraSeal y fije la tapa de la gradilla a la gradilla de muestras.
- b. Agite la gradilla de conversión durante al menos 10 segundos a la velocidad máxima.
- c. Coloque la gradilla de muestras inmediatamente sobre la mesa de trabajo y abra los cierres. Levante la tapa de la gradilla aproximadamente 1 cm y desplácela con cuidado hacia la izquierda y hacia la derecha para soltar los tubos que se hayan podido adherir a la lámina selladora de tubos DuraSeal. Retire la tapa de la gradilla levantándola verticalmente hasta desprenderla de la gradilla de muestras.
- d. Retire con cuidado la lámina selladora de tubos DuraSeal de la tapa de la gradilla y deséchela.

Cualquier tipo de muestra con un agitador vorticial

- a. Agite cada tubo de forma individual durante al menos 5 segundos.
3. Utilizando la pipeta EXPAND-4 o una pipeta monocanal con una punta de pipeta extralarga, transfiera 75 µl de cada calibrador, control de calidad o muestra al fondo de un pocillo vacío de la microplaca de hibridación, conforme al diseño de placa.

Si las muestras se van a almacenar, tape los calibradores, los controles de calidad y las muestras recogidas en STM desnaturalizados con tapas roscadas nuevas para tubos de recogida de muestras y coloque la tapa original para cada muestra en las muestras de sedimento celular de posgradiente con PreservCyt y SurePath.

Nota: Conserve las muestras conforme a los límites indicados en "Punto de detención opcional de muestras recogidas en STM preparadas y de muestras de sedimento celular de posgradiente con PreservCyt y SurePath preparadas manualmente

" en la página 52.

4. Una vez transferida la última muestra, cubra la microplaca de hibridación con una tapa para microplaca, e incube la microplaca durante 10 minutos a una temperatura entre 20 °C y 25 °C.

5. Mezcle bien mediante agitación vorticial la mezcla de la sonda y dispénsela en un depósito desechable para reactivos.
6. Pipetee con cuidado 25 µl de la mezcla de la sonda en cada pocillo de la microplaca de hibridación, utilizando una pipeta de 8 canales y puntas nuevas para cada adición de mezcla de la sonda.
Evite salpicar y tocar la pared de los pocillos de la microplaca de hibridación.
7. Cubra la microplaca de hibridación con una tapa para microplaca y agítela durante 3 ± 2 minutos en el Rotary Shaker I configurado en 1.100 ± 100 rpm.
Tras la agitación, los calibradores, los controles de calidad y las muestras recogidas en STM y en SurePath deben adquirir un color amarillo y las muestras recogidas en PreservCyt deben adquirir un color rosa.

Las muestras que se mantengan moradas pueden no haber recibido la cantidad apropiada de mezcla de la sonda. Añada 25 µl más de mezcla de la sonda a las muestras que permanezcan moradas y agítelas de nuevo. Si una muestra permanece morada después de seguir este procedimiento, analice de nuevo la muestra.
8. Coloque la microplaca de hibridación en el Microplate Heater I estabilizado a 65 ± 2 °C, asegurándose de no producir salpicaduras. Incube la microplaca de hibridación durante 60 ± 5 minutos.
9. Prosiga en “Captura de los híbridos”, en la página 56, para continuar el análisis.

Hibridación con microtubos y baño María

1. Etiquete y coloque en la gradilla para microtubos el número necesario de microtubos de hibridación limpios.
2. Mezcle mediante agitación vorticial cada tubo de calibrador, control de calidad y muestra de forma individual durante al menos 5 segundos antes de extraer la muestra.
3. Utilizando una pipeta monocal con una punta de pipeta extralarga, transfiera 75 µl de cada calibrador, control de calidad o muestra al fondo del microtubo de hibridación correspondiente, conforme al diseño de placa creado..

Si las muestras se van a almacenar, tape los calibradores, los controles de calidad y las muestras recogidas en STM desnaturalizados con tapas roscadas nuevas para tubos de recogida de muestras y coloque la tapa original para cada muestra en las muestras de sedimento celular de posgradiente con PreservCyt y SurePath.

Nota: Conserve las muestras conforme a los límites indicados en “Punto de detención opcional de muestras recogidas en STM preparadas y de muestras de sedimento celular de posgradiente con PreservCyt y SurePath preparadas manualmente” en la página 52.

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. Mezcle bien mediante agitación vorticial la mezcla de la sonda y dispénsela en un depósito desechable para reactivos.
6. Pipetee con cuidado 25 µl de la mezcla de la sonda en cada microtubo de hibridación utilizando una pipeta de 8 canales y puntas nuevas para cada fila.
Evite salpicar y tocar la pared de los microtubos de hibridación.

Examine la gradilla por debajo para asegurarse de que todos los microtubos de hibridación hayan recibido la cantidad adecuada de la mezcla de la sonda.
7. Cubra los microtubos de hibridación con un sellador de placas. Coloque la tapa de la gradilla sobre la gradilla. Agite la gradilla para microtubos durante 3 ± 2 minutos en el Rotary Shaker I configurado en 1.100 ± 100 rpm.

Tras la agitación, los calibradores, los controles de calidad, las muestras recogidas en STM y las muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath deben adquirir un color amarillo, mientras que las muestras recogidas en PreservCyt deben adquirir un color rosa.

Las muestras que se mantengan moradas pueden no haber recibido la cantidad apropiada de mezcla de la sonda. Añada 25 µl más de mezcla de la sonda a las muestras que permanezcan moradas y agítelas de nuevo. Si una muestra permanece morada después de seguir este procedimiento, analice de nuevo la muestra.
8. Incube la gradilla para microtubos durante 60 ± 5 minutos en un baño María a 65 ± 2 °C.
Asegúrese de que el nivel de agua del baño María es suficiente para cubrir todo el volumen del microtubo de hibridación.

Nota: La gradilla para microtubos flotará en el baño María.
9. Prosiga en "Captura de los híbridos", en la página 56, para continuar el análisis.

Captura de los híbridos

1. Extraiga del bastidor de placa todos los pocillos de la microplaca de captura que no sean necesarios.
2. Devuelva los pocillos de la microplaca de captura que no haya utilizado a la bolsa original y séllela de nuevo.
3. Numere de forma secuencial cada columna y rotule la microplaca de captura con un identificador correcto, utilizando un rotulador.

Las muestras se añadirán a los pocillos de la microplaca de captura conforme al diseño de placa creado.

4. Según proceda, extraiga con cuidado la microplaca de hibridación del Microplate Heater I, o extraiga la gradilla para microtubos del baño maría.

Retire inmediatamente la tapa para microplaca y colóquela sobre una superficie limpia o retire la tapa de la gradilla y tire lentamente del sellador de placas hacia arriba a través de la gradilla para microtubos.

5. Utilizando una pipeta de 8 canales, transfiera todo el contenido (unos 100 μ l) de los pocillos de la microplaca de hibridación o de los microtubos de hibridación al fondo de los pocillos correspondientes de la microplaca de captura.

Utilice puntas de pipeta nuevas para cada transferencia y deje que escurra cada punta de pipeta para asegurarse de transferir completamente la muestra. Si se desea, puede estabilizarse la pipeta apoyando la parte media de las puntas de pipeta sobre el borde superior de los pocillos de la microplaca de captura (consulte la Figura 2 más adelante).

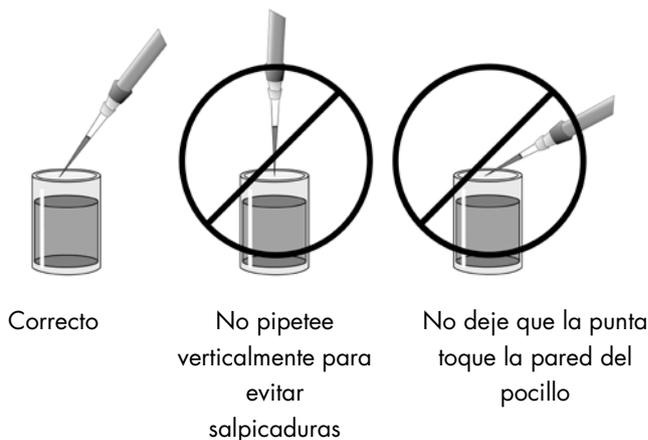


Figura 2. Técnica correcta de pipeteado.

6. Cubra la microplaca de captura con una tapa para microplaca o con un sellador de placas nuevo, y agítela durante 60 ± 5 minutos en el Rotary Shaker I, a 1100 ± 100 rpm, a una temperatura entre 20°C y 25°C .
Prepare el tampón de lavado durante esta incubación (consulte "Tampón de lavado" en la página 39).
7. Una vez finalizada la incubación, extraiga la microplaca de captura del Rotary Shaker I y retire con cuidado la tapa para microplaca o el sellador de placas.
8. Deseche el líquido de los pocillos de la microplaca de captura en una pila; invierta totalmente la microplaca de captura sobre la pila y agítela enérgicamente con un movimiento descendente.

Importante: No vuelva a invertir la microplaca.

Asegúrese de no salpicar decantando demasiado cerca del fondo de la pila.

9. Seque dando firmemente 2-3 golpes suaves sobre toallitas Kimtowels limpias o sobre hojas de papel absorbente de poca pelusa equivalentes.
Asegúrese de eliminar todo el líquido de los pocillos de la microplaca de captura y de que la parte superior de la microplaca de captura está seca.
10. Prosiga en “Detección de los híbridos”, en la página 58, para continuar el análisis.

Detección de los híbridos

- Añada los reactivos a la microplaca de captura de izquierda a derecha utilizando una pipeta de ocho canales. Limpie las puntas sobre el depósito desechable para reactivos para eliminar el exceso de reactivo antes de dispensarlo a la microplaca.
 - Si no se utiliza una pipeta de 8 canales, puede usarse en su lugar una pipeta repetidora adecuada. Dispense el DR1 en un tubo de polipropileno del tamaño suficiente para contener el volumen necesario.
 - Se recomienda utilizar la técnica de pipeteado inverso para mejorar la uniformidad de la dispensación del reactivo. El procedimiento se describe a continuación.
 - Si se desea, puede estabilizarse la pipeta apoyando la parte media de las puntas de pipeta sobre el borde superior de los pocillos de la microplaca de captura. Asegúrese de no tocar la pared de los pocillos de la microplaca de captura, ya que podría producirse una contaminación cruzada de las muestras (consulte la Figura 2 en la página 57).
1. Mezcle bien el DR1 y transfiera con cuidado el volumen correcto (según proceda, consulte la Tabla 1 en la página 41 o la Tabla 4 en la página 36) a un depósito desechable y limpio para reactivos.
 2. Pipetee con cuidado 75 µl de DR1 en cada pocillo de la microplaca de captura, utilizando la técnica de pipeteado inverso, tal como se indica a continuación:
 - 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 el reactivo.
 - d. Suelte el émbolo lentamente y deje que el reactivo llene las puntas.
 - e. Dispense el reactivo en los pocillos de la microplaca presionando el émbolo hasta el primer tope. No suelte el émbolo hasta que las puntas de pipeta se hayan sumergido en el reactivo.

-
- f. Vuelva a llenar las puntas y repita el proceso hasta que todos los pocillos de la microplaca estén llenos.

Observe la intensidad del color rosa para asegurarse de que se han llenado todos los pocillos de la microplaca de captura. Todos los pocillos de la microplaca de captura deben tener un color rosa de intensidad similar.

3. Cubra la microplaca de captura con una tapa para microplaca, Parafilm limpio o un elemento equivalente e incúbela durante 30-45 minutos a una temperatura de 20 °C a 25 °C.
4. Prosiga en "Lavado", en la página 60, para continuar el análisis.

Lavado

Lave la microplaca de captura utilizando uno de los métodos indicados a continuación.

Método del Automated Plate Washer

Mantenga siempre encendido el Automated Plate Washer. 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 manual del usuario del Automated Plate Washer (*Automated Plate Washer User Manual*) si desea obtener más instrucciones.

- Asegúrese de que el depósito de lavado está relleno hasta al menos la marca de 1 litro con tampón de lavado. Si no es así, prepare el tampón de lavado (consulte "Tampón de lavado" en la página 39).
 - 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.
 - Si únicamente se está utilizando una tira parcial de pocillos de microplaca de captura, coloque pocillos de microplaca vacíos en la microplaca de captura para completar la columna antes del lavado.
1. Retire la tapa para microplaca y coloque la microplaca de captura sobre la plataforma del Automated Plate Washer.
 2. Asegúrese de que el Automated Plate Washer está encendido y de que la pantalla indica **Digene Wash Ready** (Lavado de digene listo) o **P1**.
 3. Seleccione el número de tiras que van a lavarse pulsando la tecla **Rows** (Filas) y, a continuación, las teclas **+** o **-** para ajustar el valor.
 4. Pulse la tecla **Rows** para volver a la pantalla **Digene Wash Ready** o **P1**.
 5. Pulse el botón **Start/Stop** (Iniciar/Parar) para comenzar.

The Automated Plate Washer will perform 6 fill-and-aspirate cycles taking approximately El Automated Plate Washer 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 microplaca antes de tiempo.

Cuando el Automated Plate Washer haya finalizado el lavado, se mostrará el mensaje **“Digene Wash Ready”** o **“P1”**.

6. Retire la microplaca de captura de la plataforma del Automated Plate Washer cuando haya finalizado el programa.

La microplaca de captura debe tener un color blanco, y no debe quedar líquido residual rosa en los pocillos de la microplaca de captura.

7. Prosiga en “Amplificación de la señal”, en la página 62, para continuar el análisis.

Método de lavado manual

1. Extraiga el DR1 de los pocillos de la microplaca de captura colocando toallitas Kimtowels u hojas de papel absorbente de poca pelusa equivalentes sobre la microplaca de captura.
2. Asegúrese de que las hojas de papel absorbente estén en contacto con toda la superficie de la microplaca de captura y, a continuación, invierta con cuidado la microplaca de captura.
3. Deje que la microplaca de captura escurra durante 1-2 minutos.
4. Seque bien la microplaca sobre toallitas Kimtowels limpias u hojas de papel absorbente de poca pelusa equivalentes.

Deseche con cuidado las hojas de papel absorbente usadas para evitar la contaminación con fosfatasa alcalina.

5. Utilizando el aparato de lavado, lave manualmente la microplaca de captura seis veces.

Para lavarla correctamente, haga rebosar cada pocillo de la microplaca de captura con tampón de lavado. De esta forma se eliminará el DR1 de los bordes superiores de los pocillos de la microplaca de captura. El lavado comienza en el pocillo A1 de la microplaca de captura y continúa de forma serpenteante hacia la derecha y hacia abajo. Una vez llenados todos los pocillos de la microplaca de captura, decante el líquido en la pila con un movimiento descendente enérgico. El segundo lavado se inicia en el pocillo H12 de la microplaca de captura, con un movimiento serpenteante hacia la izquierda y hacia arriba. Esta secuencia de 2 lavados se repite 2 veces más para un total de 6 lavados por pocillo de la microplaca de captura.

6. Después del lavado, seque la microplaca de captura invirtiéndola sobre toallitas Kimtowels u hojas de papel absorbente de poca pelusa equivalentes limpias y dándole firmemente 3-4 golpes suaves. Sustituya las hojas de papel absorbente y seque la microplaca de nuevo.
7. Deje invertida la microplaca de captura para que escurra durante 5 minutos. Seque la microplaca de captura una vez más.

La microplaca de captura debe tener un color blanco, y no debe quedar líquido residual rosa en los pocillos de la microplaca de captura.

8. Prosiga en “Amplificación de la señal”, en la página 62, para continuar el análisis.

Amplificación de la señal

- Utilice un par de guantes nuevos para manipular el DR2.
 - Añada los reactivos a la microplaca de captura de izquierda a derecha utilizando una pipeta de 8 canales.
 - Si no se utiliza una pipeta de 8 canales, puede usarse en su lugar una pipeta repetidora adecuada. Dispense el DR2 en un tubo de polipropileno del tamaño suficiente para contener el volumen necesario.
 - Añada el DR2 sin interrupción. El tiempo de incubación de todos los pocillos de la microplaca de captura debe ser lo más parecido posible.
 - Asegúrese de no tocar la pared de los pocillos de la microplaca de captura ni salpicar el reactivo sobre las puntas, ya que podría producirse una contaminación cruzada de las muestras (consulte la Figura 2 en la página 57).
1. Mezcle bien el DR1 y transfiera con cuidado el volumen correcto (según proceda, consulte la **Tabla 1** en la página 35 o la **Tabla 4** en la página 36) a un depósito desechable y limpio para reactivos.
 2. Pipetee con cuidado 75 µl de DR2 en cada pocillo de la microplaca de captura utilizando la técnica de pipeteado inverso previamente descrita (consulte “Detección de los híbridos” en la página 58).

Observe la intensidad del color amarillo para asegurarse de que se han llenado con exactitud todos los pocillos de la microplaca de captura: todos ellos deben tener un color amarillo de intensidad similar.
 3. Cubra la microplaca de captura con una tapa para microplaca e incube la microplaca a una temperatura de 20 °C a 25 °C durante 15 minutos (pero no más de 30 minutos de incubación).

Importante: Evite la luz directa del sol.
 4. Prosiga en “Medición de la microplaca de captura y generación de resultados”, en la página 63, para continuar el análisis.

Medición de la microplaca de captura y generación de resultados

1. Mida la microplaca de captura utilizando un instrumento DML.

Consulte el manual del usuario del software correspondiente para obtener información acerca de la medición de una microplaca de captura y la generación de informes de resultados de la prueba. El software de análisis de ensayos *digene* permite la introducción de información relevante de la prueba.

2. Si no se ha utilizado una microplaca de captura completa, retire del bastidor de microplaca los pocillos usados de la microplaca de captura, enjuague bien el bastidor de microplaca con agua desionizada o destilada, séquelo y resérvelo para la siguiente prueba.
3. Deseche todas las porciones de reactivos y los reactivos preparados a menos que se especifique lo contrario.

Diluya el DNR restante en el frasco antes de desecharlo conforme a los procedimientos de laboratorio nacionales/locales.

Interpretación de los resultados

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

Resultados del análisis de muestras recogidas en STM

Las muestras recogidas en STM con un valor de RLU/CO $\geq 1,0$ se consideran "positive" (positivas) para 1 o más de los tipos del VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68.

Las muestras recogidas en STM con un valor de RLU/CO $< 1,0$ se consideran "negative" (negativas) o "no HPV DNA detected" (sin detección de ADN del VPH) para los 13 tipos del VPH analizados. No hay secuencias de ADN de VPH de alto riesgo o los niveles de ADN del VPH son inferiores al límite de detección de la prueba.

Resultados del análisis de muestras recogidas en SurePath

Las muestras recogidas en SurePath con un valor de RLU/CO $\geq 1,0$ se consideran "positive" (positivas) para 1 o más de los tipos del VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68.

Las muestras recogidas en SurePath con un valor de RLU/CO $< 1,0$ se consideran "negative" (negativas) o "no HPV DNA detected" (sin detección de ADN del VPH) para los 13 tipos del VPH analizados. No hay secuencias de ADN del VPH o los niveles de ADN del VPH son inferiores al límite de detección de la prueba.

Resultados del análisis de muestras recogidas en PreservCyt

Las muestras recogidas en PreservCyt con un valor de RLU/CO $\geq 1,0$ se consideran "positive" (positivas) para 1 o más de los tipos del VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68.

Las muestras recogidas en PreservCyt con un valor de RLU/CO $< 1,0$ se consideran "negative" (negativas) o "no HPV DNA detected" (sin detección de ADN del VPH) para los 13 tipos del VPH analizados. No hay secuencias de ADN del VPH o los niveles de ADN del VPH son inferiores al límite de detección de la prueba.

Para las muestras recogidas en PreservCyt con un valor de RLU/CO $\geq 1,0$ y $< 2,5$, QIAGEN recomienda repetir el análisis de la muestra tal como se indica a continuación:

- Si el valor de RLU/CO de la primera repetición del análisis es $\geq 1,0$, clasifique la muestra como "positiva" (positiva) en el informe. No se requiere ningún análisis más.
- Si el valor de RLU/CO de la primera repetición del análisis es $< 1,0$, se requiere una segunda repetición del análisis (tercer resultado). El segundo resultado es el resultado final ($< 1,0$ es negativo, $\geq 1,0$ es positivo) y se incluye en el informe.

Valor de RLU/CO próximo a 1,0

Si el valor de RLU/CO de una muestra está próximo a 1,0 pero es inferior a dicho valor y se sospecha infección por VPH de alto riesgo, considere la posibilidad de usar otros métodos de análisis y/o de repetir la muestra.

Otros tipos del VPH

Debido a que este ensayo únicamente detecta los tipos de alto riesgo del VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68, tenga en cuenta que la muestra podría contener otros tipos de bajo riesgo del VPH. Si desea realizar específicamente un análisis de VPH de transmisión sexual de bajo riesgo, utilice la prueba *digene* HC2 HPV DNA, que detecta ADN de tipos de bajo riesgo y de alto riesgo del VPH.

Verificación de la calibración del ensayo

La verificación de la calibración del ensayo se realiza para confirmar que los reactivos, los calibradores y los controles de calidad funcionan correctamente, permitiendo así una determinación exacta del valor de corte del ensayo. La prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA requiere una calibración del ensayo con cada prueba; por consiguiente, es necesario verificar cada ensayo. Este procedimiento de verificación no está destinado a reemplazar a la prueba de control de calidad interno. Se han establecido intervalos aceptables para la calibración del ensayo y los controles de calidad únicamente para instrumentos DML aprobados por QIAGEN.

El software de análisis de ensayos *digene* realiza automáticamente la calibración del ensayo y la imprime en el informe de análisis de los datos. Sin embargo, los usuarios que tienen la versión 1.03 del programa *digene* Qualitative Software o una versión anterior deben realizar manualmente la verificación de la calibración del ensayo antes de poder generar un informe de

los resultados de la paciente. Póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN si desea obtener más información.

La prueba debe cumplir los criterios especificados de calibración del ensayo. Si alguno de los criterios indicados a continuación no es válido, el software no interpretará los resultados de la muestra.

Calibrador negativo

El NC debe analizarse por triplicado con cada prueba. El valor medio del NC debe ser ≥ 10 y ≤ 250 RLU y el coeficiente de variación (CV) debe ser $\leq 25\%$. Si el CV es $> 25\%$, el software elimina el valor de RLU más alejado de la media como valor atípico y vuelve a calcular la media y el CV utilizando los valores restantes.

Si el CV sigue siendo $> 25\%$, la calibración del ensayo no es válida y la prueba debe repetirse para todas las muestras de pacientes. Por consiguiente, no genere un informe de los resultados de las muestras de pacientes.

Calibrador positivo

El HRC debe analizarse por triplicado con cada prueba. El CV del HRC debe ser $\leq 15\%$. Si el CV es $> 15\%$, el software elimina el valor de RLU más alejado de la media como valor atípico y vuelve a calcular la media y el CV utilizando los valores restantes.

Si el CV sigue siendo $> 15\%$, la calibración del ensayo no es válida y la prueba debe repetirse para todas las muestras de pacientes. Por consiguiente, no genere un informe de los resultados de las muestras de pacientes.

Media del calibrador positivo/media del calibrador negativo

El software utiliza el $\overline{HRC\bar{X}}$ y el $\overline{NC\bar{X}}$ para calcular el cociente $\overline{HRC\bar{X}}/\overline{NC\bar{X}}$. Un cociente $\overline{HRC\bar{X}}/\overline{NC\bar{X}}$ válido se define como $2,0 \leq \overline{HRC\bar{X}}/\overline{NC\bar{X}} \leq 15$.

Si el cociente $\overline{HRC\bar{X}}/\overline{NC\bar{X}}$ es $< 2,0$ o > 15 , la calibración del ensayo no es válida y la prueba debe repetirse para todas las muestras de pacientes. Por consiguiente, no genere un informe de los resultados de las muestras de pacientes.

Cálculo del valor de corte

El software de análisis de ensayos *digene* calcula y genera informes del valor de RLU/CO y de los resultados positivos/negativos de todas las muestras. El valor de corte para determinar muestras positivas es el $HRC\bar{X}$. El software de análisis de ensayos *digene* utiliza los valores de RLU de la muestra para expresar los resultados como valor de RLU/CO de la muestra.

Para el análisis automatizado con el sistema RCS, el protocolo de ensayo del RCS para el VPH aplica un factor de ajuste de la calibración (CAF, *calibration adjustment factor*) de 0,8 al $HRC\bar{X}$ válido. Este CAF es necesario para que las características de rendimiento del análisis automatizado con el sistema RCS se mantengan equivalentes a las del análisis manual. El CAF únicamente se aplica a los resultados del análisis automatizado con el sistema RCS; por consiguiente, es esencial seleccionar el protocolo de ensayo correcto para generar resultados de la prueba exactos.

Controles de calidad

Con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA se suministran muestras de control de calidad que deben usarse para el control de calidad interno. Los controles de calidad suministrados son dianas de ADN del VPH clonadas y no proceden de VPH natural. Es el mismo tipo de material usado para los calibradores suministrados. Pueden analizarse controles de calidad adicionales conforme a las directrices o requisitos de las normativas locales o nacionales o de los organismos de acreditación. Los controles de calidad suministrados no servirán como control de calidad apropiado para el procesamiento de la solución PreservCyt ni de la solución conservante SurePath.

Consulte el manual del usuario del software de análisis de ensayos *digene* correspondiente si desea instrucciones acerca de cómo introducir los números de lote y las fechas de caducidad de los controles de calidad. Para que un ensayo sea válido, el cociente valor de RLU/valor de corte de cada control de calidad debe encontrarse dentro de los intervalos definidos en los criterios especificados en la Tabla 10 más adelante.

Si los controles de calidad no están dentro de estos intervalos, el ensayo no es válido y la prueba debe repetirse. Por consiguiente, no genere un informe de los resultados de la paciente.

Tabla 10. Criterios de validez del ensayo de los controles de calidad.

| Control de calidad | Mínimo (RLU/CO) | Máximo (RLU/CO) | CV (%) |
|---------------------------|------------------------|------------------------|---------------|
| QC1-LR | 0.001 | 0.999 | ≤25 |
| QC2-HR | 2 | 8 | ≤25 |

Limitaciones

- La prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA para los tipos del VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 no se recomienda para la evaluación de presuntos abusos sexuales.
- La prevalencia de la infección por el VPH en una población puede afectar al rendimiento. Los valores pronósticos positivos disminuyen cuando se analizan poblaciones con una prevalencia baja o personas sin riesgo de infección.
- Un resultado negativo de la prueba no descarta la posibilidad de infección por el VPH debido a que los niveles muy bajos de infección o los errores en la recogida de las muestras pueden causar un resultado negativo falso de la prueba. Además, esta prueba no detecta el ADN de tipos del VPH de bajo riesgo (6, 11, 42, 43 y 44).
- La infección por el VPH no es un indicador definitivo de la presencia de lesiones cervicales de alto grado ni implica en todos los casos que se vayan a desarrollar lesiones de alto grado o cáncer.
- Existe un pequeño grado de hibridación cruzada entre la sonda de VPH de alto riesgo y los tipos del VPH 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 y MM9. Las pacientes que tienen muestras con niveles altos de estos tipos del VPH pueden ser derivadas incorrectamente para la realización de una colposcopia (15, 35).
- La prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA está diseñada para detectar tipos de alto riesgo del VPH, incluidos los tipos 39, 58, 59 y 68. Los estudios analíticos realizados por QIAGEN con ADN plasmídico clonado del VPH demuestran que la prueba detecta estos tipos a 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 High-Risk 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 (28), no se han confirmado estadísticamente las características de rendimiento de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA para la detección de los tipos del VPH 39, 58, 59 y 68.
- Si existen concentraciones altas de cremas antifúngicas, geles anticonceptivos o productos para ducha vaginal en el momento de obtener una muestra recogida en STM para su análisis, 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.
- Si existen concentraciones altas de cremas antifúngicas, gel lubricante vaginal o sangre en el momento de obtener una muestra cervical recogida en PreservCyt para la preparación de la muestra con el kit QIAAsymphony DSP HPV Media, existe la posibilidad de obtener un

resultado negativo falso si estas muestras contienen cantidades de ADN del VPH que producen valores de RLU/CO próximas al valor de corte del ensayo.

- Si existe gel anticonceptivo en el momento de obtener una muestra cervical recogida en PreservCyt para la preparación de muestras con el kit QIAasymphony DSP AXpH DNA, podría obtenerse un resultado negativo falso de la prueba.
- En caso de presencia de gel anticonceptivo, crema antifúngica o crema antiinflamatoria en el momento de obtener una muestra cervicouterina recogida en SurePath para la preparación de muestras con el kit QIAasymphony DSP HPV Media, podría obtenerse un resultado negativo falso de la prueba.
- Es posible la reactividad cruzada entre la sonda de VPH de alto riesgo 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.
- Al realizar un análisis automatizado con el sistema RCS, si no se comprueba visualmente la placa de hibridación para confirmar la transferencia correcta de las muestras y no se corrigen las transferencias de muestras inadecuadas pueden obtenerse resultados negativos falsos.

Características del rendimiento

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

A continuación se describen los resultados de 8 estudios clínicos independientes realizados por reputadas instituciones médicas, académicas y gubernamentales en centros de Estados Unidos y de otros países. Los estudios utilizaron los métodos citológicos establecidos en uso en los países en los que se realizó el estudio. En todos los casos menos en 2 se utilizó el sistema de graduación de Bethesda para interpretar los resultados de la citología. 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* (36). Además, las lesiones cervicales de alto grado se diagnosticaron mediante una 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 prueba de citología en mujeres de mayor edad (generalmente, mayores de 30 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. Dos de los estudios se realizaron en Estados Unidos, 2 en Europa, 2 en Latinoamérica, 1 en África y 1 en Asia.

Se resume el rendimiento de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA observado en 6 estudios transversales (consulte las tablas 11 y 12 más adelante) para mujeres de 30 años de edad o más con un diagnóstico de neoplasia cervical de alto grado confirmada histológicamente, que se define como neoplasia intraepitelial cervical (NIC) de grado 3 o mayor.

Tabla 11. Estimaciones del rendimiento: sensibilidad y especificidad

| Población | n | Sensibilidad (%) | | | Especificidad (%) | | |
|---------------------|------|-------------------------------------|----------------|-----------------|----------------------|----------------|-----------------|
| | | (n/N) | | | (n/N) | | |
| | | Intervalo de confianza (IC) del 95% | | | | | |
| | | Citología únicamente | VPH únicamente | VPH + citología | Citología únicamente | VPH únicamente | VPH + citología |
| Europa Occidental 1 | 7592 | 51.6 | 96.3 | 100.0 | 98.5 | 96.2 | 95.1 |
| | | (14/27) | (26/27) | (27/27) | (7453/7565) | (7275/7565) | (7193/7565) |
| | | 32.0–71.3 | 81.0–99.9 | 87.2–100.0 | 98.2–98.8 | 95.7–96.6 | 94.6–95.6 |
| Latinoamérica 1 | 6115 | 58.4 | 94.8 | 97.4 | 98.7 | 93.9 | 93.4 |
| | | (45/77) | (73/77) | (75/77) | (5962/6038) | (5669/6038) | (5637/6038) |
| | | 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* | 6176 | 77.9 | 89.7 | 94.1 | 94.1 | 94.0 | 89.9 |
| | | (53/68) | (61/68) | (64/68) | (5745/6108) | (5742/6108) | (5490/6108) |
| | | 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 | 2925 | 84.1 | 89.7 | 92.5 | 86.4 | 80.0 | 76.4 |
| | | (90/107) | (96/107) | (99/107) | (2436/2818) | (2253/2818) | (2152/2818) |
| | | 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 | 1936 | 97.6 | 100.0 | 100.0 | 76.3 | 83.0 | 68.0 |
| | | (41/42) | (42/42) | (42/42) | (1445/1894) | (1572/1894) | (1287/1894) |
| | | 87.4–99.9 | 91.6–100.0 | 91.6–100.0 | 74.3–78.2 | 81.2–85.0 | 65.8–70.1 |
| Estados Unidos 1 | 1040 | 50.0 | 100.0 | 100.0 | 97.6 | 96.2 | 95.5 |
| | | (1/2) | (2/2) | (2/2) | (1013/1038) | (999/1038) | (991/1038) |
| | | 1.26–98.7 | 15.8–100.0 | 15.8–100.0 | 96.5–98.4 | 94.9–97.3 | 94.0–96.7 |

* Datos de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA cuando estaban disponibles, datos del HCS en caso contrario; datos combinados.

Table 12. Performance estimates — positive and negative predictive value

| Population | n | Prevalence | Positive predictive value (%) | | | Negative predictive value (%) | | |
|------------------|------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | | CIN 3 (%) | (n/N) | | | (n/N) | | |
| | | (n/N) | 95% CI | | | 95% CI | | |
| | | 95% CI | Pap alone | HPV alone | HPV + Pap | Pap alone | HPV alone | HPV + Pap |
| Western Europe 1 | 7592 | 0.36 (27/7592) 0.23–0.52 | 11.1 (14/126) 6.2–17.9 | 8.23 (26/316) 5.5–11.8 | 6.77 (27/399) 4.5–9.7 | 99.83 (7453/7466) 99.7–99.9 | 99.99 (7275/7276) 99.9–100.0 | 100.0 (7193/7193) 99.9–100.0 |
| Latin America 1 | 6115 | 1.26 (77/6115) 0.99–1.57 | 37.2 (45/121) 28.6–46.4 | 16.5 (73/442) 13.2–20.3 | 15.8 (75/476) 12.6–19.4 | 99.47 (5962/5994) 99.3–99.6 | 99.93 (5669/5673) 99.8–100.0 | 99.96 (5637/5639) 99.9–100.0 |
| Latin America 2* | 6176 | 1.10 (68/6176) 0.86–1.39 | 12.7 (53/416) 9.7–16.3 | 14.3 (61/427) 11.1–18.0 | 9.4 (64/682) 7.3–11.8 | 99.74 (5745/5760) 99.6–99.9 | 99.88 (5742/5749) 99.8–100.0 | 99.93 (5490/5494) 99.8–100.0 |
| Africa | 2925 | 3.66 (107/2925) 3.01–4.40 | 19.1 (90/472) 15.6–22.9 | 14.5 (96/661) 11.9–17.4 | 12.9 (99/765) 10.6–15.5 | 99.31 (2436/2453) 98.9–99.6 | 99.51 (2253/2264) 99.1–99.8 | 99.63 (2152/2160) 99.3–99.8 |
| Asia | 1936 | 2.17 (42/1936) 1.57–2.92 | 8.37 (41/490) 6.1–11.2 | 11.5 (42/364) 8.4–15.3 | 6.47 (42/649) 4.7–8.7 | 99.93 (1445/1446) 99.6–100.0 | 100.0 (1572/1572) 99.8–100.0 | 100.0 (1287/1287) 99.7–100.0 |
| USA 1 | 1040 | 0.19 (2/1040) 0.02–0.69 | 3.85 (1/26) 0.1–19.6 | 4.88 (2/41) 0.6–16.5 | 4.08 (2/49) 0.5–14.0 | 99.90 (1013/1014) 99.5–100.0 | 100.0 (999/999) 99.6–100.0 | 100.0 (991/991) 99.6–100.0 |

* *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test data where available, HCS data used otherwise; data combined.

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 frente a la de la citología sola. Al igual que para la sensibilidad, el valor pronóstico negativo del VPH es superior al de la citología sola en todos los casos, próximo al 100%. Este valor pronóstico negativo demuestra la elevada probabilidad de ausencia de lesiones cervicales de alto grado o cáncer de cuello uterino en mujeres con una citología normal que no padecen infección por el VPH.

Aunque la especificidad de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA es inferior a la de la citología 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 lesiones cervicales en el presente o en el futuro. 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 citología anormal, la edad en el momento de la primera relación sexual, el número de parejas sexuales y la presencia de enfermedades de transmisión sexual concomitantes (37, 38).

Aunque la prevalencia de lesiones de alto grado no varía de forma significativa entre los estudios a partir de los cuales se determinó el rendimiento, la prevalencia de la infección por el VPH en una población puede afectar al rendimiento y generalmente varía con la población de pacientes. Además, se ha demostrado que la prevalencia de la infección por el VPH disminuye drásticamente con la edad (17, 24-29, 38-40). Los valores pronósticos positivos disminuyen cuando se analizan poblaciones con una prevalencia baja o personas con un riesgo bajo de infección.

Se realizó un análisis longitudinal con los resultados de dos estudios; uno, 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. (Laboratorio Pol Bouin C.H.U) de Reims. Estos análisis longitudinales se llevaron a cabo para demostrar que las pacientes con un resultado negativo, tanto en la citología como en la prueba del VPH, tienen un riesgo menor de padecer lesiones cervicales que las mujeres tradicionalmente definidas como de bajo riesgo, cuyo estado respecto del VPH se desconoce, y en comparación con las pacientes con citología negativa y resultado positivo en la prueba del VPH (consulte las tablas 13 y 14, más adelante).

Tabla 13. Análisis longitudinal: riesgo relativo de lesiones de alto grado

| Grupo del estudio | Edad | Clasificación de bajo riesgo | n | Casos de NIC 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* | 9429 | 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 | 1690 | 3 | 0.084 | 0.849 (0.307–2.35) |
| | | Citologías normales consecutivas† | 2026 | 4 | 0.099 | 1.000 |
| | Todas | Citología normal, VPH negativo | 2180 | 3 | 0.066 | 0.491 (0.221–1.09) |
| | | Citologías normales consecutivas† | 2650 | 7 | 0.136 | 1.000 |

* Tres citologías normales en aproximadamente 2 años.

† Dos citologías normales en aproximadamente 2 años

Tabla 14. Análisis longitudinal: tasas de enfermedad estratificadas en función del estado respecto del VPH en el momento basal

| Grupo del estudio | Edad | Estado basal | n | Casos de NIC 3+ | Tasa (por 100 pacientes-años) | Riesgo relativo IC del 95% |
|-------------------|----------|--------------------------------|--------|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|
| NCI | 30 o más | Citología normal, VPH positivo | 1078 | 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 | 2561 | 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 | 2180 | 3 | 0.066 | 1.00 |

La utilidad clínica del resultado del análisis del VPH se demuestra, además, por el aumento del riesgo de padecer lesiones cervicales en mujeres con un resultado VPH+, en comparación con las mujeres con un resultado VPH–.

Rendimiento clínico en el cribado de pacientes con resultados de ASC-US en la citología cervical para determinar la necesidad de derivación a colposcopia

En 1996 se llevó a cabo en Estados Unidos el estudio “Utility of HPV DNA Testing for Triage of Women with Borderline Pap Smears” (Utilidad del análisis de ADN del VPH para la clasificación de mujeres con citología dudosa), bajo la dirección del Kaiser Foundation Research Institute y del Kaiser Permanente Medical Group. Se obtuvieron muestras cervical para la realización de una citología sistemática y de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA de mujeres que acudían a varios centros clínicos Kaiser. Las citologías iniciales se evaluaron conforme a la clasificación de

Bethesda. Para conocer la terminología equivalente para el cribado del cáncer de cuello uterino en la Unión Europea, consulte el documento *European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening* (42). Las mujeres (de 15 años o más) cuya citología confirmó la presencia 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. Las muestras histológicas para colposcopia fueron examinadas por anatomopatólogos, y se estableció un diagnóstico inicial. Cada muestra histológica fue revisada también por un anatomopatólogo independiente, y las discrepancias entre la revisión inicial y la revisión independiente fueron resueltas por un tercer anatomopatólogo.

La muestra inicial se analizó con un prototipo de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA que contenía sondas de 11 de los 13 tipos del VPH (excepto los tipos del VPH 59 y 68). No habría esperar que esta diferencia produjera un perfil de rendimiento significativamente diferente para la prueba.

Se dispuso de resultados de la prueba de ADN de VPH de alto riesgo y de diagnósticos histológicos de 885 mujeres con un resultado de ASC-US en la citología. 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 High-Risk HPV DNA para STM y para la solución PreservCyt, se presenta únicamente el rendimiento del ensayo para la solución PreservCyt.

Entre las pacientes que tenían un resultado de ASC-US en la citología motivo de derivación, el valor pronóstico negativo de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA de presentar HSIL o lesiones de grado mayor en la colposcopia es del 99% (consulte la tabla 15 más adelante).

Tabla 15. Comparación de la prueba digene HC2 High-Risk HPV DNA frente al examen histológico de consenso; población con un resultado de ASC-US en la citología motivo de derivación; estudio Kaiser, muestras recogidas en PreservCyt.

| | | HSIL o grado mayor en el momento de la colposcopia | | Total |
|--|---|--|-----|-------|
| | | + | - | |
| Prueba digene HC2 High-Risk HPV DNA | + | 66 | 317 | 383 |
| | - | 5 | 497 | 502 |
| Total | | 71 | 814 | 885 |

Sensibilidad (PT/[PT+NF]) = 93,0% (66/71)
 IC del 95% = 84,3-97,7
 Especificidad (NT/[NT+PF]) = 61,1% (497/814)
 IC del 95% = 57,7-64,4
 Prevalencia de lesiones = 8,0% (71/885)
 Valor pronóstico positivo del ensayo = 17,2% (66/383)
 Valor pronóstico negativo del ensayo = 99,0% (497/502)

Se determinan los valores pronósticos positivo y negativo teóricos basados en las distintas prevalencias para un caso de ASC-US inicial que posteriormente tiene un resultado de HSIL o grado mayor en el análisis de VPH de alto riesgo (consulte la tabla 16 más adelante).

Tabla 16. Valor pronóstico positivo y negativo teórico del análisis de VPH de alto riesgo de resultados de ASC-US en la citología.

| Prevalencia teórica de la HSIL | Resultado inicial de ASC-US en la citología | |
|--------------------------------|---|--------------------------------------|
| | Valor pronóstico positivo del ensayo | Valor pronóstico 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 |

Se determina la variación entre los distintos grupos de edad incluidos en este estudio (consulte la tabla 17 más adelante).

Tabla 17. Datos del estudio Kaiser: rendimiento de la prueba digene HC2 High-Risk HPV DNA frente a los resultados del examen histológico de consenso (HSIL); características específicas de la edad.

| | Edad < 30 | Edad 30-39 | Edad > 39 |
|--------------------------------------|------------|------------|-----------|
| n | 287 | 233 | 365 |
| Prevalencia de lesiones (%) | 12.2 | 11.2 | 2.7 |
| Sensibilidad (%) | 100 | 88.46 | 80.0 |
| (n/N) | (35/35) | (23/26) | (8/10) |
| IC del 95% | 90.0–100.0 | 69.9–97.6 | 44.4–97.5 |
| Especificidad (%) | 31.4 | 66.2 | 79.15 |
| (n/N) | (79/252) | (132/207) | (281/355) |
| IC del 95% | 25.7–37.5 | 59.3–72.6 | 74.6–83.3 |
| Valor pronóstico negativo (%) | 100.0 | 97.86 | 99.29 |
| (n/N) | (79/79) | (137/140) | (281/283) |
| Valor pronóstico positivo (%) | 16.83 | 24.73 | 9.76 |
| (n/N) | (35/208) | (23/93) | (8/82) |

Sensibilidad y especificidad clínicas para la determinación del riesgo de padecer lesiones de alto grado en mujeres con resultados de LSIL o HSIL en la citología

Se llevó a cabo un estudio clínico multicéntrico con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA con muestras recogidas en varias clínicas colposcópicas grandes de centros médicos y hospitales con alta prevalencia de lesiones cervicales e infección por el VPH (3 centros) en el oeste y 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 formada por mujeres que tenían un diagnóstico de LSIL o de HSIL basado en una citología reciente y que habían sido derivadas para una colposcopia de seguimiento. De las 702 pacientes inscritas, 327 tenían resultados de grado mayor a ASC-US en la citología y suficiente información disponible; 96 de estas pacientes tenían un estado de enfermedad final de HSIL o grado mayor.

Las muestras de células cervicales exfoliadas se obtuvieron con el *digene* HC2 DNA Collection Device y posteriormente se pusieron en STM o se obtuvieron con un dispositivo de cepillado y posteriormente 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 High-Risk HPV DNA y los resultados se compararon con el estado de enfermedad determinado para cada paciente. El estado de enfermedad se basó en los resultados del examen histológico. Sin embargo, en los casos en los que el examen histológico era negativo o no se disponía de un

resultado histológico, el estado de enfermedad se determinó mediante citología en el momento del examen colposcópico (consulte la tabla 18 más adelante).

La prueba *digene* HC2 High-Risk 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 realizó en un laboratorio anatomopatológico de referencia y el examen histológico se llevó a cabo en los centros que realizaron la colposcopia. Se compararon los resultados de la prueba con el estado de la enfermedad para evaluar la sensibilidad, la especificidad y los valores pronósticos negativo y positivo de la prueba para detectar una neoplasia cervical de alto grado. Debido a las semejanzas entre las características de rendimiento de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA para STM y para la solución PreservCyt, se presenta únicamente el rendimiento del ensayo para la solución PreservCyt. No se observaron diferencias en los resultados del análisis de VPH de alto riesgo entre las muestras recogidas en STM y las recogidas en PreservCyt.

Tabla 18. Algoritmo del estado de la enfermedad de las pacientes

| Resultado citológico | Resultado histológico | Estado de la enfermedad |
|----------------------|--------------------------|-------------------------|
| Negativo | Negativo o no realizado* | Negativo |
| LSIL | Negativo | LSIL |
| HSIL | Negativo | HSIL |
| Cáncer | Negativo | HSIL+ |
| Negativo | LSIL | LSIL |
| LSIL | No realizado* | LSIL |
| LSIL | LSIL | LSIL |
| HSIL | LSIL | LSIL |
| Cáncer | LSIL | LSIL |
| Negativo | HSIL | HSIL |
| LSIL | HSIL | HSIL |
| HSIL | HSIL | HSIL |
| HSIL | No realizado* | HSIL |
| Cáncer | HSIL | HSIL |
| Negativo | Cáncer | HSIL+ |
| LSIL | Cáncer | HSIL+ |
| HSIL | Cáncer | HSIL+ |
| Cáncer | No realizado* | HSIL+ |
| Cáncer | Cáncer | HSIL+ |

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

El rendimiento de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA se determinó con 327 muestras recogidas en PreservCyt, 96 de las cuales se obtuvieron de mujeres con un diagnóstico de lesiones cervicales de alto grado (consulte las tablas 19 y 20 más adelante). Las comparaciones se llevaron a cabo con todas las pacientes del estudio que tenían resultados anormales en la citología motivo de derivación.

Tabla 19. Resultados del análisis de VPH de alto riesgo.

| | | Estado de enfermedad final de HSIL | | Estado de enfermedad final de LSIL | | Estado de enfermedad final negativo | | Total |
|--|-------|------------------------------------|---|------------------------------------|----|-------------------------------------|----|------------|
| | | + | - | + | - | + | - | |
| Resultado en la citología motivo de derivación | LSIL | 44 | 4 | 78 | 33 | 28 | 37 | 224 |
| | HSIL | 45 | 3 | 29 | 14 | 5 | 7 | 103 |
| | Total | 89 | 7 | 107 | 47 | 33 | 44 | 327 |
| | Total | 96 | | 154 | | 77 | | 327 |

La prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA 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 (consulte la tabla 20, más adelante). La prueba también demostró un valor pronóstico negativo de casi el 95% en esta población.

Tabla 20. Características de rendimiento del análisis de ADN de VPH de alto riesgo en pacientes con un resultado de LSIL o grado mayor en la citología motivo de derivación y un estado de la enfermedad final de HSIL.

| | | Estado de enfermedad final | | Total |
|--|--------------|----------------------------|-----------------|------------|
| | | HSIL | LSIL o negativo | |
| Resultado del análisis de ADN de VPH de alto riesgo | + | 89 | 140 | 229 |
| | - | 7 | 91 | 98 |
| | Total | 96 | 231 | 327 |

Sensitivity [TP/(TP+FN)] = 92.7% (89/96)
 95% CI = 85.6–97.0
 Specificity [TN/(TN+FP)] = 39.4% (91/231)
 95% CI = 33.1–46.0
 Disease prevalence for referral LSIL to final HSIL = 21.4%
 Disease prevalence for referral HSIL to final HSIL = 46.6%
 Overall positive predictive value = 38.9% (89/229)
 Overall negative predictive value = 92.8% (91/98)

Aunque la especificidad de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA parecía ser algo baja, no se prevé una correlación estricta entre la ausencia de neoplasia y un resultado de VPH negativo. Puede detectarse ADN del VPH en mujeres que no han presentado progresión a lesiones de grado mayor. De hecho, cuando se realizó un análisis 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 en la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA y cuyo estado de enfermedad correspondiente era inferior a neoplasia de bajo grado, casi el 75% de los casos fueron positivos.

Se determinaron los valores pronósticos positivo y negativo teóricos de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA para resultados iniciales de LSIL o HSIL en la citología con un resultado de HSIL o de lesiones de grado mayor en la colposcopia (consulte la tabla 21 más adelante).

Tabla 21. Valor pronóstico positivo y negativo teórico de la prueba digene HC2 High-Risk HPV DNA para resultados iniciales de LSIL o HSIL en la citología

| Prevalencia teórica de la HSIL | Resultado inicial de LSIL o HSIL en la citología | |
|--------------------------------|--|--------------------------------------|
| | Valor pronóstico positivo del ensayo | Valor pronóstico 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 |

Rendimiento con muestras vaginales o recogidas por la paciente

En la literatura médica citada en relación con el rendimiento de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA con muestras vaginales recogidas por la propia paciente, se incluyó a más de 141.000 mujeres de 16 a 54 años de edad. Las cohortes del estudio incluían a mujeres de China (41, 42), México (43, 44) y el Reino Unido (45). El diseño de los estudios presentaba ligeras variaciones pero, en general, se ofreció a las mujeres con un resultado positivo en la prueba la posibilidad de someterse a un examen adicional mediante colposcopia, y los resultados se notificaron en términos de sensibilidad y especificidad frente al método de comparación.

En dos estudios de los que se disponía de datos para comparar muestras recogidas por la propia paciente y muestras recogidas por el médico, los resultados indican una sensibilidad alta para la NIC2+ con ambos métodos (42, 45), 81-85% para las muestras recogidas por la propia paciente y 96-100% para las muestras recogidas por el médico. Los resultados de especificidad fueron similares para la NIC2+ con ambos métodos (42, 45), 81-82% para las muestras recogidas por la propia paciente y 83-85% para las muestras recogidas por el médico. En otros estudios de los que se disponía de datos de rendimiento únicamente con muestras recogidas por la propia paciente, el rendimiento de la sensibilidad de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA para la NIC2+ fue 3,4 veces mayor en comparación con la citología (43), con una sensibilidad del 98% antes del ajuste del sesgo de verificación (44).

Sensibilidad analítica

Se analizó un panel no clínico de ADN de plásmidos de VPH clonados para determinar si la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA es capaz de detectar los 13 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, 1,0 pg/ml, 0,5 pg/ml y 0,2 pg/ml) de cada uno de los 13 tipos de ADN del VPH (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) se analizó por triplicado. Se calculó el valor medio de RLU para cada concentración de cada tipo de VPH y se comparó con el calibrador positivo.

Se determinó el límite de detección de cada tipo del VPH en STM (consulte la tabla 22 más adelante). Los límites de detección variaron entre 0,62 pg/ml y 1,39 pg/ml según el tipo de VPH analizado. El límite de detección medio de los 13 tipos de ADN del VPH fue de 1,08 pg/ml, con una desviación estándar de 0,05 pg/ml.

Tabla 22. Resumen de los límites detectables de sensibilidad de cada tipo de ADN del VPH en STM.

| Tipo de ADN del VPH | Concentración detectable de ADN del VPH (pg/ml) | Desviación estándar | IC del 95% |
|--------------------------------|---|---------------------|------------------|
| 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 |
| 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 |
| Media (todos los tipos) | 1.08 | 0.05 | 0.95–1.25 |

Equivalencia entre tipos de muestras

Equivalencia entre muestras recogidas en STM y muestras recogidas en PreservCyt

Se examinó la equivalencia entre muestras recogidas en STM y muestras recogidas en PreservCyt en cuanto a la recuperación equivalente de ADN del VPH 18. Se añadieron aproximadamente 10^6 células HeLa+ que contenían genomas del VPH 18 integrados a STM y a un conjunto de células negativas en solución PreservCyt. Cada tipo de muestra se procesó conforme a sus respectivos procedimientos de preparación y desnaturalización de las muestras tal como se describe en las instrucciones de uso correspondientes y se analizó con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. 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 la preparación de las muestras recogidas en PreservCyt no afecta a la sensibilidad analítica de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Equivalencia entre la preparación manual de muestras recogidas en PreservCyt y la preparación de muestras recogidas en PreservCyt con ayuda del kit QIAasymphony DSP HPV Media

Se hicieron estudios con muestras recogidas en PreservCyt, de una subpoblación de mujeres con citología normal ($n = 1276$) y una subpoblación de mujeres con una citología de ASC-US o superior a ASC-US ($n = 402$). Se efectuaron una preparación manual de muestras y una preparación de muestras con ayuda del kit QIAasymphony DSP HPV Media, por cada muestra seguida por el análisis automatizado con el sistema RCS con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA (véase la tabla 23, a continuación).

Tabla 23. Concordancia de los resultados con muestras recogidas en PreservCyt entre la preparación manual de las muestras y la preparación de muestras con el kit QIAasymphony DSP HPV Media ($n = 1678$)

| Concordancia positiva (%) (n/N) IC del 95% | | Concordancia negativa (%) (n/N) IC del 95% | |
|--|---|--|--|
| Todos los positivos | Región de positivos altos (RLU/CO $\geq 2,5$) | Todos los negativos | Región de negativos altos (RLU/CO $< 0,8$) |
| 96.0 (409/426) | 97.6 (372/381) | 96.2 (1204/1252) | 99.1 (1173/1184) |
| 93.7–97.5 | 95.6–98.8 | 95.0–97.1 | 98.3–99.5 |

La sensibilidad y la especificidad relativas del ensayo de las muestras recogidas en PreservCyt, preparadas con el kit QIASymphony DSP HPV Media, presentan una correlación elevada con los resultados obtenidos con el método de preparación manual de las muestras, como indica el límite inferior del IC del 95% correspondiente a las concordancias positiva y negativa.

Equivalencia entre la preparación manual de muestras recogidas en PreservCyt y la preparación de muestras recogidas en PreservCyt con ayuda del kit QIASymphony DSP AXpH DNA

Se llevaron a cabo estudios con muestras recogidas en PreservCyt, obtenidas de una subpoblación de mujeres de 30 años de edad o más ,con una citología normal (n = 1901) y una subpoblación de mujeres con un resultado de ASC-US en la citología (n = 398). Se efectuaron una preparación manual de muestras y una preparación de muestras con ayuda del kit QIASymphony DSP AXpH DNA, por cada muestra seguida por el análisis la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA (véase la tabla 24, a continuación).

Tabla 24. Concordancia de los resultados con muestras recogidas en PreservCyt entre la preparación manual de las muestras y la preparación de muestras con el kit QIASymphony DSP AXpH DNA (n = 2299)

| Concordancia positiva (%) (n/N) IC del 95% | | Concordancia negativa (%) (n/N) IC del 95% | |
|--|--|--|---|
| Todos los positivos | Región de positivos altos (RLU/CO \geq 2,5) | Todos los negativos | Región de negativos altos (RLU/CO < 0,8) |
| 92.7 | 96.5 | 99.1 | 99.9 |
| (281/303) | (245/254) | (1978/1996) | (1967/1969) |
| 89.3–95.2 | 93.4–98.1 | 98.6–99.4 | 99.6–100.0 |

La sensibilidad y la especificidad relativas del ensayo de las muestras recogidas en PreservCyt, preparadas con el kit QIASymphony DSP AXpH DNA, presentan una correlación elevada con los resultados obtenidos con el método de preparación manual de las muestras, como indica el límite inferior del IC del 95% correspondiente a las concordancias positiva y negativa.

Equivalencia entre la preparación de muestras recogidas en STM y la preparación manual de muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath

Se realizó 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 inclusión 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 según 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 su uso con muestras de sedimento celular de posgradiente con 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 elegido, comenzó después de que un análisis intermedio de la fase de viabilidad demostrara que un valor de corte de 1,0 RLU/CO con muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath dio lugar a una concordancia aceptable con los resultados de las muestras recogidas en STM

En ambas fases de evaluación, se recogieron muestras cervical emparejadas recogidas en SurePath y en STM de cada participante que dio 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, las muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath restantes y la correspondiente muestra recogida en STM se analizaron con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, con un valor de corte de 1,0 RLU/CO (consulte la tabla 25 a continuación).

Tabla 25. Concordancia de los resultados de las muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath con los resultados de las muestras recogidas en STM (todas las edades y clasificaciones citológicas) (n = 1.490).

| Concordancia positiva (%) (n/N) IC del 95% | | Concordancia negativa (%) (n/N) IC del 95% | |
|--|---|--|--|
| Todos los positivos | Región de positivos altos (RLU/CO ≥ 2,5) | Todos los negativos | Región de negativos altos (RLU/CO < 0,80) |
| 93.5 | 96.4 | 95.3 | 96.0 |
| (401/429) | (378/392) | (1011/1061) | (1002/1044) |
| 90.7–95.6 | 94.1–98.0 | 93.8–96.5 | 94.6–97.1 |

La sensibilidad y la especificidad relativas del ensayo para el análisis de muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath presentan una correlación alta con los resultados obtenidos en el análisis de muestras recogidas en STM tal como indica el límite inferior del IC del 95% para las concordancias positiva y negativa.

Equivalencia entre la preparación manual de muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath y la preparación de muestras recogidas en SurePath con el kit QIAasymphony DSP HPV Media

Se hicieron estudios con muestras recogidas en SurePath, a partir de las siguientes subpoblaciones:

- mujeres con citología normal (n = 1189);
- mujeres con una citología de ASC-US o superior a ASC-US (n = 199).

Para cada muestra recogida en SurePath se realizó una preparación de la muestra recogida en SurePath con el kit QIAasymphony DSP HPV Media y una preparación manual de la muestra de sedimento celular de posgradiente. Se realizó un análisis automatizado con el sistema RCS con la prueba digene HC2 High-Risk HPV DNA (consulte la tabla 26 a continuación) para cada una de las muestras preparadas.

Tabla 26. Concordancia de los resultados entre la preparación manual de muestras recogidas en SurePath y la preparación de muestras recogidas en SurePath con el kit QIAasymphony DSP HPV Media (n = 1.388).

| Concordancia positiva (%) (n/N) IC del 95% | | Concordancia negativa (%) (n/N) IC del 95% | |
|--|--|--|---|
| Todos los positivos | Región de positivos altos (RLU/CO \geq 2,5) | Todos los negativos | Región de negativos altos (RLU/CO < 0,8) |
| 91.7 | 97.5 | 99.0 | 99.7 |
| (222/242) | (192/197) | (1134/1146) | (1124/1127) |
| 87.6–94.6 | 94.2–98.9 | 98.2–99.4 | 99.2–99.9 |

La sensibilidad y la especificidad relativas del ensayo de las muestras recogidas en SurePath, preparadas con el kit QIAasymphony DSP HPV Media, presentan una correlación elevada con los resultados obtenidos con el método de preparación manual de las muestras, como indica el límite inferior del IC del 95% correspondiente a las concordancias positiva y negativa.

Equivalencia entre la preparación manual de muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath y la preparación de muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath con el kit QIASymphony DSP HPV Media

Se hicieron estudios con muestras recogidas en SurePath a partir de las siguientes subpoblaciones:

- mujeres con citología normal (n = 1.200)
- mujeres con una citología de ASC-US o superior a ASC-US (n = 183)

Se efectuaron una preparación manual de muestras y una preparación de muestras con el kit QIASymphony DSP HPV Media para cada muestra de sedimento celular de posgradiente con SurePath seguidas del análisis automatizado con el sistema RCS con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA (consulte la tabla 27 a continuación).

Tabla 27. Concordancia de los resultados obtenidos con muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath entre la preparación manual de las muestras y la preparación de las muestras con el kit QIASymphony DSP HPV Media (n = 1.383).

| Concordancia positiva (%) (n/N) IC del 95% | | Concordancia negativa (%) (n/N) IC del 95% | |
|--|--|--|---|
| Todos los positivos | Región de positivos altos RLU/CO $\geq 2,5$ | Todos los negativos | Región de negativos altos RLU/CO $< 0,8$ |
| 92.6 | 97.4 | 94.4 | 99.3 |
| (188/203) | (147/151) | (1114/1180) | (1078/1086) |
| 88.2–95.5 | 93.4–99.0 | 92.9–95.6 | 98.6–99.6 |

La sensibilidad y la especificidad relativas del ensayo de las muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath preparadas con el kit QIASymphony DSP HPV Media presentan una correlación elevada con los resultados obtenidos con el método de preparación manual de las muestras, como indica el límite inferior del IC del 95% correspondiente a las concordancias positiva y negativa.

Concordancia entre métodos de análisis

Se realizó un estudio multicéntrico (n = 2270 pacientes) para evaluar los resultados clínicos del análisis obtenidos con el RCS en comparación con los resultados del análisis obtenidos con el

método manual. Los análisis se realizaron en 3 centros externos a QIAGEN con muestras de pacientes obtenidas de 5 centros de recogida de muestras. El conjunto de datos estaba compuesto por 1269 muestras cervical recogidas en solución PreservCyt y 1001 muestras recogidas en STM.

Se calcularon las concordancias estadísticas entre muestras coincidentes analizadas con el RCS y con el método manual en esta población de pacientes (consulte las tablas 28 y 29 más adelante).

Tabla 28. Resumen de la concordancia entre el análisis automatizado con el sistema RCS y el análisis manual: muestras recogidas en STM (n = 1001).

| Clasificación citológica | Prevalencia del VPH (%) | Concordancia positiva (%) (n/N) IC del 95% | | Concordancia negativa (%) (n/N) IC del 95% | |
|-------------------------------------|-------------------------|--|---|--|---|
| | | Todos los positivos | Región de positivos altos (RLU/CO > 2,5) | Todos los negativos | Región de negativos altos (RLU/CO < 0,8) |
| DLN* < 30 años | 21 | 99.3 (139/140) 96.1–100.0 | 99.1 (112/113) 95.2–100.0 | 99.3 (538/542) 98.1–99.8 | 100.0 (531/531) 99.3–100.0 |
| DLN ≥ 30 años | 15 | 92.0 (23/25) 74.0–99.0 | 93.8 (15/16) 69.8–99.8 | 100.0 (143/143) 97.5–100.0 | 100.0 (142/142) 97.4–100.0 |
| ASC-US | 65 | 98.1 (51/52) 89.7–100.0 | 100.0 (47/47) 92.4–100.0 | 96.4 (27/28) 81.7–99.9 | 100.0 (26/26) 86.8–100.0 |
| LSIL+ | 96 | 100.0 (65/65) 94.5–100.0 | 100.0 (62/62) 94.2–100.0 | 66.7 (2/3) 9.4–99.2 | 66.7 (2/3) 9.4–99.2 |
| Otro | 33 | 100.0 (1/1) 2.5–100.0 | 100.0 (1/1) 2.5–100.0 | 100.0 (2/2) 15.8–100.0 | 100.0 (2/2) 15.8–100.0 |
| Todas las muestras recogidas en STM | 28 | 98.6 (279/283) 96.4–99.6 | 99.2 (237/239) 97.0–99.9 | 99.2 (712/718) 98.2–99.7 | 99.9 (703/704) 99.2–100.0 |

* DLN = dentro de los límites normales.

Tabla 29. Resumen de la concordancia entre el análisis automatizado con el sistema RCS y el análisis manual: muestras recogidas en PreservCyt (n = 1269).

| Clasificación citológica | HPV Prevalencia (%) | Concordancia positiva (%) (n/N) IC del 95% | | Concordancia negativa (%) (n/N) IC del 95% | |
|---|---------------------|--|---|--|---|
| | | Todos los positivos | Región de positivos altos (RLU/CO > 2,5) | Todos los negativos | Región de negativos altos (RLU/CO < 0,8) |
| DLN < 30 años | 20 | 96.2 (75/78) 89.2–99.2 | 100.0 (64/64) 94.4–100.0 | 98.4 (301/306) 96.2–99.5 | 99.0 (293/296) 97.1–99.8 |
| DLN ≥ 30 años | 8 | 88.7 (47/53) 77.0–95.7 | 92.1 (35/38) 78.6–98.3 | 99.1 (578/583) 98.0–99.7 | 99.5 (571/574) 98.5–99.9 |
| ASC-US | 36 | 100.0 (48/48) 92.6–100.0 | 100.0 (46/46) 92.3–100.0 | 96.6 (84/87) 90.3–99.3 | 96.5 (83/86) 90.1–99.3 |
| LSIL+ | 77 | 100.0 (64/64) 94.4–100.0 | 100.0 (62/62) 94.2–100.0 | 89.5 (17/19) 66.9–98.7 | 88.9 (16/18) 65.3–98.6 |
| Otros resultados citológicos | 11 | 100.0 (3/3) 29.2–100.0 | 100.0 (3/3) 29.2–100.0 | 100.0 (24/24) 85.6–100.0 | 100.0 (24/24) 85.8–100.0 |
| Todas las muestras recogidas en PreservCyt* | 20 | 96.4 (238/247) 93.2–98.3 | 98.6 (211/214) 96.0–99.7 | 98.5 (1007/1022) 97.6–99.2 | 98.9 (990/1001) 98.0–99.4 |

* DLN = dentro de los límites normales

† No se disponía de los datos de citología de 4 pacientes.

Se realizó un estudio clínico complementario con muestras recogidas en PreservCyt residuales archivadas, obtenidas de una subpoblación de mujeres de 30 años de edad o más con una citología normal (consulte la tabla 30 más adelante) y una prevalencia del VPH del 4,8%.

Tabla 30. Resumen de la concordancia entre el análisis automatizado con el sistema RCS y el análisis manual: resultado dentro de los límites normales en mujeres de 30 años de edad o más (n = 2077).

| Concordancia positiva (%) (n/N) IC del 95% | | Concordancia negativa (%) (n/N) IC del 95% | |
|--|---|--|---|
| Todos los positivos | Región de positivos altos (RLU/CO > 2,5) | Todos los negativos | Región de negativos altos (RLU/CO < 0,8) |
| 92.0 (92/100) 84.84–96.48 | 91.8 (78/85) 83.77–96.62 | 99.3 (1964/1977) 98.88–99.65 | 99.7 (1944/1949) 99.40–99.92 |

Se observaron 7 resultados discordantes entre el análisis manual y el análisis automatizado con el sistema RCS en la región de positivos altos. Los resultados iniciales del análisis manual para estas 7 muestras estaban fuera del algoritmo de reanálisis recomendado para las muestras recogidas en PreservCyt; no obstante, debido a que el diseño del estudio requería un análisis por triplicado de todas las muestras, se dispuso de resultados de repetición para la resolución de las discrepancias.

Los datos de los análisis de repetición para cada una de las 7 muestras discordantes sugieren que todas las muestras discordantes son negativas con respecto al ADN del VPH (consulte la tabla 31 más adelante). A tenor de los resultados negativos del análisis de repetición obtenidos para los dos duplicados, todos los resultados inicialmente positivos en el análisis manual probablemente fueron positivos falsos.

Tabla 31. Muestras recogidas en PreservCyt discordantes para mujeres de 30 años de edad o más con resultados dentro de los límites normales (n = 7).

| Muestra | Centro | Análisis manual (RLU/CO) | | | Análisis automatizado con el sistema RCS (RLU/CO) | | |
|---------|--------|-----------------------------|--------------|--------------|--|--------------|--------------|
| | | Inicial | Repetición 1 | Repetición 2 | Inicial | Repetición 1 | Repetición 2 |
| 1 | A | 2.51 | 0.08 | 0.08 | 0.12 | 0.17 | 0.14 |
| 2 | A | 20.18 | 0.08 | 0.09 | 0.19 | 0.24 | 0.20 |
| 3 | A | 3.88 | 0.12 | 0.11 | 0.17 | 0.22 | 0.22 |
| 4 | A | 9.37 | 0.09 | 0.09 | 0.15 | 0.21 | 0.20 |
| 5 | A | 6.01 | 0.17 | 0.13 | 0.25 | 0.30 | 0.30 |
| 6 | B | 2.97 | 0.71 | 0.99 | 1.59 | 0.89 | 0.90 |
| 7 | C | 11.01 | 0.16 | 0.14 | 0.19 | 0.15 | 0.21 |

Los resultados de este estudio clínico indican una concordancia global entre el análisis automatizado con el sistema RCS y el análisis manual con muestras recogidas en STM o en PreservCyt.

Reproducibilidad

Reproducibilidad global del análisis manual

Se llevó a cabo un estudio multicéntrico de reproducibilidad para determinar la reproducibilidad entre días, entre centros y global de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA utilizando un panel de dianas de ADN del VPH y muestras clínicas recogidas en STM VPH+ y VPH-.

Tres laboratorios externos realizaron el análisis con el mismo lote de kits *digene* HC2 High-Risk 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 PreservCyt no desnaturalizadas
- calibrador negativo
- calibrador para VPH de alto riesgo positivo a concentración 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 la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Los resultados indican que la reproducibilidad de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA con muestras clínicas es muy buena (consulte la tabla 32 más adelante).

Tabla 32. Reproducibilidad global: reproducibilidad multicéntrica (todas las series analíticas en todos los centros).

| Parámetro estadístico | Resultado |
|---|------------------------|
| Positivos previstos con un resultado positivo observado (IC del 95%) | 100.0% (99.0–100.0) |
| Negativos previstos con un resultado negativo observado (IC del 95%) | 99.0% (97.49–99.73) |
| Concordancia (IC del 95%) | 99.5% (98.70–99.86) |
| Kappa | 0.990 |

Reproducibilidad con muestras clínicas recogidas en STM

Análisis manual.

Se llevó a cabo un estudio para determinar la reproducibilidad del análisis manual de muestras clínicas recogidas en STM con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Se preparó un panel de 20 componentes formado por combinaciones clínicas (10 positivas y 10 negativas) mezclando muestras recogidas en STM previamente analizadas. Las muestras se analizaron por cuadruplicado cada día durante 5 días para un total de 20 duplicados por muestra. El análisis se realizó utilizando una mezcla de la sonda combinada constituida por la sonda de VPH de alto riesgo y una sonda de VPH de bajo riesgo. No cabía esperar que la reproducibilidad de la prueba fuera diferente utilizando únicamente la mezcla de la sonda en la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Se calculó la media del valor de RLU/CO y el IC del 95% en torno a la media (consulte la tabla 33 más adelante).

Tabla 33. Reproducibilidad con muestras recogidas en STM: análisis manual (orden descendente en función de la media del valor de RLU/CO).

| Identificador de la muestra | RLU/CO medio | IC del 95% | Resultado positivo del análisis (%) (n/N) |
|-----------------------------|--------------|------------|---|
| 10 | 3.18 | 3.02–3.35 | 100 (20/20) |
| 20 | 1.43 | 1.36–1.50 | 100 (20/20) |
| 11 | 1.25 | 1.20–1.28 | 100 (20/20) |
| 12 | 1.21 | 1.15–1.27 | 100 (20/20) |
| 15 | 1.20 | 1.14–1.25 | 100 (20/20) |
| 13 | 1.07 | 1.01–1.11 | 80 (16/20) |
| 16 | 1.06 | 1.01–1.09 | 75 (15/20) |
| 17 | 1.04 | 1.00–1.06 | 80 (16/20) |
| 14 | 0.98 | 0.92–1.02 | 45 (9/20) |
| 18 | 0.92 | 0.87–0.96 | 20 (4/20) |
| 19 | 0.72 | 0.68–0.75 | 0 (0/20) |
| 7 | 0.40 | 0.33–0.46 | 0 (0/20) |
| 4 | 0.38 | 0.35–0.39 | 0 (0/20) |
| 9 | 0.37 | 0.32–0.41 | 0 (0/20) |
| 1 | 0.35 | 0.32–0.36 | 0 (0/20) |
| 2 | 0.35 | 0.31–0.37 | 0 (0/20) |
| 8 | 0.32 | 0.29–0.34 | 0 (0/20) |
| 3 | 0.30 | 0.27–0.31 | 0 (0/20) |
| 6 | 0.27 | 0.24–0.30 | 0 (0/20) |
| 5 | 0.26 | 0.23–0.28 | 0 (0/20) |

Para las 5 muestras con una media del valor de RLU/CO al menos un 20% por encima del valor de corte, 100 de 100 duplicados (100,0%) fueron positivos. Para las 5 muestras con una media del valor de RLU/CO menos de un 20% por encima o por debajo del valor de corte, 60 de 100 duplicados (60%; IC del 95% = 49,7-69,6) fueron positivos y 40 de 100 (40%) fueron negativos. Para las 10 muestras con una media del valor de RLU/CO al menos un 20% por debajo del valor de corte, 200 de 200 duplicados (100%) fueron negativos.

Los resultados indican que cabe esperar que las muestras con resultados alejados al menos un 20% respecto del valor de corte generen resultados coherentes. Las muestras próximas al valor de corte proporcionaron un número aproximadamente igual de resultados positivos y negativos. Estos datos demuestran que el análisis manual de muestras recogidas en STM con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA produce resultados reproducibles.

Análisis automatizado con el sistema RCS.

Se realizó un estudio para valorar la reproducibilidad intraserie, interdiaria e interlaboratorio del análisis automatizado con el sistema RCS de muestras recogidas en STM con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Se analizó un panel de 16 componentes de muestras clínicas combinadas (consulte la tabla 34 más adelante) utilizando un único lote de reactivos, dos veces al día durante 3 días diferentes. Cada miembro del panel se analizó por cuadruplicado.

Tabla 34. Reproducibilidad con muestras recogidas en STM: composición del panel de análisis automatizado con el sistema RCS

| Componente del panel | RLU/CO aproximado | Resultado previsto de la prueba |
|----------------------|---|---------------------------------|
| 1N | <0.4 | Negativo |
| 2N | 0.4–0.8 | Negativo |
| 3P | 0.8–1.2 | Negativo alto/positivo bajo |
| 4P | 0.8–1.2 | Negativo alto/positivo bajo |
| 5P | 0.8–1.2 | Negativo alto/positivo bajo |
| 6P | 1.2–2.0 | Positivo bajo |
| 7P | 1.2–2.0 | Positivo bajo |
| 8P | 1.2–2.0 | Positivo bajo |
| 9P | 2.0–5.0 | Positivo bajo |
| 10P | 5.0–10.0 | Positivo intermedio |
| 11N | <0.4 | Negativo |
| 12N | <0.4 | Negativo |
| 13N | <0.4 | Negativo |
| 14XR | Material clínico positivo para ADN del VPH de bajo riesgo en la combinación de muestras clínicas recogidas en STM negativas | Negativo alto/positivo bajo |
| 15XR | Plásmido de ADN del VPH de bajo riesgo en la combinación de muestras clínicas recogidas en STM negativas | Negativo alto/positivo bajo |
| 16XR | Control de ADN de vector plasmídico en la combinación de muestras clínicas recogidas en STM negativas | Negativo alto/positivo bajo |

Dos componentes del panel (14XR y 15XR) fueron incluidos para evaluar la posibilidad de hibridación cruzada de la mezcla de la sonda de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA con muestras que contenían únicamente los tipos de ADN del VPH de bajo riesgo 6, 11, 42, 43 y 44. El componente del panel 16XR estaba compuesto por ADN pGEM® en una concentración de 1,49 ng/ml y servía como control de vector para el componente del panel 15XR. Los resultados de este análisis no indicaron resultados positivos falsos de la prueba por la presencia de tipos de ADN del VPH de bajo riesgo en las muestras clínicas. Estos resultados concuerdan con los del análisis manual.

La reproducibilidad se calculó según el método descrito en la norma E5-A del NCCLS* (consulte la tabla 35 más adelante). Este método requiere el cálculo de componentes de varianza para

cada una de las fuentes de variabilidad: laboratorio, día, serie analítica y error (definida como variación interensayo y entre ensayos).

Tabla 35. Reproducibilidad con muestras recogidas en STM: análisis automatizado con el sistema RCS; reproducibilidad cuantitativa

| Componente del panel | n | RLU/CO medio | Desviación estándar | | | | Total | CV (%) total |
|----------------------|----|--------------|-----------------------|-------------------------|------------|--------------------|-------|--------------|
| | | | En la serie analítica | Entre series analíticas | Entre días | Entre laboratorios | | |
| 1N | 72 | 0.13 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 15.10 |
| 2N | 72 | 0.36 | 0.03 | 0.01 | 0.03 | 0* | 0.04 | 11.69 |
| 3P | 72 | 0.96 | 0.06 | 0.06 | 0.04 | 0* | 0.09 | 9.55 |
| 4P | 72 | 1.03 | 0.06 | 0.18 | 0.06 | 0* | 0.19 | 18.81 |
| 5P | 72 | 1.41 | 0.11 | 0.14 | 0.15 | 0.06 | 0.24 | 17.00 |
| 6P | 72 | 1.73 | 0.10 | 0.27 | 0* | 0.11 | 0.31 | 18.10 |
| 7P | 72 | 1.74 | 0.12 | 0.21 | 0* | 0* | 0.24 | 13.78 |
| 8P† | 70 | 1.95 | N/A‡ | N/A‡ | N/A‡ | N/A‡ | 0.47 | 23.80 |
| 9P | 72 | 5.21 | 0.34 | 0.44 | 0.21 | 0* | 0.59 | 11.36 |
| 10P | 72 | 7.67 | 0.46 | 0.63 | 0.71 | 0* | 1.05 | 13.70 |
| 11N | 72 | 0.13 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0* | 0.02 | 16.89 |
| 12N | 72 | 0.17 | 0.03 | 0.06 | 0.03 | 0* | 0.07 | 39.14 |
| 13N | 72 | 0.15 | 0.02 | 0.02 | 0* | 0.01 | 0.03 | 17.01 |

* Los componentes de varianza negativos se ajustan igual a cero.

† Dos duplicaciones no válidas correspondientes al miembro del perfil 8P descartaron el análisis de los componentes de varianza debido al diferente tamaño de los grupos comparados.

‡ N/D: análisis de la varianza imposible debido a un número menor de duplicados que otros componentes del panel.

Reproducibilidad con muestras clínicas recogidas en PreservCyt

Análisis manual.

La reproducibilidad del análisis manual de muestras recogidas en PreservCyt con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA se determinó en un estudio con 24 muestras simuladas con diversas 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 para un total de 20 duplicados por muestra. En cada uno de los 5 días del estudio, se preparó una muestra de 8 ml a partir de cada muestra simulada, conforme a las instrucciones de uso del kit *digene* HC2 Sample Conversion, y se analizó. Se calcularon la media y el IC del 95% (consulte la tabla 36 más adelante).

Tabla 36. Reproducibilidad con muestras recogidas en PreservCyt: análisis manual con preparación manual de las muestras; reproducibilidad cualitativa (orden descendente en función de la media del valor de RLU/CO)

| Identificador de la muestra | RLU/CO medio | IC del 95% | Resultado positivo del análisis (%) (n/N) |
|-----------------------------|--------------|------------|---|
| 21 | 3.51 | 3.19–3.83 | 100 (20/20) |
| 12 | 1.58 | 1.48–1.69 | 100 (20/20) |
| 13 | 1.42 | 1.32–1.52 | 100 (20/20) |
| 17 | 1.38 | 1.23–1.53 | 90 (18/20) |
| 18 | 1.36 | 1.23–1.48 | 95 (19/20) |
| 15 | 1.32 | 1.16–1.49 | 85 (17/20) |
| 23 | 1.17 | 1.06–1.27 | 75 (15/20) |
| 16 | 1.14 | 1.07–1.20 | 75 (15/20) |
| 20 | 1.10 | 0.96–1.21 | 85 (17/20) |
| 19 | 1.06 | 0.95–1.17 | 45 (9/19) |
| 22 | 1.05 | 0.99–1.10 | 70 (14/20) |
| 11 | 1.04 | 0.96–1.11 | 65 (13/20) |
| 14 | 0.94 | 0.86–1.01 | 25 (5/20) |
| 24 | 0.77 | 0.73–0.81 | 0 (0/20) |
| 3 | 0.28 | 0.25–0.30 | 0 (0/20) |
| 1 | 0.27 | 0.24–0.30 | 0 (0/20) |
| 7 | 0.27 | 0.25–0.30 | 0 (0/20) |
| 2 | 0.27 | 0.25–0.28 | 0 (0/20) |
| 5 | 0.26 | 0.24–0.28 | 0 (0/20) |
| 4 | 0.24 | 0.22–0.25 | 0 (0/20) |
| 9 | 0.23 | 0.21–0.25 | 0 (0/20) |
| 8 | 0.22 | 0.18–0.27 | 0 (0/20) |
| 10 | 0.22 | 0.20–0.25 | 0 (0/20) |
| 6 | 0.19 | 0.17–0.21 | 0 (0/20) |

Para las 6 muestras con una media del valor de RLU/CO al menos un 20% por encima del valor de corte, 114 de 120 duplicados (95,0%) fueron positivos. Para las 7 muestras con una media del valor de RLU/CO menos de un 20% por encima o por debajo del valor de corte, 88 de 139 duplicados (63,3%; IC del 95% = 54,3-70,9) fueron positivos y 51 de 139 (36,7%) fueron negativos. Para las 4 muestras con un valor menos de un 10% por encima o por debajo del valor de corte, 41 de los 79 duplicados (51,9%) fueron positivos y 38 de los 79 duplicados (48,1%)

fueron negativos. Para las 11 muestras con una media del valor de RLU/CO al menos un 20% por debajo del valor de corte, 220 de 220 duplicados (100%) fueron negativos.

Los resultados indican que cabe esperar que las muestras con resultados alejados al menos un 20% respecto del valor de corte generen resultados coherentes. Las muestras próximas al valor de corte proporcionaron un número aproximadamente igual de resultados positivos y negativos. Estos datos demuestran que el análisis manual de muestras recogidas en PreservCyt con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA produce resultados reproducibles.

Análisis automatizado con el sistema RCS con preparación manual de las muestras.

Se realizó un estudio interno del análisis automatizado con el sistema RCS con muestras clínicas recogidas en PreservCyt, obtenidas principalmente de mujeres con un resultado de ASC-US o de grado mayor en la citología (prevalencia del VPH del 57%). Las muestras se dividieron en 2 porciones iguales; a continuación, cada porción se procesó individualmente con el kit *digene* HC2 Sample Conversion y se analizó por duplicado con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Como con otras pruebas cualitativas de diagnóstico *in vitro*, la variabilidad de los resultados de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA obtenidos con muestras clínicas se asocia principalmente a uno de los siguientes factores o a una combinación de ellos: recogida de la muestra, preparación de la muestra y procedimiento de análisis. Debido a que los resultados del análisis comparados se obtuvieron de la misma muestra clínica, el diseño experimental controló la variabilidad debida a la recogida de las muestras. La repetibilidad de los resultados obtenidos de 2 porciones iguales de muestras preparadas individualmente a partir de la misma muestra clínica (denominada más adelante repetibilidad “entre porciones iguales preparadas”) refleja la variación debida a la combinación de la preparación de la muestra y del procedimiento de análisis. La repetibilidad de los resultados obtenidos a partir de la misma porción de la muestra (denominada más adelante repetibilidad “en la porción preparada”) refleja la variación debida únicamente al procedimiento de análisis (consulte la tabla 37 más adelante).

Tabla 37. Reproducibilidad con muestras recogidas en PreservCyt: análisis automatizado con el sistema RCS con preparación manual de las muestras; reproducibilidad cualitativa.

| Análisis | Concordancia positiva (%) | Concordancia negativa (%) | Concordancia global (%) | |
|---|--|---------------------------|-------------------------|-------------------|
| | (n/N) | (n/N) | (n/N) | |
| | IC del 95% | IC del 95% | IC del 95% | |
| En la porción preparada | Todos los datos | 99.62 (261/262) | 94.7 (160/169) | 97.7 (421/431) |
| | | 97.9–100.0 | 90.1–97.5 | 95.8–98.9 |
| | Regiones de positivos altos y de negativos altos | 100.0 (249/249) | 98.2 (160/163) | 99.3 (409/412) |
| | 98.5–100.0 | 94.7–99.6 | 97.9–99.9 | |
| Entre porciones iguales preparadas | Todos los datos | 99.6 (264/265) | 98.2 (163/166) | 99.1 (427/431) |
| | | 97.9–100.0 | 94.8–99.6 | 97.6–99.8 |
| | Regiones de positivos altos y de negativos altos | 100.0 (249/249) | 99.4 (161/162) | 99.8 (410/411) |
| | 98.5–100.0 | 96.6–100.0 | 98.7–100.0 | |

Se llevó a cabo otro estudio para evaluar la reproducibilidad cuantitativa de los resultados obtenidos con el análisis automatizado con el sistema RCS de muestras recogidas en PreservCyt simuladas. En el estudio participaron tres centros de análisis, entre los cuales se encontraba QIAGEN.

Cada laboratorio de análisis realizó el análisis automatizado con el sistema RCS y el análisis manual de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA dos veces al día durante 5 días diferentes con un panel de reproducibilidad de 6 componentes suministrado. Cada componente del panel estaba formado por células cultivadas agregadas a la solución PreservCyt con el fin de obtener un valor de RLU/CO aproximado (consulte la tabla 38 más adelante).

Los componentes del panel con positividad para el ADN del VPH se prepararon añadiendo diversas cantidades de células SiHa con positividad para el ADN del VPH (de una línea de células de laboratorio). El componente negativo del panel estaba compuesto por células JurKat VPH– (de una línea de células de laboratorio diferente). La concentración celular final de los 6 componentes del panel fue de aproximadamente 5×10^4 células/ml.

Tabla 38. Reproducibilidad con muestras recogidas en PreservCyt: análisis automatizado con el sistema RCS con preparación manual de las muestras; componentes del panel de reproducibilidad cuantitativa.

| Componente del panel | Tipo de célula | RLU/CO aproximado | Resultado esperado |
|----------------------|----------------|-------------------|---------------------|
| 1N | Jurkat | <1.0 | Negativo |
| 2N | Jurkat | <1.0 | Negativo |
| 3P | SiHa y Jurkat | 5.0–8.0 | Positivo bajo |
| 4P | SiHa y Jurkat | 5.0–8.0 | Positivo bajo |
| 5P | SiHa | 30.0–50.0 | Positivo intermedio |
| 6P | SiHa | 200.0 | Positivo alto |

La reproducibilidad se calculó según el método descrito en la norma E5-A del NCCLS* (consulte la tabla 38 más adelante). Este método requiere el cálculo de componentes de varianza para cada una de las fuentes de variabilidad: laboratorio, día, serie analítica y error (definida como variación interensayo y entre ensayos). Cada uno de los 6 componentes del panel se analizó por cuadruplicado en cada una de las 10 series analíticas (2 series analíticas por día durante 5 días de análisis) en cada uno de los 3 laboratorios de análisis.

Tabla 39. Reproducibilidad con muestras recogidas en PreservCyt: análisis automatizado con el sistema RCS con preparación manual de las muestras; reproducibilidad cuantitativa

| Componente del panel | n | RLU/CO medio | Desviación estándar | | | | Total | CV (%) total |
|----------------------|-----|--------------|-----------------------|-------------------------|------------|--------------------|-------|--------------|
| | | | En la serie analítica | Entre series analíticas | Entre días | Entre laboratorios | | |
| 1N | 120 | 0.20 | 0.04 | 0.01 | 0.01 | 0.08 | 0.089 | 44.4 |
| 2N | 120 | 0.20 | 0.06 | 0.01 | 0* | 0.08 | 0.10 | 52.2 |
| 3P | 120 | 4.05 | 0.76 | 1.17 | 0* | 0.26 | 1.42 | 35.1 |
| 4P | 120 | 4.23 | 0.74 | 0.86 | 0* | 0.31 | 1.18 | 27.8 |
| 5P | 120 | 28.6 | 5.00 | 5.61 | 4.41 | 0* | 8.71 | 30.5 |
| 6P | 120 | 214.6 | 33.95 | 27.25 | 18.09 | 25.53 | 53.61 | 25.0 |

* Los componentes de varianza negativos se ajustan igual a cero.

Para complementar este estudio de reproducibilidad inicial con datos procedentes de muestras muy cercanas al valor de corte del ensayo, se realizó en un centro externo a QIAGEN un estudio de precisión adicional con el RCS.

El panel estaba formado por 1 componente negativo, 2 componentes negativos o positivos bajos y 2 componentes positivos bajos. Cada componente del panel se preparó agregando células Jurkat y SiHa cultivadas a la solución PreservCyt para obtener los valores diana de RLU/CO (consulte la tabla 40 más adelante).

Este centro externo realizó el análisis automatizado con el sistema RCS con un único lote de reactivos de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA para cada serie analítica, realizando el análisis 2 veces al día durante 3 días diferentes con un panel de 5 componentes suministrado de muestras recogidas en PreservCyt simuladas. Cada componente del panel se dividió en 4 muestras, y las 4 muestras se analizaron en la misma microplaca (consulte la tabla 41 más adelante).

Tabla 40. Reproducibilidad con muestras recogidas en PreservCyt: análisis automatizado con el sistema RCS con preparación manual de las muestras; reproducibilidad cuantitativa próxima a los componentes del perfil del valor de corte del ensayo.

| Componente del panel | Valor de RLU/CO aproximado | Resultado esperado |
|----------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 1N | 0.2 | Negativo |
| 2N | 0.8–1.2 | Negativo alto/positivo bajo |
| 3P | 0.8–1.2 | Negativo alto/positivo bajo |
| 4P | 1.2–2.0 | Positivo bajo |
| 5P | 1.2–2.0 | Positivo bajo |

Tabla 41. Reproducibilidad con muestras recogidas en PreservCyt: análisis automatizado con el sistema RCS con preparación manual de las muestras; reproducibilidad cuantitativa próxima al valor de corte del ensayo.

| Componente del panel | n | RLU/CO medio | Desviación estándar | | | | Total | Total CV (%) |
|----------------------|----|--------------|-----------------------|-------------------------|------------|-------|-------|--------------|
| | | | En la serie analítica | Entre series analíticas | Entre días | Total | | |
| 1N | 24 | 0.14 | 0.01 | 0* | 0.02 | 0.02 | 15.12 | |
| 2N | 24 | 1.39 | 0.14 | 0.15 | 0* | 0.21 | 14.84 | |
| 3P | 24 | 1.31 | 0.16 | 0* | 0.11 | 0.19 | 14.70 | |
| 4P | 24 | 1.74 | 0.13 | 0.21 | 0.18 | 0.31 | 17.73 | |
| 5P | 24 | 1.63 | 0.24 | 0.20 | 0.26 | 0.40 | 24.63 | |

* Los componentes de varianza negativos se ajustan igual a cero.

Preparación de las muestras con el kit QIASymphony DSP HPV Media.

Se hizo un estudio interno de preparación de muestras con ayuda del kit QIASymphony DSP HPV Media, con muestras recogidas en PreservCyt obtenidas de mujeres con uno de los dos siguientes resultados de la citología:

- ASC-US o superior a ASC-US;
- negativo para lesión intraepitelial o neoplasia maligna (NILM).

Se obtuvieron dos muestras de cada muestra clínica. Cada muestra se preparó individualmente con ayuda del kit QIASymphony DSP HPV Media y los resultados se determinaron mediante análisis automatizado con el sistema RCS, con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Como con otras pruebas cualitativas de diagnóstico *in vitro*, la variabilidad de los resultados de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA obtenidos con muestras clínicas se asocia principalmente a uno de los siguientes factores o a una combinación de ellos: recogida de la muestra, preparación de la muestra y procedimiento de análisis. Debido a que los resultados del análisis comparados se obtuvieron de la misma muestra clínica (denominada "entre muestras"), el diseño experimental controló la variabilidad debida a la recogida de las muestras. La reproducibilidad de los resultados (consulte la tabla 42 más adelante) obtenidos de 2 muestras preparadas de forma individual a partir de la misma muestra clínica reflejan la variación debida a la preparación de las muestras y al procedimiento de análisis.

Tabla 42. Reproducibilidad de las muestras recogidas en PreservCyt: preparación de las muestras con ayuda del kit QIASymphony DSP HPV Media; reproducibilidad cualitativa entre muestras

| Concordancia positiva (%) | Concordancia negativa (%) | Concordancia global (%) |
|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
| (n/N) | (n/N) | (n/N) |
| IC del 95% | IC del 95% | IC del 95% |
| 99.0 | 96.4 | 97.3 |
| (95/96) | (161/167) | (256/263) |
| 94.3–99.8 | 92.4–98.3 | 94.6–98.7 |

Se llevó a cabo otro estudio para evaluar la reproducibilidad de los resultados con muestras recogidas en PreservCyt simuladas. Tras la preparación de las muestras con el kit QIASymphony DSP HPV Media, se hizo un análisis automatizado con el sistema RCS, con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Los ocho componentes positivos del perfil se prepararon mediante la adición de células SiHa o HeLa positivas para el ADN del VPH, a células C-33 A negativas para el ADN del VPH, mientras que los dos componentes del perfil negativo para el ADN del VPH contenían solamente células C-33 A negativas para el ADN del VPH.

Tres usuarios distintos efectuaron el análisis en un solo día, con ayuda de tres instrumentos QIASymphony SP distintos y tres lotes del kit QIASymphony DSP HPV Media, con componentes 2N, 3E, 5P, 7P y 9P del perfil. Los componentes 2N, 3E, 5P y 7P del perfil se analizaron con 18 repeticiones, en tres series analíticas distintas, que dieron 54 datos por cada componente del perfil. El componente 9P del perfil se analizó con 16 repeticiones en tres series analíticas distintas, que dieron 48 datos.

Un usuario efectuó la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA en tres días distintos, con tres instrumentos QIASymphony SP distintos y un lote de kit QIASymphony DSP HPV Media con los componentes 1N, 4E, 6P, 8P y 10P del perfil. Se analizaron los componentes 1N, 3E, 5P y 7P del perfil en 18 repeticiones de 8 series analíticas, que dieron 144 datos por cada componente del perfil. El componente 10P del perfil se analizó con 16 repeticiones en ocho series analíticas distintas, que dieron 128 datos.

Entre los componentes del panel con una media del valor de RLU/CO al menos un 20% superior al valor de corte, 572 de 572 (100,0%) fueron positivos. Entre los componentes del perfil con una media del valor de RLU/CO hasta un 20% superior o inferior al valor de corte, 98 de 198 (49,5%) fueron positivos y 100 de 198 (50,5%) fueron negativos. Entre los componentes del perfil con una media del valor de RLU/CO hasta un 20% inferior al valor de corte, 198 de 198 (100,0%) fueron negativos (consulte la tabla 43, a continuación).

Tabla 43. Reproducibilidad de las muestras recogidas en PreservCyt: preparación de las muestras con ayuda del kit QIASymphony DSP HPV Media; reproducibilidad cualitativa

| Componente del panel | Tipo de célula | RLU/CO medio | Desviación estándar | Resultado positivo del análisis (%) (n/N) |
|----------------------|----------------|--------------|---------------------|---|
| 1N | C-33 A | 0.37 | 0.05 | 0 (0/144) |
| 2N | C-33 A | 0.41 | 0.06 | 0 (0/54) |
| 3E | HeLa y C-33 A | 0.81 | 0.11 | 6 (3/54) |
| 4E | SiHa y C-33 A | 1.09 | 0.18 | 66 (95/144) |
| 5P | HeLa y C-33 A | 3.17 | 0.46 | 100 (54/54) |
| 6P | SiHa y C-33 A | 4.81 | 0.74 | 100 (144/144) |
| 7P | HeLa y C-33 A | 6.77 | 0.97 | 100 (54/54) |
| 8P | SiHa y C-33 A | 9.41 | 1.39 | 100 (144/144) |
| 9P | HeLa y C-33 A | 13.72 | 2.81 | 100 (48/48) |
| 10P | SiHa y C-33 A | 28.13 | 5.08 | 100 (128/128) |

Los resultados indican que cabe esperar que las muestras con resultados alejados al menos un 20% respecto del valor de corte generen resultados coherentes. Las muestras próximas al valor

de corte proporcionaron un número aproximadamente igual de resultados positivos y negativos. Estos datos demuestran que la preparación de muestras recogidas en PreservCyt, con ayuda del kit QIASymphony DSP HPV Media, seguida del análisis con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, produce resultados reproducibles.

Se usaron también los resultados del estudio interno para evaluar la reproducibilidad cuantitativa de los resultados obtenidos con la preparación de muestras recogidas en PreservCyt, con ayuda del kit QIASymphony DSP HPV Media (consulte las tablas 44 y 45 continuación)..

Tabla 44. Reproducibilidad de las muestras recogidas en PreservCyt: preparación de las muestras con ayuda del kit QIASymphony DSP HPV Media; reproducibilidad con el mismo usuario

| Componente del panel | n | RLU/CO medio | Desviación estándar | | | Desviación estándar total estimada | CV estimado total (%) |
|----------------------|-----|--------------|-----------------------|-------------------------|----------------------|------------------------------------|-----------------------|
| | | | En la serie analítica | Entre series analíticas | Entre combinaciones* | | |
| 1N | 144 | 0.37 | 0.04 | 0.03 | 0.03 | 0.06 | 14.92 |
| 4E | 144 | 1.09 | 0.12 | 0.11 | 0.09 | 0.19 | 17.24 |
| 6P | 144 | 4.81 | 0.49 | 0.40 | 0.42 | 0.77 | 15.92 |
| 8P | 144 | 9.41 | 0.96 | 0.97 | 0.46 | 1.44 | 15.32 |
| 10P | 128 | 28.13 | 4.00 | 2.04 | 2.54 | 5.16 | 18.35 |

*Entre combinaciones de instrumentos QIASymphony SP y días distintos.

Tabla 45. Reproducibilidad de las muestras recogidas en PreservCyt: preparación de las muestras con ayuda del kit QIASymphony DSP HPV Media; reproducibilidad en el mismo día

| Componente del panel | n | RLU/CO medio | Desviación estándar | | Desviación estándar total estimada | CV estimado total (%) |
|----------------------|----|--------------|-----------------------|--------------------------------------|------------------------------------|-----------------------|
| | | | En la serie analítica | Entre series analíticas [†] | | |
| 2N | 54 | 0.41 | 0.04 | 0.05 | 0.06 | 15.86 |
| 3E | 54 | 0.81 | 0.08 | 0.08 | 0.12 | 14.48 |
| 5P | 54 | 3.17 | 0.38 | 0.33 | 0.50 | 15.72 |
| 7P | 54 | 6.77 | 0.92 | 0.38 | 1.00 | 14.73 |
| 9P | 48 | 13.72 | 2.64 | 1.15 | 2.88 | 21.01 |

[†] Una serie analítica consiste en una combinación de un kit QIASymphony DSP HPV Media, un instrumento QIASymphony SP y un usuario.

The quantitative reproducibility is very high as indicated by all CV values remaining below 25%. Standard deviations between runs are comparable to the corresponding value within runs, which indicates consistent results regardless of the instrument or kit lot used.

La reproducibilidad cuantitativa es muy alta, como se indica por todos los valores de la CV que se mantienen inferiores al 25%. Las desviaciones estándar entre series analíticas son comparables al correspondiente valor dentro de las series analíticas, lo que indica unos resultados uniformes, con independencia del instrumento o del lote de kit usado.

Preparación de las muestras con el kit QIASymphony DSP AXpH DNA.

Se hizo un estudio interno de preparación de muestras con ayuda del kit QIASymphony DSP AXpH DNA, con muestras recogidas en PreservCyt obtenidas de mujeres con uno de los dos siguientes resultados de la citología: Se obtuvieron dos muestras de cada muestra clínica. Cada muestra se preparó individualmente con ayuda del kit QIASymphony DSP HPV Media y los resultados se determinaron mediante análisis automatizado con el sistema RCS, con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Como con otras pruebas cualitativas de diagnóstico *in vitro*, la variabilidad de los resultados de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA obtenidos con muestras clínicas se asocia principalmente a uno de los siguientes factores o a una combinación de ellos: recogida de la muestra, preparación de la muestra y procedimiento de análisis. Debido a que los resultados del análisis comparados se obtuvieron de la misma muestra clínica (denominada “entre muestras”), el diseño experimental controló la variabilidad debida a la recogida de las muestras. La reproducibilidad de los resultados (consulte la tabla 46 más adelante) obtenidos de 2 muestras preparadas de forma individual a partir de la misma muestra clínica reflejan la variación debida a la preparación de las muestras y al procedimiento de análisis.

Tabla 46. Reproducibilidad de las muestras recogidas en PreservCyt: preparación de las muestras con ayuda del kit QIASymphony DSP AXpH DNA; reproducibilidad cualitativa entre muestras

| Concordancia positiva (%) (n/N) IC del 95% | Concordancia negativa (%) (n/N) IC del 95% | Concordancia global (%) (n/N) IC del 95% |
|--|--|--|
| 95.3 (101/106) 89.4–98.0 | 96.7 (176/182) 92.3–98.5 | 96.2 (277/288) 93.3–97.9 |

Se llevó a cabo otro estudio para evaluar la reproducibilidad de los resultados con muestras recogidas en PreservCyt simuladas. Tras la preparación de las muestras con el kit QIASymphony DSP AXpH DNA, se hizo un análisis automatizado con el sistema RCS, con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Tres usuarios distintos efectuaron la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA en días distintos, utilizando diferentes instrumentos y distintos lotes de reactivos con un perfil de 9 componentes.

Cada componente del panel se analizó por duplicado en 24 series analíticas diferentes, que proporcionaron 48 puntos de datos para cada componente del panel. Los ocho componentes positivos del perfil se prepararon mediante la adición de células SiHa o HeLa positivas para el ADN del VPH, a células H9 negativas para el ADN del VPH, en solución PreservCyt, mientras que los dos componentes del perfil negativo para el ADN del VPH contenían solamente células H9 negativas para el ADN del VPH.

Entre los componentes del perfil con una media del valor de RLU/CO al menos un 20% superior al valor de corte, 237 de 240 (98,8%) fueron positivos. Entre los componentes del perfil con una media del valor de RLU/CO hasta un 20% superior o inferior al valor de corte, 95 de 144 (66,0%) fueron positivos y 49 de 144 (34,0%) fueron negativos. Entre los componentes del perfil con una media del valor de RLU/CO hasta un 20% inferior al valor de corte, 48 de 48 (100,0%) fueron negativos (consulte la tabla 47, a continuación).

Tabla 47. Reproducibilidad de las muestras recogidas en PreservCyt: preparación de las muestras con ayuda del kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA; reproducibilidad cualitativa

| Componente del panel | Tipo de célula | RLU/CO medio | Desviación estándar | Resultado positivo del análisis (%) (n/N) |
|----------------------|----------------|--------------|---------------------|---|
| 1N | H9 | 0.17 | 0.03 | 0 (0/48) |
| 2E | H9 y HeLa | 1.00 | 0.16 | 56 (27/48) |
| 3E | H9 y HeLa | 1.16 | 0.57 | 54 (26/48) |
| 4E | H9 y SiHa | 1.18 | 0.23 | 88 (42/48) |
| 5P | H9 y SiHa | 1.89 | 0.20 | 100 (48/48) |
| 6P | H9 y HeLa | 2.05 | 0.43 | 96 (46/48) |
| 7P | H9 y SiHa | 2.97 | 0.45 | 100 (48/48) |
| 8P | H9 y HeLa | 5.67 | 0.61 | 100 (48/48) |
| 9P | H9 y SiHa | 9.91 | 1.63 | 98 (47/48) |

Los resultados indican que cabe esperar que las muestras con resultados alejados al menos un 20% respecto del valor de corte generen resultados coherentes. Las muestras próximas al valor de corte proporcionaron un número aproximadamente igual de resultados positivos y negativos. Estos datos demuestran que la preparación de muestras recogidas en PreservCyt, con ayuda del kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA, seguida del análisis con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, produce resultados reproducibles.

Se usaron también los resultados del estudio interno para evaluar la reproducibilidad cuantitativa de los resultados obtenidos con la preparación de muestras recogidas en PreservCyt, con ayuda del kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA (consulte la tabla 48, a continuación).

Tabla 48. Reproducibilidad de las muestras recogidas en PreservCyt: preparación de las muestras con ayuda del kit QIASymphony DSP AXpH DNA; reproducibilidad cuantitativa

| Componente del panel | n | RLU/CO medio | Desviación estándar | | | Desviación estándar total estimada | CV estimado total (%) |
|----------------------|----|--------------|-----------------------|-------------------------|----------------------|------------------------------------|-----------------------|
| | | | En la serie analítica | Entre series analíticas | Entre combinaciones* | | |
| 1N | 48 | 0.17 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 0.03 | 18.13 |
| 2E | 48 | 1.00 | 0.14 | 0.05 | 0.06 | 0.16 | 16.20 |
| 3E | 48 | 1.16 | 0.48 | 0.22 | 0.23 | 0.57 | 49.27 |
| 4E | 48 | 1.18 | 0.16 | 0.14 | 0.10 | 0.23 | 19.63 |
| 5P | 48 | 1.89 | 0.09 | 0.09 | 0.16 | 0.20 | 10.63 |
| 6P | 48 | 2.05 | 0.18 | 0.34 | 0.19 | 0.43 | 20.83 |
| 7P | 48 | 2.97 | 0.27 | 0.23 | 0.28 | 0.45 | 15.14 |
| 8P | 48 | 5.67 | 0.35 | 0.44 | 0.24 | 0.61 | 10.85 |
| 9P | 48 | 9.91 | 1.36 | 0.55 | 0.71 | 1.63 | 16.42 |

*Entre combinaciones de kits *de análisis digene* HC2 High-Risk HPV DNA, kits QIASymphony DSP AXpH DNA, RCS usado, QIASymphony SP usado y usuario.

Reproducibilidad con muestras clínicas recogidas en SurePath

Análisis manual

La reproducibilidad del análisis manual de muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA se determinó en un estudio en el que se utilizaron 3 laboratorios diferentes. Los componentes del perfil se analizaron utilizando un valor de corte de 1,0 RLU/CO en días diferentes y con diferentes series analíticas utilizando un conjunto idéntico de componentes de estado VPH+ o VPH- conocido. El perfil estaba formado por 5 componentes positivos, 2 componentes negativos altos/positivos bajos y 5 componentes negativos.

Cada componente del panel se preparó combinando muestras clínicas únicas recogidas en solución conservante SurePath con un estado VPH+ o VPH- conocido para obtener los valores diana de RLU/CO deseados. Cada componente del panel se analizó por duplicado, dos veces al día, durante un período de 5 días, en cada uno de los 3 laboratorios participantes (consulte la tabla 49 más adelante).

Tabla 49. Reproducibilidad con muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath: análisis manual; reproducibilidad cualitativa.

| Componente del panel | RLU/CO medio | Resultado positivo del análisis (%) (n/N) |
|----------------------|--------------|--|
| 1 | 0.20 | 0.0 (0/60) |
| 2 | 0.21 | 0.0 (0/60) |
| 3 | 0.22 | 0.0 (0/60) |
| 4 | 0.28 | 3.3 (2/60) |
| 5 | 0.36 | 3.3 (2/60) |
| 6 | 0.83 | 21.7 (13/60) |
| 7 | 1.17 | 43.3 (26/60) |
| 8 | 19.47 | 100.0 (60/60) |
| 9 | 25.65 | 100.0 (60/60) |
| 10 | 81.52 | 100.0 (60/60) |
| 11 | 154.18 | 100.0 (60/60) |
| 12 | 765.29 | 100.0 (60/60) |

Análisis automatizado con el sistema RCS

Se comparó la reproducibilidad de los resultados obtenidos con muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath con el análisis automatizado con el sistema RCS con la de los resultados obtenidos con el análisis manual. Se analizaron dos porciones iguales independientes de la misma muestra de sedimento celular de posgradiente con SurePath procesada (a partir de la misma muestra clínica) (consulte la tabla 50 a continuación).

Tabla 50. Reproducibilidad con muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath: análisis automatizado con el sistema RCS; concordancia de los resultados entre el análisis automatizado con el sistema RCS y el análisis manual.

| Concordancia positiva (%) (n/N) IC del 95% | | Concordancia negativa (%) (n/N) IC del 95% | |
|--|--|--|--|
| Todos los positivos | Región de positivos altos (RLU/CO \geq 2,5) | Todos los negativos | Región de negativos altos (RLU/CO $<$ 0,80) |
| 99.0 (417/421) 97.6–99.7 | 100.0 (375/375) 99.0–100.0 | 97.7 (1057/1079) 96.9–98.75 | 98.7 (1050/1064) 97.8–99.28 |

Preparación de las muestras recogidas en SurePath con el kit QIASymphony DSP HPV Media

Se llevó a cabo un estudio para evaluar la reproducibilidad de los resultados con muestras recogidas en SurePath simuladas. Tras la preparación de las muestras con el kit QIASymphony DSP HPV Media, se hizo un análisis automatizado con el sistema RCS, con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Los cuatro componentes positivos del perfil se prepararon mediante la adición de células SiHa positivas para el ADN del VPH, a células H9 negativas para el ADN del VPH, en solución SurePath, mientras que el componente del perfil negativo para el ADN del VPH contenía solamente células H9 negativas para el ADN del VPH.

Tres usuarios distintos efectuaron el análisis en seis días distintos, con ayuda de tres instrumentos QIASymphony SP distintos y tres lotes distintos del kit QIASymphony DSP HPV Media, con componentes 1N, 2E, 3P, 4P y 5P del perfil. Los componentes 1N, 2E, 3P y 4P del perfil se analizaron con 18 repeticiones en 37 series analíticas distintas, que dieron 666 datos correspondientes a los componentes 2E y 3P del perfil, y 665 datos correspondientes a los componentes 1N y 4P del perfil. El componente 5P del perfil se analizó con 16 repeticiones en 37 series analíticas distintas, que dieron 590 datos. Se excluyeron cuatro datos debido a un volumen insuficiente, como indicó el QIASymphony SP durante la preparación de las muestras.

Entre los componentes del panel con una media del valor de RLU/CO al menos un 20% superior al valor de corte, 1921 de 1921 (100,0%) fueron positivos. Entre los componentes del perfil con una media del valor de RLU/CO hasta un 20% superior o inferior al valor de corte, 410 de 666 (61,6%) fueron positivos y 256 de 666 (38,4%) fueron negativos. Entre los componentes del perfil con una media del valor de RLU/CO hasta un 20% inferior al valor de corte, 664 de 665 (99,8%) fueron negativos (consulte la tabla 51, a continuación).

Tabla 51. Reproducibilidad de las muestras recogidas en SurePath: preparación de las muestras con ayuda del kit QIASymphony DSP HPV Media; reproducibilidad cualitativa

| Componente del panel | Tipo de célula | RLU/CO medio | Desviación estándar | Resultado positivo del análisis (%) (n/N) |
|----------------------|----------------|--------------|---------------------|---|
| 1N | H-9 | 0.38 | 0.06 | 0.2 (1/665) |
| 2E | SiHa y H-9 | 1.06 | 0.17 | 61.6 (410/666) |
| 3P | SiHa y H-9 | 4.51 | 0.78 | 100.0 (666/666) |
| 4P | SiHa y H-9 | 8.34 | 1.57 | 100.0 (665/665) |
| 5P | SiHa y H-9 | 24.69 | 5.12 | 100.0 (590/590) |

Los resultados indican que cabe esperar que las muestras recogidas en SurePath con resultados alejados al menos un 20% respecto del valor de corte generen resultados coherentes. Las muestras recogidas en SurePath próximas al valor de corte proporcionaron un número

aproximadamente igual de resultados positivos y negativos. Estos datos demuestran que la preparación de muestras recogidas en PreservCyt, con ayuda del kit QIASymphony DSP HPV Media, seguida del análisis con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, produce resultados reproducibles.

Se usaron también los resultados del estudio interno para evaluar la reproducibilidad cuantitativa de los resultados obtenidos con la preparación de muestras recogidas en PreservCyt, con ayuda del kit QIASymphony DSP AXpH DNA (consulte la tabla 51, a continuación).

Tres usuarios distintos efectuaron el análisis en seis días distintos, con ayuda de tres instrumentos QIASymphony SP distintos y tres lotes distintos del kit QIASymphony DSP HPV Media, con componentes 1N, 2E, 3P, 4P y 5P del perfil. Se analizaron los componentes 1N, 2E, 3P y 4P del perfil en 18 repeticiones, que dieron 162 datos por cada componente del perfil. El componente 5P del perfil se analizó con 16 repeticiones, lo que dio 144 datos (véase la tabla 52, a continuación).

Tabla 52. Reproducibilidad de las muestras recogidas en SurePath: preparación de las muestras con ayuda del kit QIASymphony DSP HPV Media; reproducibilidad cuantitativa

| Componente del panel | n | RLU/CO medio | Desviación estándar | | | Desviación estándar total estimada | CV estimado total (%) |
|----------------------|-----|--------------|-----------------------|------------|----------------------|------------------------------------|-----------------------|
| | | | En la serie analítica | Entre días | Entre combinaciones* | | |
| 1N | 162 | 0.37 | 0.06 | 0.02 | 0.03 | 0.07 | 19.18 |
| 2E | 162 | 1.05 | 0.14 | 0.07 | 0.10 | 0.18 | 17.41 |
| 3P | 162 | 4.40 | 0.62 | 0.00 | 0.43 | 0.75 | 17.09 |
| 4P | 162 | 8.24 | 1.15 | 1.01 | 1.34 | 1.77 | 21.42 |
| 5P | 144 | 23.89 | 3.95 | 4.10 | 4.67 | 6.11 | 25.59 |

* Una serie analítica consiste en una combinación de un kit QIASymphony DSP HPV Media, un instrumento QIASymphony SP y un usuario, en un día concreto.

La reproducibilidad cuantitativa es muy alta, como se indica por todos los valores de la CV que se mantienen inferiores al 26%. Las desviaciones estándar entre series analíticas son comparables al correspondiente valor dentro de las series analíticas, lo que indica unos resultados uniformes, con independencia del instrumento o del lote de kit usado.

Preparación de muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath con el kit QIASymphony DSP HPV Media

Se llevó a cabo un estudio para evaluar la reproducibilidad de los resultados obtenidos con muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath simuladas. Tras la preparación de

las muestras con el kit QIASymphony DSP HPV Media se realizó un análisis automatizado con el sistema RCS con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Se utilizó material de cultivo celular en solución conservante SurePath al 70% para simular muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath. Los cuatro componentes positivos del perfil se prepararon mediante la adición de células SiHa positivas para el ADN del VPH a células H9 negativas para el ADN del VPH en solución conservante SurePath, mientras que el componente del perfil negativo para el ADN del VPH contenía solamente células H9 negativas para el ADN del VPH en solución conservante SurePath.

Cuatro usuarios distintos efectuaron el análisis en 6 días distintos con 3 instrumentos QIASymphony SP distintos y 3 lotes distintos del kit QIASymphony DSP HPV Media, con los componentes 1, 2, 3, 4 y 5 del perfil. Los componentes 1, 2, 3 y 4 del perfil se analizaron con 18 repeticiones en 37 series analíticas distintas, que dieron 666 datos correspondientes a los componentes 1 y 3 del perfil y 665 datos correspondientes a los componentes 2 y 4 del perfil. Se excluyeron dos datos debido a un volumen insuficiente, marcado por el QIASymphony SP durante la preparación de las muestras. El componente 5 del perfil se analizó con 16 repeticiones en 37 series analíticas distintas, que dieron 592 datos.

Entre los componentes del perfil con una media del valor de RLU/CO al menos un 20% superior al valor de corte, 1.923 de 1.923 (100,0%) fueron positivos. Entre los componentes del perfil con una media del valor de RLU/CO hasta un 20% superior o inferior al valor de corte, 416 de 665 (62,6%) fueron positivos y 249 de 665 (37,4%) fueron negativos. Entre los componentes del perfil con una media del valor de RLU/CO al menos un 20% inferior al valor de corte, 666 de 666 (100%) fueron negativos (consulte la tabla 53 a continuación).

Tabla 53. Reproducibilidad de las muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath: preparación de las muestras con el kit QIASymphony DSP HPV Media; reproducibilidad cualitativa.

| Componente del perfil | Tipo de célula | Valor medio de RLU/CO | Desviación estándar | CV (%) | Resultado positivo del análisis (%) (n/N) |
|-----------------------|----------------|-----------------------|---------------------|--------|---|
| 1 | H-9 | 0,12 | 0,02 | 18,77 | 0,0 (0/666) |
| 2 | SiHa y H-9 | 0,96 | 0,11 | 11,15 | 62,6 (416/665) |
| 3 | SiHa y H-9 | 4,72 | 0,56 | 11,89 | 100,0 (666/666) |
| 4 | SiHa y H-9 | 9,34 | 0,98 | 10,46 | 100,0 (665/665) |
| 5 | SiHa y H-9 | 24,9 | 3,37 | 13,55 | 100,0 (592/592) |

Los resultados indican que cabe esperar que las muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath con resultados alejados al menos un 20% respecto del valor de corte generen

resultados coherentes. Las muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath próximas al valor de corte proporcionaron un número aproximadamente igual de resultados positivos y negativos. Estos datos demuestran que la preparación de muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath con el kit QIASymphony DSP HPV Media, seguida del análisis con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, produce resultados reproducibles.

Se usaron también los resultados del estudio interno para evaluar la reproducibilidad cuantitativa de los resultados obtenidos con la preparación de muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath con el kit QIASymphony DSP HPV Media.

Cuatro usuarios distintos efectuaron el análisis en 6 días distintos con 3 instrumentos QIASymphony SP distintos y 3 lotes distintos del kit QIASymphony DSP HPV Media, con los componentes 1, 2, 3, 4 y 5 del perfil. Se analizaron los componentes 1, 2, 3 y 4 del perfil con 18 repeticiones, que dieron 162 datos por cada componente del perfil. El componente 5 del perfil se analizó con 16 repeticiones, lo que dio 144 datos (consulte la tabla 54 a continuación).

Tabla 54. Reproducibilidad de las muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath: preparación de las muestras con el kit QIASymphony DSP HPV Media; reproducibilidad cuantitativa.

| Componente del perfil | n | Valor medio de RLU/CO | Desviación estándar | | | Desviación estándar total estimada | CV estimado total (%) |
|-----------------------|-----|-----------------------|-----------------------|------------|----------------------|------------------------------------|-----------------------|
| | | | En la serie analítica | Entre días | Entre combinaciones* | | |
| 1 | 162 | 0,12 | 0,02 | 0,00 | 0,01 | 0,02 | 19,80 |
| 2 | 162 | 1,00 | 0,08 | 0,02 | 0,06 | 0,10 | 10,27 |
| 3 | 162 | 4,99 | 0,37 | 0,13 | 0,38 | 0,55 | 11,00 |
| 4 | 162 | 9,78 | 0,61 | 0,23 | 0,54 | 0,85 | 8,72 |
| 5 | 144 | 26,40 | 2,19 | 0,70 | 1,51 | 2,75 | 10,41 |

* Entre combinaciones de días, usuarios, lotes del kit QIASymphony DSP HPV Media e instrumentos QIASymphony SP diferentes.

La reproducibilidad cuantitativa es muy alta, como indica el hecho de que todos los valores de CV se mantienen por debajo del 20%. Las desviaciones estándar entre series analíticas son comparables al correspondiente valor dentro de las series analíticas, lo que indica unos resultados uniformes con independencia del instrumento o del lote de kit usado.

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 la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Todos los microorganismos se analizaron a concentraciones de 1×10^5 a 1×10^7 microorganismos por mililitro. Se analizó ADN purificado de virus y plásmidos a una concentración de 4 ng/ml.

Se analizaron las siguientes bacterias, todas con un resultado negativo, en la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA:

- *Acinetobacter anitratus*
- *Acinetobacter lwoffii* (ATCC 17908)
- *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285)
- *Bacteroides melaninogenicus*
- *Candida albicans* (ATCC 14053 o 10231)
- *Chlamydia trachomatis*
- *Enterobacter cloacae*
- *Escherichia coli* (HB101)*
- *Escherichia coli*
- *Fusobacterium nucleatum*
- *Gardnerella vaginalis*
- *Haemophilus ducreyi*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Lactobacillus acidophilus*
- *Mobiluncus curtisii*
- *Mobiluncus mulieris*
- *Mycoplasma hominis*
- *Mycoplasma hyorhinis*
- *Neisseria gonorrhoeae* (ATCC 19424)
- *Neisseria lactamica* (NRL 2118)
- *Neisseria meningitidis* (ATCC 13077)

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

- *Neisseria meningitidis* (ATCC 29256)
- *Peptostreptococcus anaerobius*
- *Proteus vulgaris* (ATCC 21117, 8427, 33420)
- *Serratia marcescens*
- *Staphylococcus aureus* (cepa de Cowan)
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Streptococcus faecalis* (ATCC 14508)
- *Streptococcus pyogenes* (ATCC27762)
- *Treponema pallidum*
- *Trichomonas vaginalis*
- *Ureaplasma urealyticum*

Se analizó el siguiente ADN viral o plasmídico o suero humano, en todos los casos con un resultado negativo, en la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA:

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

El único plásmido que mostró reactividad cruzada en la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA fue el pBR322. La reactividad cruzada entre el pBR322 y la mezcla de la sonda no es imprevista, 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 en la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA no tuvieron resultados positivos por 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 High-Risk HPV DNA debido a secuencias homólogas al pBR322 parece ser baja.

Hibridación cruzada

Se analizaron 18 tipos diferentes de VPH (de alto y bajo riesgo) con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA a concentraciones de 4 ng/ml de ADN del VPH. Todas las dianas de VPH de alto riesgo fueron positivas. Este estudio demostró también que existe un pequeño grado de hibridación cruzada entre los tipos 6 y 42 del VPH y la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Las muestras de pacientes con niveles altos (4 ng/ml o más) de ADN de los tipos del VPH 6 o 42 pueden mostrar resultados positivos falsos con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. La importancia clínica de este hecho radica en que puede derivarse innecesariamente para una colposcopia a pacientes con niveles de ADN de los tipos del VPH 6 o 42 de 4 ng/ml o más.

La prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA también ha mostrado reactividad cruzada con los tipos del VPH 40, 53 y 66. Estos tipos son raros y no hay suficientes pruebas para establecer la correlación exacta entre la infección por estos tipos y la aparición de lesiones de grado alto (15). También existen informes en la literatura de que sondas complejas similares a la utilizada en esta prueba pueden causar resultados positivos falsos debido a hibridación cruzada con los tipos del VPH 11, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 o MM9 (35). Aunque varios de estos tipos de VPH son raros o son tipos nuevos que no se encuentran con frecuencia en las lesiones de grado alto, las pacientes cuyas muestras contengan niveles altos de estos tipos de ADN del VPH pueden ser derivadas incorrectamente para una colposcopia.

Efecto 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 High-Risk HPV DNA. Se añadieron sangre completa, productos para lavado vaginal, cremas antifúngicas y geles anticonceptivos (agentes que se pueden encontrar con frecuencia en las muestras cervicales) a muestras recogidas en STM, positivas y negativas (combinaciones de muestras clínicas y muestras no clínicas), a las concentraciones que pueden encontrarse en las muestras cervicales.

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 cantidades de ADN del VPH próximas al valor de corte de la prueba (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 del útero se limpia sistemáticamente antes de obtener muestras para la citología y para el análisis del VPH.

Efecto de la sangre y de otras sustancias sobre las muestras recogidas en PreservCyt

Preparación manual de las muestras

Se evaluó el efecto de la sangre y de otras sustancias potencialmente interferentes definidas o no definidas que pueden estar presentes en las muestras recogidas en PreservCyt con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Se añadieron sangre completa, productos para lavado vaginal, cremas antifúngicas y geles anticonceptivos (agentes que se pueden encontrar con frecuencia en las muestras cervicales) a fondos comunes de muestras clínicas recogidas en PreservCyt, positivas y negativas, a las concentraciones que pueden encontrarse en las muestras cervicales. 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 High-Risk HPV DNA.

Preparación de las muestras con el kit QIAasymphony DSP HPV Media

Se evaluaron los efectos de la sangre y de otras sustancias que interfieren en las muestras recogidas en PreservCyt, con ayuda del kit QIAasymphony DSP HPV Media para la preparación de muestras y análisis automatizado con el sistema RCS, con el empleo de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Se analizaron los efectos de las siguientes sustancias potencialmente interferentes:

- Crema antifúngica
- Crema antiinflamatoria
- Sangre
- Gel anticonceptivo
- Producto para ducha vaginal
- Supositorios desodorantes femeninos
- Gel lubricante
- Espermicida

Cada sustancia se añadió a fondos comunes negativos y positivos. No se observó ningún resultado positivo falso ni negativo falso con ninguna de las sustancias, a una concentración que pudiera encontrarse en las muestras cervicales. Sin embargo, puede notificarse un resultado negativo falso en muestras clínicas con cantidades de ADN del VPH próximas al valor de corte de la prueba si hay cantidades altas 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 del útero se limpia sistemáticamente antes de obtener muestras para la citología y para el análisis del VPH.

Preparación de las muestras con el kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA

Se evaluó el efecto de la sangre completa en muestras recogidas en PreservCyt utilizando el kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA para la preparación de muestras y la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Se seleccionaron muestras clínicas con sangre visible y se analizaron utilizando el método de preparación manual de las muestras y el método automatizado de preparación de muestras con ayuda del kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA. Se compararon los resultados de 238 muestras, y se observaron una concordancia global del 94,12% y un valor de p de McNemar de 0,2850, lo que indica que no existe una diferencia estadísticamente significativa en el desempeño clínico entre el método de preparación manual de las muestras y el método automatizado de preparación de las muestras, con ayuda del kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA.

Se analizaron los efectos de las siguientes sustancias potencialmente interferentes:

- Producto para ducha vaginal
- Crema antifúngica
- Gel anticonceptivo
- Células mononucleares en sangre periférica (CMSP)
- Gel lubricante
- Espray femenino
- Espermicida
- Partículas magnéticas
- Solución TopElute

Cada sustancia se añadió a fondos comunes celulares negativos y positivos, a concentraciones que pueden encontrarse en muestras cervicales o que pueden añadirse durante la preparación de las muestras. No se observaron resultados positivos falsos con ninguna de estas sustancias a ninguna concentración. No se observaron resultados negativos falsos con la excepción del gel anticonceptivo. No obtenga una muestra cervical recogida en PreservCyt para la preparación automatizada de muestras con el kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA si hay gel anticonceptivo.

Efecto de la sangre y de otras sustancias sobre las muestras recogidas en SurePath

Preparación de las muestras recogidas en SurePath con el kit QIASymphony DSP HPV Media

Se evaluaron los efectos de la sangre y de otras sustancias potencialmente interferentes en muestras recogidas en SurePath utilizando el kit QIASymphony DSP HPV Media para la preparación de las muestras y el análisis automatizado con el sistema RCS utilizando la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Se analizaron los efectos de las siguientes sustancias potencialmente interferentes:

- Crema antifúngica
- Crema antiinflamatoria
- Sangre
- Gel anticonceptivo
- Producto para ducha vaginal
- Supositorios desodorantes femeninos
- Gel lubricante
- Espermicida

Cada sustancia se añadió a fondos comunes negativos y positivos. No se observó ningún resultado positivo falso con ninguna de las sustancias, a una concentración que pudiera encontrarse en las muestras cervicales.

No se observó ningún resultado negativo falso, con la excepción de las siguientes sustancias:

- El gel anticonceptivo produjo resultados negativos falsos a una concentración muy baja.
- Si en una muestra hay presencia de una concentración alta de crema antifúngica, puede informarse un resultado negativo falso en muestras clínicas con cantidades de ADN del VPH cercanos al valor de corte para la prueba. No obstante, es muy poco probable que una muestra clínica contenga casi exclusivamente crema antifúngica, porque el cuello del útero se limpia sistemáticamente antes de obtener muestras para la citología y para el análisis del VPH.

No obtenga una muestra cervicouterina recogida en SurePath para la preparación automatizada de muestras con el kit QIASymphony DSP HPV Media en caso de presencia de gel anticonceptivo o crema antifúngica.

Preparación de muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath con el kit QIAAsymphony DSP HPV Media

Se evaluaron los efectos de la sangre y de otras sustancias potencialmente interferentes en muestras de sedimento celular de posgradiente con SurePath utilizando el kit QIAAsymphony DSP HPV Media para la preparación de las muestras y el análisis automatizado con el sistema RCS utilizando la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Se analizaron los efectos de las siguientes sustancias potencialmente interferentes:

- Crema antifúngica
- Crema antiinflamatoria
- Sangre
- Gel anticonceptivo
- Producto para ducha vaginal
- Supositorios desodorantes femeninos
- Gel lubricante
- Espermicida

Cada sustancia se añadió a mezclas clínicas negativas y positivas que, a continuación, se procesaron a través del sistema BD PrepMate System para simular una muestra de sedimento celular de posgradiente con SurePath. Se observó un único resultado positivo falso tanto para sangre como para crema antifúngica; sin embargo, el análisis estadístico no mostró una interferencia significativa. No se observó ningún resultado positivo falso con ninguna de las otras sustancias a una concentración que pueda encontrarse en muestras cervicouterinas.

Se observaron resultados negativos falsos para crema antifúngica, crema antiinflamatoria y gel anticonceptivo. No obtenga una muestra cervicouterina recogida en SurePath para la preparación automatizada de muestras con el kit QIAAsymphony DSP HPV Media en caso de presencia de gel anticonceptivo, crema antifúngica o crema antiinflamatoria

Arrastre

El RCS se ha diseñado para minimizar la contaminación de las muestras o el arrastre de fosfatasa alcalina residual mediante el uso de puntas de pipeta desechables para la aspiración de reactivos y de muestras. Para confirmar esta característica de diseño, QIAGEN realizó varios estudios para evaluar si el uso del RCS aumenta la probabilidad de arrastre o de contaminación cruzada de muestras en comparación con el método manual. Se utilizaron varios instrumentos RCS para evaluar la probabilidad de arrastre entre sistemas.

En un estudio se añadieron 2 ng y 20 ng de plásmido de ADN del VPH al material de control negativo para preparar muestras recogidas en STM con una positividad alta. La concentración de 20 ng/ml produce valores de RLU aproximadamente 3–5 veces mayores que los de la muestra clínica de máxima positividad que se espera observar durante los análisis clínicos sistemáticos. Estas muestras simuladas con positividad alta se colocaron en toda la microplaca en un patrón de cuadrícula alternándolas con pocillos que contenían únicamente el control negativo (pocillos de prueba). Este diseño tiene en cuenta los posibles efectos aditivos de muestras secuenciales con positividad alta. A continuación, se analizaron las microplacas con el método de análisis manual y con el método de análisis automatizado con el sistema RCS. Tras procesarlas, se comparó el número de pocillos de prueba positivos falsos. El análisis automatizado con el sistema RCS no produjo más pocillos de prueba positivos falsos que el análisis manual con estas muestras recogidas en STM simuladas, incluso cuando la microplaca contenía una secuencia extremadamente elevada de muestras positivas.

En una segunda evaluación del arrastre, se combinaron muestras de pacientes recogidas en PreservCyt VPH+ para crear un panel de muestras con diferentes niveles de quimioluminiscencia para obtener valores de RLU/CO representativos del intervalo esperado durante el uso clínico sistemático del análisis automatizado con el sistema RCS. El intervalo de las muestras positivas era de aproximadamente 200 a 1800 RLU/CO. Para evaluar la probabilidad de arrastre, incluyendo los posibles efectos aditivos de positivos altos secuenciales, se colocaron estos componentes positivos del panel en microplacas en un patrón de cuadrícula al lado de pocillos de control negativos. A continuación se analizaron estas placas con el método de análisis automatizado con el sistema RCS.

Los resultados de esta evaluación del arrastre utilizando muestras de pacientes combinadas sugieren una posible tasa de positivos falsos del 0,3% debido a los efectos de arrastre cuando se realiza el análisis automatizado con el sistema RCS con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

La experiencia de QIAGEN en la realización de análisis con muestras recogidas en PreservCyt combinadas sugiere que la combinación de muestras de paciente recogidas en PreservCyt crea muestras que no presentan características similares a las de las muestras de paciente individuales. Aunque se desconocen los efectos de esta combinación sobre la probabilidad de arrastre del análisis automatizado con el sistema RCS, las pruebas preclínicas adicionales del análisis automatizado con el sistema RCS no indicaron un aumento de la probabilidad de resultados positivos falsos debido al arrastre. Estas evaluaciones se realizaron utilizando muestras de plásmidos artificiales con concentraciones de ADN casi 5 veces mayores que las observadas en la configuración clínica.

En una tercera evaluación del arrastre se crearon muestras de prueba añadiendo un colorante fluorescente en concentraciones representativas del intervalo dinámico de RLU del ensayo a matrices de fondo cuya viscosidad era aproximadamente la de las muestras clínicas y los reactivos de la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. A continuación se procesaron estas muestras de prueba con 3 instrumentos RCS diferentes y se evaluó la probabilidad de arrastre de cada uno de los siguientes pasos clave del procedimiento del RCS:

- Transferencia de la muestra
- Transferencia de placa a placa
- Adición de la sonda
- Agitación de la microplaca
- Lavado de la microplaca

La fluorescencia resultante se midió con una longitud de onda de excitación de 485 nm y con una longitud de onda de emisión de 535 nm y fue suficientemente sensible para detectar un arrastre del orden de 1:20.000, que correspondería a un resultado positivo falso con la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA (es decir, 1 pg en 20 ng). Los resultados de esta evaluación demostraron que no se produjo un arrastre durante ninguno de los pasos clave del procedimiento del RCS que pudiese producir un resultado positivo falso en la prueba *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Estabilidad de los reactivos en el instrumento

QIAGEN evaluó las características de rendimiento del análisis automatizado con el sistema RCS cuando se utilizan reactivos que han permanecido en la plataforma del sistema durante períodos prolongados. Los reactivos con mayor probabilidad de estar expuestos a períodos prolongados en el instrumento son la mezcla de la sonda, el DR1, el DR2 y la microplaca de captura.

El rendimiento del ensayo se evaluó con reactivos recién preparados y con reactivos envejecidos en el instrumento RCS a temperatura ambiente durante un período de 16 horas (para simular 2 turnos de trabajo en el ámbito del laboratorio). Se analizaron muestras clínicas simuladas con 2 instrumentos RCS en cada uno de 2 días de análisis con una matriz de reactivos definida (consulte la tabla 55 más adelante).

Tabla 55. Diseño del estudio para la evaluación de la estabilidad de los reactivos en el instrumento.

| Instrumento RCS | Día 1 | Día 2 |
|-----------------|-----------------------|-----------------------|
| 1 | Reactivos envejecidos | Reactivos frescos |
| 2 | Reactivos frescos | Reactivos envejecidos |

En la figura 3 más adelante se muestra un gráfico de todos los puntos de datos de RLU/CO. El gráfico y el análisis de regresión de los reactivos envejecidos frente a los reactivos frescos indican una concordancia entre ambos tipos de reactivos.

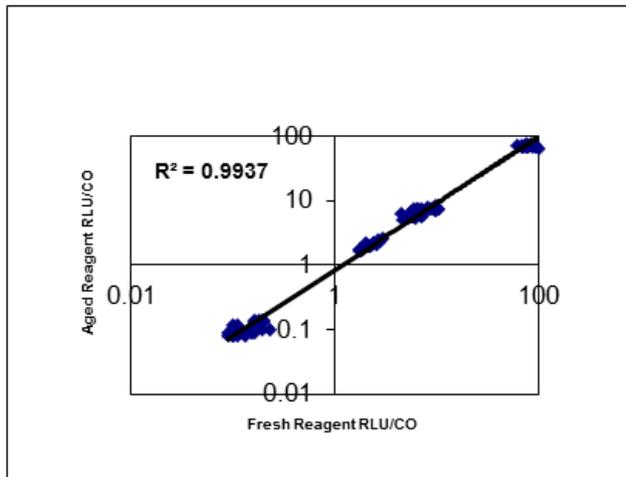


Figura 3. Gráfico de dispersión que compara los valores del calibrador y del control del ensayo utilizando reactivos envejecidos y frescos.

Un examen detallado de los resultados de concordancia muestra que no se produjo ningún cambio de los resultados cualitativos si se utilizaban reactivos envejecidos (consulte la tabla 56 más adelante).

Tabla 56. Concordancia de los reactivos frescos frente a los reactivos envejecidos.

| Parámetro estadístico | Resultado |
|---------------------------|-------------|
| Concordancia global (%) | 100.0% |
| (n/N) | (96/96) |
| IC del 95% | 97.97–100.0 |
| Concordancia positiva (%) | 100.0% |
| (n/N) | (64/64) |
| IC del 95% | 97.97–100.0 |
| Concordancia negativa (%) | 100.0% |
| (n/N) | (32/32) |
| IC del 95% | 97.97–100.0 |
| R ² | 0.9937 |
| Pendiente | 0.97 |
| Intersección | 0.47 |
| Kappa | 1.0 |

El análisis de los datos muestra que los resultados son estadísticamente idénticos en los reactivos frescos y en los envejecidos, lo que indica que los reactivos son suficientemente estables si permanecen en el instrumento durante un período máximo de 16 horas.

Bibliografía

1. Broker, T. R. and Botchan, M. (1986) Papillomaviruses: retrospectives and prospectives. In: Botchan, M., Grodzicker, T., and Sharp, P., eds. *DNA Tumor Viruses: Control of Gene Expression and Replication*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 17-36. From the 1985 Cancer Cells Conference at Cold Spring Harbor.
2. Lorincz, A.T. and Reid, R. (1989) Association of human papillomavirus with gynecologic cancer. *Curr. Opin. Oncol.* **1**, 123.
3. Jenson, A.B., Kurman, R.J., and Lancaster, W.D. (1984) Human papillomaviruses. In: Belshe, R.B. *Textbook of Human Virology*. Littleton, MA: PSG Wright, p 951.
4. Becker, T.M., Stone, K.M., and Alexander, E.R. (1987) Genital human papillomavirus infection: a growing concern. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* **14**, 389.
5. McCance, D.J., Walker, P.G., Dyson, J.L., Coleman, D.V., and Singer, A. (1983) Presence of human papillomavirus DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia. *Br. Med. J.* **287**, 784.
6. Naghashfar, Z. et al. (1985) Identification of genital tract papillomaviruses HPV 6 and HPV 16 in warts of the oral cavity. *J. Med. Virol.* **17**, 313.
7. Gissmann, L., Wolnik, L., Ikenberg, H., Koldovsky, U., Schnurch, H.G., and zur Hausen, H. (1983) Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 560.
8. Munoz, N., Bosch, F.X., Shah, K.V., and Meheus, A., eds. (1992) *IARC Scientific Publications no. 119: The Epidemiology of Cervical Cancer and Human Papillomavirus*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
9. Reid, R. et al. (1987) Sexually transmitted papillomaviral infections. I. The anatomic distribution and pathologic grade of neoplastic lesions associated with different viral types. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **156**, 212.
10. Fuchs, P.G., Girardi, F., and Pfister, H. (1988) Human papillomavirus DNA in normal, metaplastic, preneoplastic and neoplastic epithelia of the cervix uteri. *Int. J. Cancer* **41**, 41.

11. Lorincz, A.T., Temple, G.F., Kurman, R.J., Jenson, A.B., and Lancaster, W.D. (1987) Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* **79**, 671.
12. Lorincz, A.T., Lancaster, W.D., and Temple, G.F. (1986) Cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus from a woman with dysplasia of the uterine cervix. *J. Virol.* **58**, 225.
13. Beaudenon, S., Kremsdorf, D., Croissant, O., Jablonska, S., Wain Hobson, S., and Orth, G. (1986) A novel type of human papillomavirus associated with genital neoplasias. *Nature* **321**, 246.
14. Lorincz, A.T., Quinn, A.P., Lancaster, W.D., and Temple, G.F. (1987) A new type of papillomavirus associated with cancer of the uterine cervix. *Virology* **159**, 187.
15. Meyer, T. et al., (1998) Association of rare human papillomavirus types with genital premalignant and malignant lesions. *J. Infect. Dis.* **178**, 252.
16. Lorincz, A.T., Reid, R., Jenson, A.B., Greenberg, M.D., Lancaster, W., and Kurman, R.J. (1992) Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* **79**, 328.
17. Longuet, M., Beaudenon, S., and Orth, G. (1996) Two novel genital human papillomavirus (HPV) types, HPV68 and HPV70, related to the potentially oncogenic HPV39. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 738.
18. Naghashfar, Z.S., Rosenshein, N.B., Lorincz, A.T., Buscema, J., and Shah, K.V. (1987) Characterization of human papillomavirus type 45, a new type 18 related virus of the genital tract. *J. Gen. Virol.* **68**, 3073.
19. Nuovo, G.J., Crum, C.P., de Villiers, E.M., Levine, R.U., and Silverstein, S.J. (1988) Isolation of a novel human papillomavirus (type 51) from a cervical condyloma. *J. Virol.* **62**, 1452.
20. Shimoda, K., Lorincz, A.T., Temple, G.F., and Lancaster, W.D. (1988) Human papillomavirus type 52: a new virus associated with cervical neoplasia. *J. Gen. Virol.* **69**, 2925.

21. Lorincz, A.T., Quinn, A.P., Goldsborough, M.D., McAllister, P., and Temple, G.F. (1989) Human papillomavirus type 56: a new virus detected in cervical cancers. *J. Gen. Virol.* **70**, 3099.
22. Lorincz, A.T., Quinn, A.P., Goldsborough, M.D., Schmidt, B.J., and Temple, G.F. (1989) Cloning and partial DNA sequencing of two new human papillomavirus types associated with condylomas and low grade cervical neoplasia. *J. Virol.* **63**, 2829.
23. Beaudenon, S. et al. (1987) Plurality of genital human papillomaviruses: characterization of two new types with distinct biological properties. *Virology* **161**, 374.
24. Schiffman, M. (1993) Latest HPV findings: some clinical implications. *Contemp. Ob. Gyn.* **38**, 27.
25. Volpers, C.; and Streeck, R.E. (1991) Genome organization and nucleotide sequence of human papillomavirus type 39. *Virology* **181**, 419.
26. Matsukura, T., and Sugase, M. (1990) Molecular cloning of a novel human papillomavirus (type 58) from an invasive cervical carcinoma. *Virology* **177**, 833.
27. Rho, J., Roy-Burman, A., Kim, H., de Villiers, E.M., Matsukura, T., and Choe, J. (1994) Nucleotide sequence and phylogenetic classification of human papillomavirus type 59. *Virology* **203**, 158.
28. Bosch, F.X. et al. (1995) International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**, 796.
29. Kahn, T., Schwarz, E., and zur Hausen, H. (1986) Molecular cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus (HPV 30) from a laryngeal carcinoma. *Int. J. Cancer* **51**, 61.
30. Koutsky, L.A. et al. (1992) 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.
31. Nieminen, P., Aho, M., Vesterinen, E., Stellato, G., Vaheri, A., Soares, V.R.X., Paavonen, J. (1991) Natural history of HPV infection: preliminary results of a cohort study [abstract]. In: 1991 Papillomavirus Workshop. Seattle, WA p 77.

32. Centers for Disease Control (1987) Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 36(Suppl 2), 3S.
33. Sehulster, L.M., Hollinger, F.B., Dreesman, G.R., and Melnick, J.L. (1981) Immunological and biophysical alteration of hepatitis B virus antigens by sodium hypochlorite disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 762.
34. Martin, L.S., McDougal, J.S., and Loskoski, S.L. (1985) Disinfection and inactivation of the human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy associated virus. *J. Infect. Dis.* **152**, 400.
35. Vernon, S.D., Unger, E.R., and Williams, D. (2000) Comparison of human papillomavirus detection and typing by cycle sequencing, line blotting, and hybrid capture. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 651.
36. Coleman, D. et al. (1993) European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Europe against cancer programme. *Eur. J. Cancer* 29A(Suppl. 4), S1.
37. Lorincz, A.T., Schiffman, M.H., Jaffurs, W.J., Marlow, J., Quinn, A.P., and Temple, G.F. (1990) Temporal associations of human papillomavirus infection with cervical cytologic abnormalities. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **162**, 645.
38. Morrison, E.A.B. et al. (1991) Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasia: a case control study. *Int. J. Cancer* **49**, 6.
39. Wheeler, C.M., Stewart, A.M., Gravitt, P.E., and Cheng, S. (1995) Generation of entire human papillomavirus genomes by long PCR: frequency of errors produced during amplification. *Genome Res.* **5**, 79.
40. Burk R.D. et al. (1996) Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex. Transm. Dis.* **23**, 333.
41. Belinson, J. et al. (2009) Prevalence of type-specific human papillomavirus in endocervical, upper and lower vaginal, perineal and vaginal self-collected specimens: implications for vaginal self-collection. *Int. J. of Cancer* **127**, 1151.
42. Zhao, F. et al. (2012) Pooled analysis of a self-sampling HPV DNA Test as a cervical cancer primary screening method. *J. Natl Cancer Inst.* **104**, 178.

-
43. Lazcano-Ponce, E. et al. (2011) Self-collection of vaginal specimens for human papillomavirus testing in cervical cancer prevention (MARCH): a community-based randomized controlled trial. *Lancet* **378**, 1868.
 44. Lazcano-Ponce, E. et al. (2014) Specimen self-collection and HPV DNA screening in a pilot study of 100,242 women. *Int. J. Cancer* **135**, 109.
 45. Szarewski, A. et al. (2007) Human papillomavirus testing by self-sampling: assessment of accuracy in an unsupervised clinical setting. *J. Med Screen* **14**, 34.
 46. NCCLS (1999) *Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices: Approved Guideline*. NCCLS document E5-A.

Símbolos

En estas instrucciones de uso se utilizan los símbolos mostrados en la tabla siguiente.

| Símbolo | Definición del símbolo |
|---|---|
|  | Contenido suficiente para 96 pruebas |
|  | Contenido suficiente para 384 pruebas |
|  | Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i> |
|  | Número de catálogo |
|  | Fabricante |
|  | Representante autorizado en la Comunidad Europea |
|  | Fecha de caducidad |
|  | Consultar instrucciones de uso |
|  | Número mundial de artículo comercial (Global Trade Item Number) |

Guía de resolución de problemas

Comentarios y sugerencias

Cambio de color incorrecto o ausencia de cambio de color durante la desnaturalización.

- | | |
|---|---|
| a) No se ha preparado correctamente el DNR. | Asegúrese de que el DNR contiene el tinte indicador y de que tiene un color morado oscuro. |
| b) No se ha añadido el DNR. | Mida el volumen de la muestra para asegurarse de que se ha añadido el DNR a la muestra (debería ser de 1,5 ml). Si el volumen indica que no se ha añadido el DNR, añada el volumen correcto, mezcle y efectúe la prueba si se observa el cambio de color correcto. |
| c) La muestra contiene sangre u otros materiales que enmascaran el cambio de color. | No se espera el cambio de color exacto descrito con estos tipos de muestras; los resultados de la prueba no deberían verse afectados negativamente. |
| d) El pH de la muestra puede ser inusualmente ácido. | 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 antes de 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. |

Los controles de calidad generan resultados incorrectos.

- | | |
|--|---|
| a) Se ha elegido un protocolo de ensayo incorrecto para la prueba. | Si el protocolo de ensayo es incorrecto para la prueba que se va a realizar, lea de nuevo la microplaca en los 30 minutos siguientes a la adición del DR2 utilizando el protocolo de ensayo correcto. |
| b) El QC1-LR y el QC2-HR se han colocado al revés. | Vuelva a analizar las muestras. |
| c) El HRC y el QC2-HR se han colocado al revés. | Vuelva a analizar las muestras. |

Comentarios y sugerencias

Se observa un cambio de color incorrecto durante la hibridación

- | | |
|--|--|
| a) Mezclado inadecuado de la mezcla de la sonda con calibradores, controles de calidad y/o muestras desnaturalizados, o no se ha añadido la mezcla de la sonda, o se ha añadido un volumen incorrecto de reactivo. | Agite la microplaca de hibridación o la gradilla para microtubos que contiene los microtubos durante 2 minutos más. Si aún quedan microtubos o pocillos de la microplaca de color morado, añada 25 µl más de la mezcla de la sonda adecuada y mezcle bien. Si tras la adición y el remezclado de la mezcla de la sonda no tiene lugar el cambio de color correcto y la muestra no contenía sangre ni otros materiales, vuelva a analizar la muestra. |
| b) La muestra contiene sangre u otros materiales que enmascaran el cambio de color. | No se espera el cambio de color exacto descrito con estos tipos de muestras; los resultados de la prueba no deberían verse afectados negativamente. |
| c) La muestra tenía < 1000 µl de STM. | Compruebe el volumen de la muestra original. El volumen debe ser de 1425 µl ± 20 µl (después de quitar la porción de 75 µl para el análisis). Si el volumen es < 1425 µl, la muestra original contenía < 1000 µl de STM. Obtenga una muestra nueva. |

Test fails assay validation; no signal observed in positive calibrators, quality controls or in specimens

- | | |
|---|---|
| a) No se ha añadido la sonda al diluyente de sonda. | Prepare la mezcla de la sonda según se describe en estas instrucciones de uso. Etiquete los tubos con cuidado. |
| b) Sonda contaminada con ARNasa durante la preparación. | Utilice puntas de pipeta con barrera contra aerosoles para pipetear la sonda y use guantes. Prepare la mezcla de la sonda en un recipiente estéril. Utilice únicamente depósitos desechables para reactivos nuevos limpios. |
| c) Mezclado inadecuado de la mezcla de la sonda | Después de añadir la sonda al diluyente de sonda, mezcle muy bien mediante agitación vorticial a alta velocidad durante al menos 5 segundos. Debe generarse un vórtice visible. |
| d) Mezclado inadecuado de la mezcla de la sonda y la | Después de añadir la mezcla de la sonda y la muestra a cada pocillo de la microplaca de hibridación o microtubo de hibridación, agite en el Rotary Shaker I configurado en |

Comentarios y sugerencias

| | |
|---|--|
| muestra desnaturalizada | 1.100 ±100 rpm durante 3 ± 2 minutos. Compruebe el cambio de color de morado a amarillo en cada pocillo de la microplaca o en cada microtubo. |
| e) Tiempo o temperatura incorrectos durante el paso de hibridación | Hibride durante 60 ± 5 minutos a 65 ± 2°C. Compruebe la temperatura del Microplate Heater I o del baño María. Asegúrese de que el Microplate Heater I o el baño María están preparados para calentar las muestras a la temperatura correcta y que se precalientan durante 60 minutos antes de su uso. Asegúrese de que el nivel de agua es suficiente para calentar las muestras a la temperatura correcta. Los baños de agua deben calibrarse periódicamente. |
| f) Mezclado inadecuado durante el paso de captura | Agite en un Rotary Shaker I durante 60 ± 5 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. (Consulte el manual del usuario del Rotary Shaker I (<i>Rotary Shaker I User Manual</i>)). |
| g) No se ha añadido la cantidad correcta de DR1 o no se ha incubado durante el tiempo especificado. | Pipetee 75 µl de DR1 en cada pocillo de la microplaca utilizando una pipeta de 8 canales. Incube a una temperatura de 20 °C a 25 °C durante 30-45 minutos. |
| h) No se ha añadido la cantidad correcta de DR2 o no se ha incubado durante el tiempo especificado. | Pipetee 75 µl de DR2 en cada pocillo de la microplaca utilizando una pipeta de 8 canales. Incube a una temperatura de 20 °C a 25 °C durante 15-30 minutos. |
| i) Fallo de funcionamiento o programación incorrecta del instrumento DML | Consulte el manual del usuario del instrumento DML correspondiente y el manual del usuario del software si desea obtener instrucciones, o póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN. |

Valores de RLU elevados en los calibradores, los controles de calidad y/o las muestras (≥ 200 RLU en muchos o en todos los pocillos de la microplaca). Es posible que la prueba no supere la validación del ensayo.

- a) No se ha añadido DNR, o Asegúrese de que la pipeta repetidora dispensa con exactitud antes de añadir el DNR. Es esencial que las

Comentarios y sugerencias

| | |
|--|--|
| se ha añadido un volumen incorrecto de reactivo, o se ha mezclado de manera inadecuada el DNR con las muestras, los calibradores o los controles de calidad. | pipetas estén calibradas. Añada un semivolumen de DNR a cada tubo 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 deberían adquirir un color morado tras la adición del DNR. |
| b) Fuga de luz en el instrumento DML; la puerta no está cerrada herméticamente; el sello que rodea la puerta está roto. | Realice una lectura de fondo (medición de datos sin procesar) del instrumento DML, leyendo una microplaca vacía. Una lectura superior a 50 RLU indica que existe una fuga de luz. Consulte el manual del usuario del instrumento DML correspondiente si desea obtener instrucciones, o póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN. |
| c) Contaminación del DR2 o de los pocillos de la microplaca de captura con DR1 o fosfatasa alcalina exógena | Consulte "Control de contaminación del DR2" en la página 139. |
| d) Tampón de lavado contaminado | Consulte "Control de contaminación del aparato de lavado y/o de la fuente de agua" en la página 139. |
| e) El Automated Plate Washer está contaminado. | Consulte "Control de contaminación del aparato de lavado y/o de la fuente de agua" en la página 139. |
| f) Lavado inadecuado de los pocillos de la microplaca de captura tras la incubación con el DR1 | Lave bien los pocillos de la microplaca de captura con el tampón de lavado 6 veces, haciendo rebosar los pocillos o utilizando el Automated Plate Washer. No debe verse ningún líquido rosa residual en los pocillos de la microplaca tras el lavado. Consulte el manual del usuario del Automated Plate Washer (<i>Automated Plate Washer User Manual</i>) si desea obtener instrucciones para comprobar si existen contaminación o fallos de funcionamiento. |
| g) Contaminación de los pocillos de la microplaca con DR1 | Asegúrese de que todas las superficies de trabajo están limpias y secas. Tenga cuidado al usar el DR1. Evite generar aerosoles. |
| h) Se ha secado la solución de hibridación en la misma zona de las toallitas Kimtowels o de hojas de papel absorbente de poca | No vuelva a secar con toallitas Kimtowels u hojas de papel absorbente de poca pelusa equivalentes previamente usadas. |

Comentarios y sugerencias

pelusa equivalentes).

- i) Se han usado toallitas de secado incorrectas. Use toallitas Kimtowels u hojas de papel absorbente de poca pelusa equivalentes para el secado.

Cocientes PC/NC bajos o número alto de muestras positivas bajas con cocientes < 2,0 (> 20%). Es posible que la prueba no supere la validación del ensayo.

- a) Preparación inadecuada de la muestra
Añada el volumen correcto de DNR 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 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 para desnaturalización.
Debe observarse un cambio de color evidente de transparente a morado oscuro. Incube durante 45 ± 5 minutos, a 65 ± 2 °C.
- b) No se ha mezclado adecuadamente la mezcla de la sonda o se ha añadido una cantidad insuficiente de mezcla de la sonda.
Prepare la mezcla de la sonda tal como se describe. Mezcle bien mediante agitación vorticial, asegurándose de que se produce un vórtice visible. La mezcla de la sonda debe añadirse a los tubos con una pipeta de desplazamiento positivo o con una pipeta multicanal para garantizar una dispensación exacta.
- c) Se ha añadido un volumen inadecuado de mezcla de la sonda a cada microtubo de hibridación o pocillo de la microplaca.
Asegúrese de que la pipeta de 8 canales dispensa con exactitud antes de añadir la mezcla de la sonda. Añada 25 µl de la mezcla de la sonda a cada microtubo o pocillo de la microplaca que contenga calibradores, controles de calidad y muestras desnaturalizados. Debe observarse un cambio de color de morado oscuro a amarillo tras la adición y el mezclado correcto. Las muestras recogidas en PreservCyt deben adquirir un color rosa en lugar de amarillo.
- d) Pérdida de actividad del DR1
Conserve el DR1 a una temperatura de 2 °C a 8 °C. Utilícelo antes de la fecha de caducidad.
- e) Captura insuficiente
El paso de captura debe realizarse con un Rotary Shaker I configurado en 1100 ± 100 rpm. calibre el agitador

Comentarios y sugerencias

-
- | | |
|---------------------------------|--|
| f) Lavado inadecuado | para validar su velocidad. Lave bien los pocillos de la microplaca con el tampón de lavado 6 veces, haciendo rebosar los pocillos o utilizando el Automated Plate Washer. |
| g) Tampón de lavado contaminado | Consulte el apartado "Control de contaminación del aparato de lavado y/o de la fuente de agua", en la página 139. |

Serie de muestras positivas con valores de RLU aproximadamente iguales

- | | |
|--|--|
| a) Contaminación de los pocillos de la microplaca de captura durante la prueba | 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. |
| b) Contaminación del DR2 | Asegúrese de no contaminar la solución patrón al pipetear el DR2 en los pocillos de la microplaca de captura. Evite la contaminación del DR2 con aerosoles procedentes del DR1 o del polvo del laboratorio, etc. |
| c) Fallo de funcionamiento del Automated Plate Washer | Consulte "Control de contaminación del aparato de lavado y/o de la fuente de agua" en la página 139 o consulte el manual del usuario del Automated Plate Washer (<i>Automated Plate Washer User Manual</i>) si desea obtener instrucciones para comprobar si existen contaminación o fallos de funcionamiento. |

CV amplios entre duplicados

- | | |
|--|--|
| a) Pipeteado inexacto | Compruebe la pipeta para asegurarse de que se dispensan volúmenes reproducibles. Calibre las pipetas de forma sistemática. |
| b) Mezclado insuficiente | Mezcle bien en todos los pasos. Mezcle mediante agitación vorticial antes y después de la incubación para desnaturalización y después de añadir la mezcla de la sonda. Asegúrese de que se produce un vórtice visible. |
| c) Transferencia incompleta del líquido de los microtubos de hibridación o de los pocillos de la microplaca de hibridación | Asegúrese de que se transfieren volúmenes reproducibles de la microplaca de hibridación o de los microtubos de hibridación a los pocillos de la microplaca de captura. |

Comentarios y sugerencias

a los pocillos de la microplaca de captura

- | | |
|---|--|
| d) Condiciones inadecuadas de lavado | Lave bien los pocillos de la microplaca con el tampón de lavado ó veces, haciendo rebosar los pocillos o utilizando el Automated Plate Washer. |
| e) Contaminación de los pocillos de la microplaca con DR1 | Asegúrese de que todas las superficies de trabajo están limpias y secas. Tenga cuidado al usar el DR1. Evite generar aerosoles. |

Obtención de resultados positivos falsos en muestras negativas conocidas

- | | |
|--|--|
| a) DR2 contaminado | Asegúrese de que no se produzca una contaminación cruzada de las muestras al distribuir el DR2 entre las muestras. Si únicamente se utiliza parte de un kit, dispense el volumen necesario para esa prueba en un depósito desechable para reactivos limpio antes de llenar la pipeta. |
| b) Contaminación de los pocillos de la microplaca con DR1 | Lave bien los pocillos de la microplaca con el tampón de lavado ó veces, haciendo rebosar los pocillos o utilizando el Automated Plate Washer. No debe verse ningún líquido rosa residual en los pocillos de la microplaca tras el lavado. |
| c) Secado en la misma zona de toallitas Kimtowels o de hojas de papel absorbente de poca pelusa equivalentes en varias filas | No seque en una zona que se haya usado previamente. |
| d) Preparación inadecuada de la muestra | Añada el volumen correcto de DNR y mezcle bien, mediante agitación vorticial. Para evitar resultados positivos falsos, asegúrese de que el líquido lave toda la superficie interior del tubo. Para la preparación manual de muestras recogidas en PreservCyt, asegúrese de que se realiza un mezclado apropiado y de que se vuelve a poner en suspensión adecuadamente el sedimento celular antes de la incubación para desnaturalización. Consulte las instrucciones de uso del kit <i>digene</i> HC2 Sample |

Comentarios y sugerencias

Conversion.

Debe observarse un cambio de color evidente de transparente a morado oscuro. Incube durante 45 ± 5 minutos a $65 \pm 2^\circ\text{C}$. Para la preparación manual de muestras recogidas en SurePath, asegúrese de que las muestras se incuben durante 90 ± 5 minutos a $65 \pm 2^\circ\text{C}$.

- e) Condiciones inadecuadas de lavado Lave bien los pocillos de la microplaca con el tampón de lavado 6 veces, haciendo rebosar los pocillos o utilizando el Automated Plate Washer.
- f) Contaminación de la punta de pipeta con material desnaturalizado durante la transferencia de la muestra desnaturalizada al microtubo de hibridación o al pocillo de la microplaca de hibridación El paso de desnaturalización del procedimiento de procesamiento de las muestras debe realizarse según se indica en estas instrucciones de uso. La realización de forma incorrecta de la agitación vorticial, la inversión del tubo y la agitación puede causar una desnaturalización incompleta de híbridos de ARN-ADN inespecíficos endógenos de las muestras cervicales. Para las muestras recogidas en PreservCyt o SurePath en particular, es probable la presencia de estos híbridos en la pared interna del tubo de desnaturalización de muestras. Para evitar el arrastre de este material celular no desnaturalizado, la punta de pipeta no debe tocar la pared del tubo de desnaturalización de muestras durante la transferencia de la muestra desnaturalizada al microtubo de hibridación o al pocillo de la microplaca de hibridación.

Valores elevados de RLU del NC (> 200 RLU). El resto de la prueba se realiza según lo previsto.

- a) Se ha incubado el DR2 a una temperatura superior a $20\text{-}25^\circ\text{C}$. 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 .
- b) Se ha incubado el DR2 durante más de 30 minutos. Lea la microplaca después de 15 minutos (pero no más de 30 minutos) de incubación a una temperatura de 20°C a 25°C .
- c) Contaminación del DR2 o Consulte "Control de contaminación del DR2" en la

Comentarios y sugerencias

del tampón de lavado con fosfatasa alcalina o DR1 página 139 o "Control de contaminación del aparato de lavado y/o de la fuente de agua" en la página 139.

La prueba no supera la validación del ensayo. Cociente $\overline{PCX}/\overline{NCX}$ elevado

El HRC y el QC2-HR se han colocado al revés. Vuelva a analizar las muestras. Lea con cuidado las etiquetas de los viales del calibrador y del control de calidad para evitar colocar al revés estos reactivos.

Control de contaminación del DR2

1. Pipetee 75 µl del vial de DR2 distribuido, residual u original en un pocillo de la microplaca de captura vacío.

Nota: El análisis del DR2 por triplicado proporciona una evaluación óptima del rendimiento.

2. Incube a una temperatura de 20 °C a 25 °C durante 15 minutos. Evite la luz directa del sol.
3. Mida la microplaca utilizando un instrumento DML.

El valor del control del DR2 debe ser < 50 RLU.

Si los valores del DR2 son < 50 RLU, puede usarse el DR2 para repetir la prueba.

Si está contaminado (> 50 RLU), obtenga un kit nuevo y repita la prueba.

Control de contaminación del aparato de lavado y/o de la fuente de agua

1. Etiquete los pocillos 1-4. Pipetee 75 µl de DR2 en 4 pocillos diferentes de la microplaca de captura.

El pocillo 1 sirve como control del DR2.

2. Pipetee 10 µl del tampón de lavado desde el frasco de lavado al pocillo 2 de la microplaca.
3. Deje que el tampón de lavado fluya a través del tubo del aparato de lavado. Pipetee 10 µl del tampón de lavado desde el tubo al pocillo 3 de la microplaca.
4. Obtenga una porción del agua usada para preparar el tampón de lavado. Pipetee 10 µl del agua en el pocillo 4 de la microplaca.
5. Incube a una temperatura de 20 °C a 25 °C durante 15 minutos. Evite la luz directa del sol.

6. Mida la microplaca utilizando un instrumento DML.

El valor del control del DR2 (pocillo 1) debe ser < 50 RLU.

Compare el valor de RLU de los pocillos 2, 3 y 4 con el valor de RLU del control del DR2. El valor individual de RLU de los pocillos 2, 3 y 4 no debe superar en más de 50 RLU el valor de RLU del control del DR2.

Los valores que superen en más de 50 RLU el valor del control del DR2 indican contaminación. Consulte "Método de lavado manual" en la página 61 si desea obtener instrucciones acerca de la limpieza y el mantenimiento del aparato de lavado.

Control de contaminación del Automated Plate Washer

1. Etiquete los pocillos 1-5. Pipetee 75 µl de DR2 en 5 pocillos diferentes de la microplaca de captura.

El pocillo 1 sirve como control del DR2.

2. Pipetee 10 µl del tampón de lavado desde el frasco de tampón de lavado para el lavador de placas, al pocillo 2 de la microplaca.
3. Pipetee 10 µl del líquido de enjuague desde el frasco de líquido de enjuague para el lavador de placas al pocillo 3 de la microplaca.
4. Pulse el botón **Prime** (Cebarr) en el teclado del lavador de placas, dejando que el tampón de lavado fluya a través de las vías. Pipetee 10 µl del tampón de lavado desde la cubeta al pocillo 4 de la microplaca.
5. Pulse el botón **Rinse** (Enjuagar) en el teclado del lavador de placas, dejando que la solución de enjuague fluya a través de las vías. Pipetee 10 µl del tampón de lavado desde la cubeta al pocillo 5 de la microplaca.
6. Cubra e incube durante 15 minutos a una temperatura de 20 °C a 25 °C. Evite la luz directa del sol.
7. Mida la microplaca utilizando un instrumento DML. El valor del control del DR2 (pocillo 1) debe ser < 50 RLU.

Compare el valor de RLU de los pocillos 2, 3, 4 y 5 con el valor de RLU del control del DR2. El valor individual de RLU de los pocillos 2, 3, 4 y 5 no debe superar en más de 50 RLU el valor de RLU del control del DR2.

Los valores que superen en más de 50 RLU el valor del control del DR2 indican contaminación del lavador de placas.

Consulte el manual del usuario del Automated Plate Washer Manual (Automated Plate

Washer User Manual) si desea obtener información sobre el procedimiento de descontaminación.

Información de contacto

Utilice la hoja de información de contacto de QIAGEN que se incluye en el kit de la prueba para ponerse en contacto con el representante local de QIAGEN.

Marcas comerciales: QIAGEN®, Sample to Insight®, *digene*®, Hybrid Capture®, QIASymphony®, Rapid Capture® (QIAGEN Group); ATCC® (American Type Culture Collection); CDP-Star® (Life Technologies Corporation); Corning® (Corning Incorporated); DuraSeal™ (Diversified Biotech); Eppendorf®, Repeater® (Eppendorf AG); Kimtowels® (Kimberly-Clark Corporation); Parafilm® (BEMIS Company, Inc.); pGEM® (Promega Corp); PrepMate®, PrepStain®, SurePath® (Becton, Dickinson and Company); PreservCyt®, ThinPrep® (Hologic, Inc.); VWR® (VWR International, Inc.).

Incluso en aquellos casos en los que no se indica de manera explícita, no debe asumirse que las marcas comerciales, nombres registrados, etc., no están protegidos por la ley.

This product and its method of use are covered by one or more of the following patents:

La tecnología Hybrid Capture está cubierta por la patente europea n.º O 667 918 registrada en Austria, Bélgica, Suiza, Liechtenstein, Alemania, Dinamarca, España, Francia, Reino Unido, Grecia, Irlanda, Italia, Luxemburgo, Países Bajos y Suecia.

N.º de patente de Hybrid Capture en Estados Unidos

6,228,578B1

N.º de patente del VPH en Estados Unidos

5,876,922 • 5,952,487 • 5,958,674 • 5,981,173

© 2012–2015 QIAGEN, reservados todos los derechos.

Ordering www.qiagen.com/contact | Technical Support support.qiagen.com | Website www.qiagen.com