



CLART® HPV3

**GENOTIPADO DE PAPILOMAVIRUS HUMANO
MEDIANTE IDENTIFICACIÓN GENÓMICA
PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO***

CLART® HPV3

CLART® HPV3 está bajo la protección de 2 familias de patentes correspondientes a las solicitudes de Patente Internacional PCT WO2007017699 y WO2011116797. Dichas familias comprenden miembros concedidos en España, Alemania, Dinamarca, Francia, Italia, Suecia, Rusia, Méjico, China e Israel, y en tramitación en Brasil y Canadá.

CLART®, CLART-Strip®, CAR® y SAICLART® son marcas registradas por GENOMICA.

Para ampliar la información descrita en este manual puede consultar la siguiente página web: www.genomica.com



GENOMICA, S.A.U.
Parque Empresarial Alvento, Edificio B
Calle Vía de los Poblados, 1 – 1ª planta
28033 Madrid, España
www.genomica.com



Versión 5
Junio 2018

Contenido

1. GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	5
2. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA DE DETECCIÓN.....	6
3. COMPONENTES Y CONSERVACIÓN DEL KIT	8
3.1. Reactivos de extracción y purificación	8
3.2. Reactivos de amplificación	8
3.3. Componentes de visualización	8
3.4. Otros componentes.....	9
4. COMPONENTES REQUERIDOS Y NO SUMINISTRADOS.....	10
4.1. Reactivos y material	10
4.2. Equipos	10
5. RECOMENDACIONES GENERALES Y PROCEDIMIENTOS DE MANIPULACIÓN	11
6. MUESTRAS	12
7. PROTOCOLO DE TRABAJO.....	13
7.1. Extracción manual de ADN.....	13
7.1.1. Recomendaciones específicas para la extracción manual de ADN	13
7.1.2. Protocolo de extracción manual de ADN	13
7.1.2.1 Preparación de la muestra	13
7.1.2.2 Parte común del protocolo.....	14
7.1.3. Protocolo de extracción automática de ADN	16
7.1.3.1 Equipo NucliSENS BioMérieux easyMag	16
7.1.3.2 Equipo BioSprint 96 de Qiagen.....	16
7.2. Reacción de Amplificación.....	19
7.2.1. Recomendaciones específicas para la amplificación.....	19
7.2.2. Protocolo de Amplificación	19
7.3. Visualización del producto amplificado.....	20
7.3.1. Recomendaciones específicas para la visualización.....	20
7.3.2. Protocolo de visualización	21
8. RESULTADOS.....	23
9. ESPECIFICACIONES TÉCNICAS Y DE FUNCIONAMIENTO.....	25
9.1. Control de interferencias conocidas.....	25
9.2. Especificaciones técnicas.....	26

9.2.1. Parámetros analíticos	26
9.2.2. Parámetros de utilidad diagnóstica.....	27
10. REFERENCIAS	29

1. GLOSARIO DE TÉRMINOS



Atención, ver instrucciones de uso



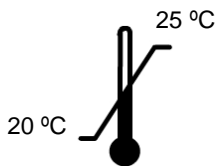
Fecha de caducidad



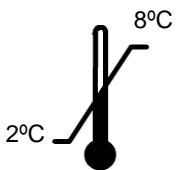
Producto sanitario para Diagnóstico *In Vitro*



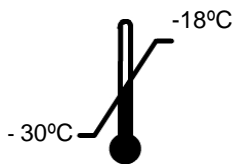
Lote



Conservar a temperatura ambiente



Conservar entre 2 °C y 8 °C



Conservar entre -30 °C y -18 °C

2. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA DE DETECCIÓN

CLART® HPV3 permite detectar infecciones y coinfecciones de los 49 tipos del virus del papiloma humano (VPH) con mayor importancia clínica (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 97, 101, 102, 103, 106, 150 y 151).

La detección puede llevarse a cabo a partir de distintos tipos de muestras humanas: frotis, suspensiones celulares y tejido fijado en formol e incluido en parafina.

La detección está basada en nuestra tecnología CLART®: Una amplificación por PCR de un fragmento de la región L1 del virus, seguida de visualización en microarray de baja densidad. La secuencia elegida está altamente conservada entre los distintos tipos de VPH, y al mismo tiempo presenta variaciones suficientes como para poder diferenciar cada tipo de VPH con sondas específicas.

En la Figura 1 se muestra un CLART-Strip® (CS), cada uno de cuyos pocillos contiene todas las sondas específicas para la caracterización de una muestra.

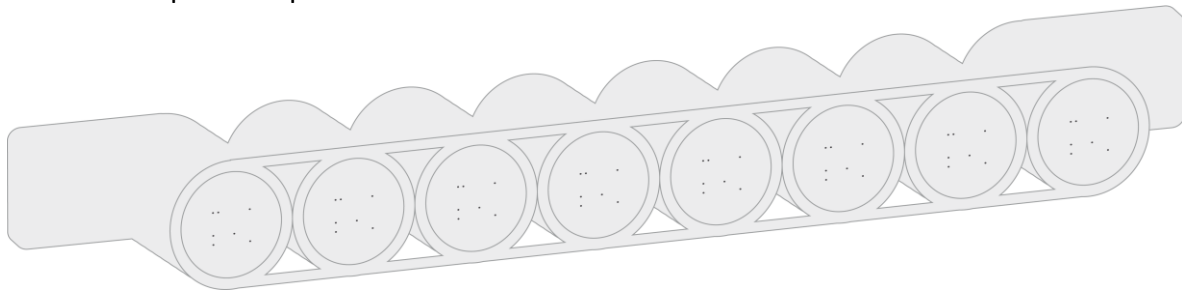


Figura 1. CLART-Strip® en forma de tira de 8 pocillos.

La Figura 2 muestra un esquema del sistema de detección. Básicamente, los productos amplificados por PCR, y marcados con biotina, hibridan con sus sondas complementarias específicas, inmovilizadas en áreas bien definidas del microarray. A continuación, tienen lugar dos pasos de incubación secuenciales: primero, con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa, y segundo, con un sustrato de o-dianisidina.

Seguidamente, aparece un precipitado en aquellas regiones del microarray donde ha tenido lugar la hibridación específica entre los productos de amplificación y sus sondas específicas.

Finalmente tiene lugar el análisis e interpretación automática de resultados, gracias al lector CAR® (CLINICAL ARRAY READER), en el cual se emplean softwares diseñados y validados por GENOMICA.

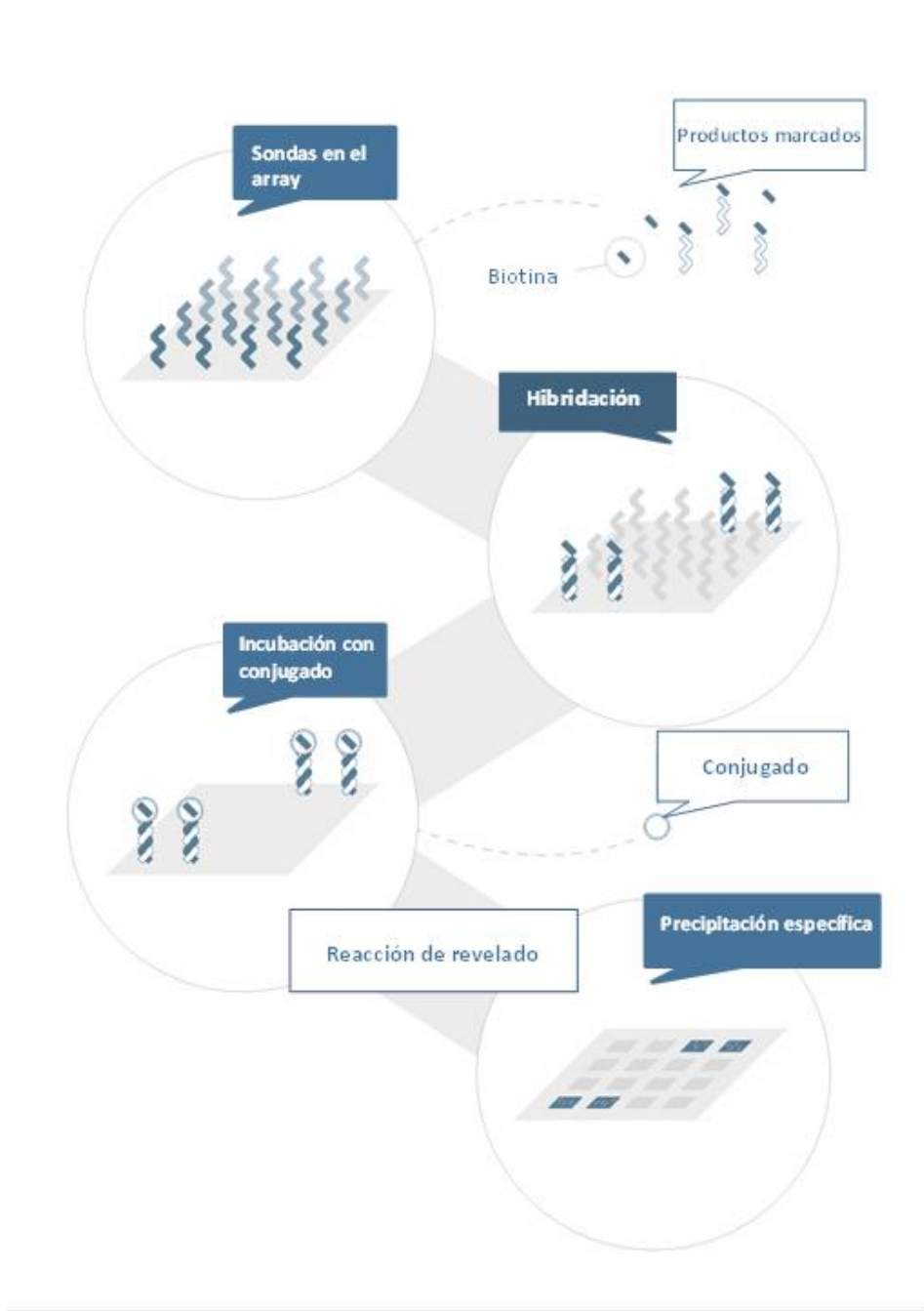


Figura 2. Esquema del Sistema de detección. Las sondas inmovilizadas en la superficie del microarray capturan sus respectivos productos de amplificación complementarios, marcados con biotina. A continuación tiene lugar la unión de la biotina con el conjugado de estreptavidina-peroxidasa, seguida de una incubación con o-dianisidina, sustrato de la peroxidasa. Esto genera un precipitado en el área donde ha tenido lugar la hibridación.

3. COMPONENTES Y CONSERVACIÓN DEL KIT

El kit **CLART® HPV3** contiene suficientes reactivos para la extracción y análisis del ADN de 48 muestras clínicas. Cada uno de los componentes del kit se envía a su temperatura óptima de almacenamiento, y permanecerá estable hasta la fecha de caducidad, siempre y cuando se respeten las recomendaciones de conservación.

A continuación se indican los componentes del kit:

3.1. Reactivos de extracción y purificación

Envío y almacenaje a 4°C o a temperatura ambiente.

Componentes:

- Columnas de purificación acopladas a tubos de 2 ml
- Tubos de 2 ml
- Buffer T1
- Buffer B3
- Buffer B5
- Buffer BE
- Buffer BW
- Proteinasa K liofilizada (Una vez resuspendida, conservar a -20°C)
- Buffer PB

3.2. Reactivos de amplificación

- Tubos de amplificación. Los tubos de amplificación se envían listos para su uso. Cada tubo de amplificación contiene 45 µL de mezcla de reacción. Sólo se debe descongelar en hielo el número exacto de tubos que se vaya a emplear. Los tubos restantes deben mantenerse a -20°C.

Nota: Las cajas de tubos de amplificación incluyen un indicador adhesivo e irreversible de temperatura; la aparición de un color rojizo en la ventana de visualización indica que en algún momento los productos han sobrepasado la temperatura de conservación de -20°C y no deben utilizarse.

3.3. Componentes de visualización

Los componentes de visualización se dividen en dos grupos, en base a las condiciones óptimas de envío y conservación:

- Envío a 4°C y almacenaje a temperatura ambiente:

- **CLART-Strip® (CS)**, cada uno de cuyos pocillos contiene todas las sondas específicas para la detección de todos los tipos de VPH a detectar.

Nota: Las unidades de **CS** se envían en un sobre termosellado que ha de mantenerse cerrado y protegido de la luz y las altas temperaturas (25°C máximo), hasta el momento de su uso.

- Envío y almacenaje a 4°C:

- **DC** (Diluyente de Conjugado).
- **SH** (Solución de Hibridación).
- **CJ** (Solución de Conjugado).
- **RE** (Solución de Revelado). Conservar protegida de la luz.
- **TL** (Tampón de Lavado).
- **Adaptador de placa Microtiter y tapa de plástico.**

3.4. Otros componentes

- Lector **CAR®** de GENOMICA o CLINICAL ARRAY READER (Figura 3).
Garantiza la lectura, análisis e interpretación automática de resultados de hasta 12 **CS** (96 muestras) por ensayo. Despliega una interfaz gráfica de fácil utilización (CLEIS), e incluye el software de procesamiento de imagen SAICLART® propiedad de GENOMICA, así como Softwares específicos para cada kit.

Nota: El uso del CAR® es exclusivo para kits de diagnóstico de GENOMICA.



Figura 3. CAR® (CLINICAL ARRAY READER)

4. COMPONENTES REQUERIDOS Y NO SUMINISTRADOS

A continuación se proporciona una lista de todos los componentes requeridos y no suministrados:

4.1. Reactivos y material

- Agua destilada.
- Etanol 96%.
- Guantes desechables.
- Puntas con filtro o pipetas con desplazamiento positivo.
- Recipiente con hielo picado o “Cooler”.
- Tubos Eppendorf autoclavados de 1.5 mL.
- Gradillas para tubos de 1.5 mL.
- Soporte para tubos de 0.5 mL/0.2 mL.
- Suero salino (0.9% NaCl).

4.2. Equipos

- Microcentrífuga.
- Termociclador.
- Cabina de seguridad biológica.
- Tres micropipetas ajustables en los rangos 1-20 μL , 20-200 μL y 200-1000 μL para el área de pre-PCR.
- Tres micropipetas ajustables en los rangos 1-20 μL , 20-200 μL , y 200-1000 μL para el área de post-PCR.
- Termobloque (Thermomixer) compatible con placas de amplificación de 96 pocillos con faldón y agitación, ajustable a 37°C, 55°C, 60°C y 100°C.
- Vórtex.
- Bomba de vacío (opcional).

5. RECOMENDACIONES GENERALES Y PROCEDIMIENTOS DE MANIPULACIÓN

Léase detenidamente para evitar contaminaciones.

1. La técnica CLART® HPV3 ha de ser llevada a cabo en dos áreas separadas físicamente, con el fin de minimizar contaminaciones de la muestra:

Área de Pre-PCR: En éste área se lleva a cabo la preparación de las muestras, la extracción del ADN y la adición de material extraído a los tubos de amplificación. Trabajar siempre en cabina de seguridad biológica.

Área de Post-PCR: En éste área tiene lugar la amplificación y visualización del producto de amplificación. Se ha de evitar que el material del área de Post-PCR entre en contacto con el del área de Pre-PCR, por lo que se recomienda no entrar en el área de Pre-PCR tras trabajar en Post-PCR.

Cada área ha de disponer de su propio material independiente (pipetas, puntas, tubos, gradillas, guantes, etc.), el cual nunca debe sacarse de dicho área.

2. Use guantes en todo momento. Es recomendable cambiar a menudo de guantes, y obligatorio hacerlo (i) antes de empezar a trabajar en cada una de las áreas anteriormente mencionadas, y (ii) antes de añadir ADN a los tubos de amplificación.

3. Limpie en profundidad las áreas de trabajo empleadas (poyata, cabinas, gradillas, pipetas), con lejía diluida al 10%, **después de procesar cada tanda de muestras.** Es obligatorio descontaminar todas las áreas de trabajo en caso de producirse una contaminación. Asimismo, se recomienda limpiar termocicladores y thermomixers antes y después de cada uso, siguiendo el mismo procedimiento.

4. Use puntas con filtro o pipetas de desplazamiento positivo para evitar contaminaciones. Emplee juegos de pipetas diferentes para cada área. Y descarte la punta de la micropipeta después de cada uso.

5. Use material de laboratorio desechable y autoclavado.

6. No deben mezclarse reactivos de viales diferentes, incluso aunque pertenezcan al mismo lote.

7. Cierre los tubos de reactivos después de su uso, con el fin de evitar contaminaciones.

8. GENOMICA no se hace responsable de los resultados obtenidos con el kit si se emplean condiciones distintas a las indicadas.

6. MUESTRAS

El kit **CLART[®] HPV3** permite analizar los siguientes tipos de muestras:

6.1. Frotis en torunda

Tomar la muestra con una torunda seca y estéril, de algodón o alginato, lo suficientemente grande como para obtener una buena cantidad de muestra. No utilizar dispositivos que produzcan el sangrado de la lesión. Volver a introducir la torunda en su tubo sin ningún tipo de medio. Conservar la muestra a 4°C si se va a procesar antes de 7 días o a -20°C si se va a procesar después.

6.2. Suspensiones celulares

Estas suspensiones celulares son del tipo de las utilizadas para realizar citologías cervicovaginales de capa fina por filtración a través de membranas (ThinPrep[®], Cytec). Tomar la muestra con un cepillo o espátula. Resuspender la muestra agitando el dispositivo utilizado en un vial con medio de transporte. Desechar el dispositivo utilizado y conservar la muestra a 4°C hasta su procesamiento.

6.3. Tejido fijado en formol e incluido en parafina

Fijar las muestras en **formol tamponado** durante el menor tiempo posible (nunca más de 24 horas). El empleo de formol no tamponado o la fijación durante más de 24 horas puede degradar el ADN de la muestra. Es importante limpiar cuidadosamente la cuchilla con xileno, antes y después de cortar la muestra, para evitar arrastrar restos de otra muestra cortada anteriormente. Quitar con una cuchilla la parafina sobrante alrededor de la pieza. Hacer con el microtomo 2-3 cortes de 5 µm y ponerlos en un tubo estéril de 1,5 ml.

GENOMICA no se responsabiliza de los resultados si se utilizan otros tipos de muestras.

7. PROTOCOLO DE TRABAJO

La extracción de ADN puede ser Manual o Automática.

7.1. Extracción manual de ADN.

7.1.1. Recomendaciones específicas para la extracción manual de ADN

- Disolver la Proteinasa K en Buffer PB antes de usar, para alcanzar una concentración de 20 mg/ml. La cantidad de Buffer PB a añadir está indicada en el bote de Proteinasa K. La Proteinasa K, una vez diluida, debe almacenarse a -20°C siendo estable durante al menos 6 meses.
- Añadir Etanol (96-100 %) al Buffer B5 antes de usar. El volumen de Etanol a añadir está indicado en el bote del Buffer B5.
- Calentar el Buffer BE a 70°C antes de usar.
- Todas las centrifugaciones del proceso se realizarán a temperatura ambiente, a no ser que se especifique otra cosa.
- Las soluciones de Buffer B3 y BW contienen hidrocloreto de guanidino. Se recomienda el uso de guantes, gafas y bata de laboratorio para su manejo.

7.1.2. Protocolo de extracción manual de ADN

7.1.2.1 Preparación de la muestra

7.1.2.1.1 Torunda seca

- Añadir 1.5 ml de suero salino (cloruro sódico 0,9%) al tubo que contiene la torunda. Dar un vórtex durante 1 minuto.
- Decantar el sobrenadante en un tubo de 1,5 ml estéril.
- Centrifugar las muestras durante 10 minutos en una microcentrífuga a 12.000 r.p.m. y retirar los restos de líquido con una micropipeta, evitando arrastrar el precipitado.
- Resuspender en 180 µl de Buffer T1. Continuar con el paso 7.1.2.2.

7.1.2.1.2 Suspensiones celulares

- Invertir varias veces el vial que contiene la muestra y tomar 1 ml de suspensión celular en un tubo de 1.5ml.

- Centrifugar 10 min a 12.000rpm. Retirar el sobrenadante, evitando arrastrar el precipitado.
- Resuspender en 1 ml de agua destilada estéril.
- Centrifugar 10 min a 12.000rpm. Retirar el sobrenadante, evitando arrastrar el precipitado.
- Resuspender en 180 μ l de Buffer T1.
- Transferir a un tubo de 1.5ml. Continuar con el paso 7.1.2.2.

7.1.2.1.3 Tejido fijado en formol e incluido en parafina

- Introducir 4 o 5 cortes de tejido de unos 5 μ m en un tubo de 1.5ml, y añadir 180 μ l de Buffer T1.
- Tras machacar el tejido con la punta de la pipeta, mezclar en vórtex para facilitar la lisis. Continuar con el paso 7.1.2.2.

7.1.2.2 Parte común del protocolo

1. Añadir 25 μ l de la solución de Proteinasa K.

- Mezclar en vórtex.
- Incubar a 56°C, 1-3 horas, (toda la noche en el caso de las muestras en parafina), en un baño o un thermomixer con agitación, hasta que la muestra esté totalmente lisada. Para acelerar esta lisis, se recomienda agitar las muestras en un vórtex cada 15 minutos.



180 μ l T1
+ 25 μ l de
proteínasa
K

1-3 h,
56°C

2. Una vez lisada la muestra, añadir 200 μ l de Buffer B3 a cada muestra. Mezclar en vórtex e incubar a 70°C durante 10 min.



Añada
200 μ l B3
70°C, 10
min.

3. Añadir 210 μ l de Etanol 96% a cada muestra y agitar en vórtex inmediatamente.

Nota: No descartar el precipitado blanquecino que se pueda haber formado tras la adición del etanol; este precipitado debe añadirse con el resto de la solución a la columna de purificación en el siguiente paso.

4. Preparar una columna de purificación por muestra y colocarla en un tubo de recogida de 2 ml. Añadir la muestra y centrifugar durante 1 minuto a 12.000 r.p.m.

Si el líquido no ha atravesado completamente la membrana, repetir la centrifugación. Descartar el fluido filtrado y el tubo de recogida de 2 ml.



Añada la muestra
1 min,
12,000
rpm

5. Colocar la columna en otro tubo colector y añadir 500 µl de Buffer BW a la columna. Centrifugar a 12000 r.p.m. durante 1 min. Descartar el fluido filtrado y el tubo colector.



Añada
500 µl B5
1 min,
12,000
rpm

6. Colocar la columna en otro tubo colector y añadir 600 µl de Buffer B5 a la columna. Centrifugar a 12000 r.p.m. durante 1 min. Descartar el fluido filtrado.



Añada 600
µl B5
1 min,
12,000
rpm

7. Reinsertar la columna en el tubo de recogida. Centrifugar a 12000 r.p.m. durante 1 min para eliminar cualquier resto del Buffer B5.



1 min
12,000
rpm

Nota: El Etanol residual que pueda quedar del Buffer B5 inhibe reacciones enzimáticas, por lo que debe ser eliminado completamente mediante esta centrifugación.

8. Colocar la columna en un tubo limpio de microcentrífuga de 1.5 ml. Eluir el ADN con 100 µl del Buffer BE (previamente calentada a 70°C). Incubar esta Solución caliente en la columna a temperatura ambiente durante 1 min. Centrifugar a 12.000 r.p.m. durante 1 min.



Añada 100
µl BE
1min,
12,000
rpm

9. Recuperar el filtrado (aproximadamente 100 µl) en el tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Utilizar 5 µl para la reacción de amplificación y guardar el resto a -20°C.

7.1.3. Protocolo de extracción automática de ADN

A continuación se proporcionan los protocolos que se recomienda seguir para el equipo Equipo NucliSENS BioMérieux easyMag y el Equipo BioSprint 96 de Qiagen.

7.1.3.1 Equipo NucliSENS BioMérieux easyMag

1. Preparación de la muestra para la lisis interna (se realiza dentro del equipo).

Torunda seca:

- Añadir 1,5 ml de suero salino (cloruro sódico 0,9%) al tubo que contiene la torunda y agitar vigorosamente en un vortex durante 1 minuto.
- Decantar el sobrenadante en un tubo de 1,5 ml.
- Transferir 1 ml a un pocillo de la cubeta (cada cubeta tiene 8 pocillos).

Suspensiones celulares (volúmenes inferiores a 3 ml):

- Agitar la muestra invirtiendo varias veces el vial en el que está contenida. Transferir 1 ml a un pocillo de la cubeta.

Medio de Captura de híbridos:

- Agitar la muestra invirtiendo varias veces el vial en el que está contenida. Transferir 0.5 ml a un pocillo de la cubeta.

2. Lisis interna y extracción del ADN: seguir la guía de usuario del equipo. Hay que indicar en el programa que el volumen de elución es 110 µl.

3. Una vez finalizada la extracción se toman con pipeta los 110 µl de ADN eluido y se introducen en tubos eppendorf de 1,5 ml. Utilizar 5 µl para la reacción de amplificación y guardar el resto a -20°C.

7.1.3.2 Equipo BioSprint 96 de Qiagen

PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES

Las soluciones han de tenerse preparadas antes de comenzar el proceso de extracción.

1. La proteasa se encuentra liofilizada. Antes de su uso añadir 4.4 ml del buffer indicado en la etiqueta, y a partir de este momento conservar a 4º C, hasta 2 meses.

2. Preparación Buffer AW1

Volumen AW1 concentrado (ml)	Volumen de Etanol 96% a añadir	Volumen Final (ml)
19	25	44
27	35	62
98	130	228

Nota: guardar a Tª ambiente. Antes de utilizar agitar la botella unas 5 veces.

3. Preparación Buffer AW2

Volumen AW2 concentrado (ml)	Volumen de Etanol 96% a añadir	Volumen Final (ml)
17	40	57
68	160	228

Nota: guardar a Tª ambiente. Antes de utilizar agitar la botella unas 5 veces.

4. Preparación de Tween 20 al 0.0002%.

H ₂ O RNasa free	30 ml	250 ml
Tween 20	6µl	50 µl

Nota: Una vez hecha la mezcla se guarda a 4º C.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. IMPORTANTE: Encender el thermomixer a 70ºC para la lisis con Proteasa.

Torunda seca:

Cortar e introducir el bastoncillo en un tubo de 1.5 ml. Añadir:

- 400 µl de buffer ATL
- 20 µl de Proteasa

Suspensiones celulares (volúmenes inferiores a 3 ml):

Citologías líquidas: agitar previamente en vortex y añadir a la placa (S-Block):

- 200 µl de muestra
- 20 µl de Proteasa

2. Incubar en el thermomixer 10 min. a 70ºC. Si la incubación se realiza en la placa, cubrir ésta con un film transparente y colocar encima una placa metálica previamente calentada a 70ºC. De esta manera se evita la condensación de la muestra y por tanto una posible contaminación.

3. Preparación de la master mix. Preparar volumen para una muestra extra por cada serie de 10.

Añadir los siguientes volúmenes:

Componentes	Volumen por muestra (µl)
Buffer AL	200
Isopropanol	200
MagAttract Suspension G	20

4. Dispensar las soluciones en las placas.

Se van a necesitar 6 S-Block y 2 Microplate MP.

En la Tabla 1 aparece el orden de carga de las placas en el equipo y los distintos volúmenes que hay que añadir a las placas.

Tabla 1.

Posición en el equipo	Placa	A añadir...	Volumen por pocillo (µl)
8	Microplate MP	Situar el soporte con el cobertor encima.	-----
7	Microplate MP	Buffer AE (Buffer de Elución)	100 ó 200
6	S-Block	H ₂ O RNasa free + Tween 20	500
5	S-Block	Buffer AW2(2)	500
4	S-Block	Buffer AW2(1)	500
3	S-Block	Buffer AW1(2)	500
2	S-Block	Buffer AW1(1)	500
1	S-Block	Muestras lisadas + Master mix (*)	200 + 420

(*)En el caso de torunda seca, antes de añadir el lisado se centrifugan brevemente las muestras. Añadir primero los 200 µl de muestra lisada y sobre ella los 420 µl de la master mix por pocillo. En el caso de haber lisado en placa, añadimos directamente los 420 µl de master mix a cada pocillo. En ambos casos, se mezcla con la pipeta.

5. Extracción.

- Una vez que están todas las placas preparadas con el volumen correspondiente, encender el equipo con el botón de encendido.

- Abrir la ventana protectora.
- Seleccionar mediante las flechas superior e inferior el programa “BS96_DNA_Swab” y se pulsa START.

Aparece un mensaje en el LCD pidiendo que se introduzca la placa de la posición 8 (ver tabla 1). Después de cargar la placa 8 presionar “Start”. El carrusel gira y aparece un mensaje pidiendo que se introduzca la placa de elución en la posición 7. Después de cargar la placa 7 presionar “Start”. Continuar el proceso hasta tener todas las posiciones cubiertas.

La Tabla 1 muestra la posición que debe ocupar cada una de las placas. Todas las placas deben quedar con las etiquetas hacia el interior.

- Una vez colocadas todas las placas se cierra la ventana protectora del Biosprint 96.
- El proceso de extracción durará unos 20 minutos. El ADN extraído se puede almacenar en la placa de elución (posición 7) a -20°C, tapando los pocillos con un film transparente. Si no se utiliza la placa entera, tomar el ADN extraído mediante pipeta e introducirlo en un tubo de 1,5 ml para el posterior almacenamiento a -20°C.

7.2. Reacción de Amplificación

7.2.1. Recomendaciones específicas para la amplificación

- Trabajar en el **área de pre-PCR**, siempre en el interior de una cabina con flujo laminar siguiendo las recomendaciones de la Sección 5.
- No usar temperaturas superiores a 37°C para la descongelación de los tubos de amplificación.
- Durante el proceso de adición de ADN, mantener los tubos en hielo.

7.2.2. Protocolo de Amplificación

1. Descongelar en hielo el número necesario de tubos según el número de muestras a procesar. Mantener a 4°C.
2. Centrifugar brevemente los tubos de amplificación para trasladar todo el líquido al fondo del tubo (en caso de no disponer de adaptadores de microcentrífuga para tubo, se pueden sustituir por tubos más grandes a los que se haya cortado la tapa).

3. Si el ADN ha sido obtenido de muestras incluidas en parafina, añadir 1,5 µl de Cloruro de Magnesio 25mM en los tubos de amplificación.
4. Añadir 5 µl de ADN extraído a cada uno de los tubos de amplificación. Resuspender varias veces con la pipeta. Mantener los tubos a 4°C.
5. Programar en el termociclador los siguientes ciclos de temperaturas:

1 ciclo	95°C 5 min
40 ciclos	94°C 30 seg 55°C 60 seg 72°C 90 seg
1 ciclo	72°C 8 min
4°C continuo hasta retirada del tubo	

6. Iniciar el programa y colocar los tubos de amplificación en el termociclador cuando la temperatura del bloque haya superado los 90°C. La duración de la amplificación es de unas 4 horas, aunque puede variar ligeramente dependiendo del termociclador.

7.3. Visualización del producto amplificado

7.3.1. Recomendaciones específicas para la visualización

1. La visualización ha de llevarse a cabo siempre en el área de post-PCR. No introducir nunca de nuevo el producto amplificado en las áreas de pre-PCR.
2. Asegurarse de que antes de comenzar la hibridación, el thermomixer de placas ha estado a 65°C durante al menos 1 hora.
3. Atemperar SH a temperatura ambiente.
4. Preparar TL diluido inmediatamente antes de su uso; no reutilizar soluciones preparadas con anterioridad.
5. Durante la preparación de las muestras para la visualización, han de usarse puntas con filtro diferentes para cada pocillo y cambiarse cada vez que se añada un reactivo.

6. En caso de emplear bombas de vacío para aspirar las soluciones, descontaminar con una solución de lejía diluida al 10% tras cada ensayo. Asegurarse de que la bomba aspira adecuadamente y no deja restos en el fondo del pocillo.
7. Tras la incubación con Solución CJ diluida, es esencial lavar en profundidad y rápidamente los pocillos del **CS**, para evitar que queden residuos que podrían ocasionar una precipitación inespecífica tras reacción con RE.
8. Dispensar todas las soluciones en la pared del pocillo del CS; nunca directamente sobre el fondo del mismo. Asimismo, aspirar completamente las diferentes soluciones de los pocillos del CS sin tocar el fondo del mismo con la punta. De lo contrario, podría dañarse el microarray.
9. No dejar secar el pocillo totalmente.
10. Evitar generar espuma al añadir reactivos.
11. Al visualizar la imagen en el CAR®, comprobar que aparecen los marcadores de posición y que no hay burbujas, fibras o manchas que interfieran en la lectura. En caso contrario, limpiar el fondo exterior del pocillo con un papel de celulosa impregnado en alcohol.

7.3.2. Protocolo de visualización

1. Encender el CAR® antes de iniciar todo el proceso. La auto-calibración del equipo puede durar unos minutos.
2. Desnaturalización de los productos de amplificación: Colocar los tubos de amplificación en el termociclador, e incubar a 95°C **durante 10 minutos exactos**. A continuación, sacar los tubos de la incubación a 95°C y colocarlos inmediatamente en un recipiente con hielo.
3. Preparación de Solución de Lavado: Para cada **CS** que se vaya a procesar, preparar 10 mL de TL diluido, diluyendo 1 mL de TL en 9 mL de agua destilada. Agitar suavemente.
4. Prelavado de los CS: Colocar los **CS** necesarios en el adaptador de placa microtiter. Añadir 200 µL de TL diluido a cada pocillo antes de usarlo. Resuspender 10-15 veces con la pipeta multicanal. Se recomienda realizar este lavado mientras tiene lugar la desnaturalización de los productos de amplificación, y mantener la solución de lavado en los **CS** hasta la adición de los dichos productos.

El array debe quedar sin restos de solución, aunque nunca debe permanecer seco durante mucho tiempo. Añadir la siguiente solución inmediatamente.

5. Hibridación: Una vez desnaturalizados los productos amplificados, retirar la solución de lavado de los pocillos con pipeta o preferiblemente con bomba de vacío. Inmediatamente después, añadir a cada pocillo 100 μL de SH atemperado a temperatura ambiente, evitando generar espuma.

Añadir a cada pocillo de CS, **5 μL** de producto amplificado desnaturalizado. Resuspender la solución varias veces, con cuidado de no tocar el fondo del pocillo.

Cubrir el adaptador de placa microtiter y los **CSs** con la tapa de plástico, e incubar en el thermomixer de placa durante **1 hora a 65° C, y 550 rpm**.

Después de la incubación, retirar la placa del thermomixer y aspirar la solución de incubación de los pocillos del CS con pipeta o bomba de vacío. El CS debe quedar sin restos de solución. Añadir la siguiente solución inmediatamente.

Programar el thermomixer a 30°C y en movimiento para su uso posterior en el paso 6 de más abajo. Para un descenso más rápido de la temperatura, se puede quitar la tapa.

6. Doble lavado: Añadir 200 μL de TL diluido a cada pocillo, resuspendiendo 10-15 veces con la pipeta multicanal. Aspirar la solución de lavado con pipeta o preferiblemente con bomba de vacío multicanal. Repetir. Usar puntas diferentes para cada pocillo en ambos lavados. Mantener las muestras en la solución de lavado hasta que el thermomixer alcance 30°C.
7. Bloqueo y conjugado: Se ha de preparar la Solución CJ diluida 15 minutos antes del fin de la hibridación, y mantener en hielo. Para ello, centrifugar la solución CJ durante 10 segundos antes de usarla y añadir **7.5 μL de CJ en 1 mL de DC** (cantidades adecuadas para un **CS**). A continuación, homogenizar la solución usando vórtex.

Aspirar el TL diluido de los pocillos sin dejar ningún resto, y añadir **100 μL** de Solución CJ diluida a cada pocillo. Incubar durante **15 minutos exactos en el thermomixer de placa a 30°C y 550 rpm**. Tras esta incubación, sacar la placa y retirar la solución rápidamente con pipeta o bomba de vacío multicanal. Dejar programado el thermomixer a 25°C y en movimiento para su utilización posterior en el paso 8. Para un descenso más rápido de la temperatura, se puede quitar la tapa.

8. Triple lavado: Inmediatamente después, eliminar la Solución CJ diluida, y añadir 200 μL de TL diluido a cada pocillo, resuspendiendo 10-15 veces con la pipeta multicanal. Aspirar el TL diluido con la pipeta o bomba de vacío procurando

eliminar el mayor volumen posible. Repetir la operación **dos veces más**. Es **muy importante** que no queden restos de Solución CJ diluida en los pocillos.

9. Revelado: Eliminar por completo el TL diluido de los pocillos. A continuación, añadir **100 µL** de RE a cada pocillo e incubar durante **10 minutos a 25°C** en el thermomixer **sin agitación**.

Retirar completamente la solución RE usando pipeta o bomba de vacío. Los pocillos deben quedar totalmente secos para la lectura. La lectura debe llevarse a cabo inmediatamente después de retirar RE.

10. Lectura: Colocar el adaptador de placa microtiter junto con el/ los CS/s a analizar en la bandeja del CAR®. El CAR® automáticamente llevará a cabo la lectura y emitirá un informe de resultados.

8. RESULTADOS

El procesamiento de los datos obtenidos a partir de cada uno de los análisis, se realiza de forma automática. El análisis de resultados y la emisión del informe correspondiente serán llevados a cabo de manera automática por el equipo CAR®.

Uno de los inconvenientes de la detección por amplificación genómica son los falsos negativos debidos, bien a una calidad inadecuada del ADN de la muestra (por toma de cantidad insuficiente de muestra, por degradación del ADN debida a una inadecuada conservación o por pérdida del ADN de la muestra durante su extracción), o bien a la presencia de inhibidores de la ADN polimerasa en las muestras en las que se quiere analizar la presencia del virus (hemoglobina, restos de parafina, sales, etc.). Con el kit **CLART® HPV 3** se han eliminado estos falsos negativos añadiendo dos controles internos en cada tubo de reacción:

- Un control interno de ADN genómico, necesario para la confirmación de un verdadero resultado negativo, ya que nos informa de la presencia de ADN del paciente en la muestra aunque no haya habido amplificación de ningún tipo de VPH.
- Un control interno de amplificación, el cual nos permitirá distinguir entre los casos de inhibición de la reacción de PCR y aquéllos en los que no se encontró ADN en la muestra.

Cada tubo de reacción contiene los siguientes oligos:

- Un par de oligonucleótidos que amplifican un fragmento del gen CFTR humano. Éste es el control de extracción de ADN genómico o control del ADN del paciente.
- Un par de oligonucleótidos que amplifican un plásmido modificado incluido en el tubo de amplificación y que se usa como control de amplificación de la reacción de PCR.
- Oligonucleótidos específicos de VPH.

Los tubos de amplificación se han diseñado para favorecer la amplificación de VPH frente a la de los controles. Además, la amplificación del control de ADN genómico prima sobre la del control de la reacción de amplificación.

En ciertas condiciones (ej. cuando hay un elevado número copias de un virus de VPH o cuando la muestra presenta varios tipos de VPH a la vez) puede suceder que no se amplifiquen los dos controles o alguno de ellos y aparezca una lectura de “SIN SEÑAL”.

A continuación se describen los distintos resultados que se pueden obtener con el Kit:

RESULTADO VÁLIDO:

RESULTADO para algún genotipo	CONTROLES GENÓMICO/AMPLIFICACIÓN	INTERPRETACIÓN
√. POSITIVO	√ CONFORME	POSITIVO
√. POSITIVO	√ Ctrl GENOM, Sin señal Ctrl AMPLIF.	POSITIVO
√. POSITIVO	Sin señal Ctrl GENOM, √ Ctrl AMPLIF.	POSITIVO
x. NEGATIVO	√ CONFORME	NEGATIVO
x. NEGATIVO	√ Ctrl GENOM, Sin señal Ctrl AMPLIF.	NEGATIVO

RESULTADO NO VÁLIDO:

RESULTADO para algún genotipo	CONTROLES GENÓMICO/AMPLIFICACIÓN	INTERPRETACIÓN
x. NEGATIVO	Sin señal Ctrl GENOM, Sin señal Ctrl AMPLIF.	PCR Inhibida
x. NEGATIVO	Sin señal Ctrl GENOM, √ Ctrl AMPLIF.	Ausencia de ADN en la muestra

RESULTADO NO CONCLUYENTE para un tipo.

CAUSA:

- Las tres réplicas de una misma sonda arrojan valores muy diferentes entre sí.
- En coinfecciones para aquellos virus que se encuentren en el límite de detección de la técnica.

RESULTADO NO CONCLUYENTE para todos los tipos:

INTERPRETACIÓN	CAUSA	SOLUCIÓN
NO HAY ADN	Se debe a que no hay ADN en la muestra.	Repita la técnica desde la extracción o bien pedir al facultativo una nueva toma de muestra al paciente.
PCR INHIBIDA	Esto se debe a que algunas sustancias pueden inhibir la reacción de PCR al perjudicar la actividad de la enzima ADN polimerasa.	Verifique que en las muestras o en el material genético extraído no hay presencia de ninguna de estas sustancias. En la mayoría de los casos se recomienda repetir la extracción o, si esto no es posible, pedir al facultativo una nueva toma de muestra al paciente.

9. ESPECIFICACIONES TÉCNICAS Y DE FUNCIONAMIENTO

9.1. Control de interferencias conocidas

Existen sustancias que pueden interferir en el funcionamiento del sistema **CLART® HPV 3**. Principalmente, son sustancias que inhiben la ADN polimerasa y, por tanto, la reacción de amplificación. Las interferencias más conocidas son:

1 Presencia de hemoglobina o parafina. Tanto el ADN extraído a partir de frotis cervicovaginales como el obtenido a partir de muestras de tejidos incluidos en parafina puede contener restos de hemoglobina. Éste último, también restos de parafina. Ambos, añadidos al tubo de amplificación pueden provocar una inhibición. No obstante, si se siguen los protocolos de extracción de ADN que se indican en la Sección 7.1, se minimizan estos efectos.

2 Presencia de ácido acético o iodina en la muestra a analizar. Si la toma de muestra para el análisis con el sistema **CLART® HPV 3** se realiza después de una colposcopia, la muestra puede contener ácido acético o iodina, que inhiben la PCR. Para evitar esto, habrá que realizar la toma de muestra previamente a la colposcopia.

3 Utilización de muestras no adecuadas. El análisis de cualquier otro tipo de muestra clínica distinta a las indicadas en el manual para cada formato del sistema **CLART® HPV 3**, así como una toma incorrecta de las muestras, puede conllevar que el resultado del análisis no sea concluyente. Por ejemplo, si la torunda ha sido incluida en algún tipo de medio, la amplificación por PCR puede resultar inhibida.

4 La conservación inadecuada de las muestras puede influir en el resultado del análisis. Si las muestras se someten a condiciones que puedan provocar una degradación del ADN que contienen, por ejemplo, un exceso en el tiempo de fijación en formol, el resultado del análisis será de muestra inhibida por falta de amplificación del control del ADN de la muestra.

5 Actividad residual de la Proteinasa K. En el proceso de extracción de ADN, se tiene que inactivar la Proteinasa K mediante incubación a 70 °C durante 10 minutos. En estas condiciones, la inactivación se produce de forma completa. Si este paso fuera omitido o las condiciones de inactivación fueran menos estrictas, podría perdurar una actividad residual de la Proteinasa K, lo cual podría resultar en degradación de la ADN polimerasa y, por tanto, en inhibición de la PCR.

9.2. Especificaciones técnicas

9.2.1. Parámetros analíticos

Sensibilidad analítica.

La sensibilidad analítica se determinó mediante amplificación específica de la región L1 para los diferentes genotipos de VPH clonados en plásmidos recombinantes (columnas “10² copias” y “10 copias”). La sensibilidad para los tipos indicados en la tabla en la columna “50 copias” también fue determinada a partir de la detección de muestras del programa de evaluación de herramientas de laboratorio para el tipado del VPH, de la organización mundial de la salud OMS (2015 WHO HPV LabNet Proficiency Study of HPV DNA Typing).

GENOTIPO VPH	10 ² copias	50 copias*	10 copias
6	100%		40%
11	100%		60%
16	100%	100%	80%
18		100%	
26	100%		80%
31	100%		80%
33	100%		80%
35			100%
39			100%
45	100%		60%
51	100%		80%
52	100%		80%
53	100%		80%
56			100%
58			100%

59	100%		80%
66			100%
68	100%		80%
82			100%

N=95 * Datos expresados en equivalentes genómicos.

Tabla 2. Sensibilidad analítica del kit *CLART® HPV2/ HPV3*

Dado el significado clínico de los genotipos de VPH 16 y 18, se han incluido los datos de sensibilidad para esos tipos obtenidos a partir de la detección de muestras del programa de evaluación de herramientas de laboratorio para el tipado del VPH de la organización mundial de la salud OMS. Este programa compara y evalúa las diferentes metodologías de detección de VPH comerciales disponibles para una efectiva implementación y monitorización de los programas de vacunación para VPH. Basándose en este programa, se considera una herramienta como apta para el diagnóstico si detecta al menos 50 unidades internacionales (equivalentes genómicos o copias) de los tipos de VPH 16 y 18, hecho demostrado con el kit *CLART® HPV2/ HPV3*.

Para los 14 genotipos incluidos en HPV3 distintos de los que ya estaban incluidos en HPV2 (ver tabla 2), se ha evaluado la sensibilidad analítica de los dos genotipos más prevalentes, 34 y 74. En ambos, la sensibilidad analítica es de 10^2 copias.

Especificidad analítica.

La especificidad analítica del kit *CLART® HPV3* es de un 100%. Con el kit *CLART® HPV3*, no se produce detección inespecífica de otros virus diferentes al que se quiere determinar.

9.2.2. Parámetros de utilidad diagnóstica

Para determinar los parámetros de utilidad diagnóstica del sistema *CLART® HPV3*, se han realizado estudios comparativos frente a la versión antigua del mismo producto.

Dichos estudios se llevaron a cabo en colaboración con dos hospitales españoles y uno portugués.

- Servicio de Microbiología del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona.
- Unidad de Virología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca.
- Departamento de enfermedades infecciosas. Instituto Nacional de Salud Ricardo Jorge, I. P. Lisboa (Portugal).

Se analizaron 386 muestras de las cuales 9 fueron torundas secas, 25 tejidos incluidos en parafina y 352 citologías líquidas.

En la Tabla 3 se ilustran los datos de sensibilidad y especificidad diagnósticas para los tipos de VPH detectados por el kit **CLART® HPV2/ HPV3**:

Tipo HPV	Sensibilidad	Especificidad	Tipo HPV	Sensibilidad	Especificidad
6	100,00	100,00	56	100,00	100,00
11	100,00	100,00	58	100,00	100,00
16	100,00	99,70	59	100,00	99,73
18	100,00	100,00	61	100,00	100,00
26	100,00	100,00	62	100,00	99,47
31	100,00	100,00	66	100,00	100,00
33	100,00	99,73	68	100,00	98,35
35	100,00	99,74	70	100,00	100,00
39	100,00	100,00	71	100,00	100,00
42	100,00	99,47	73	100,00	99,74
43	100,00	99,50	81	100,00	100,00
44	100,00	100,00	82	94,44	99,48
45	100,00	99,74	83	100,00	100,00
51	100,00	100,00	84	100,00	100,00
52	100,00	100,00	85	100,00	100,00
54	100,00	100,00			

Tabla 3. Parámetros diagnósticos de **CLART® HPV3**

Para los 14 genotipos incluidos en HPV3 distintos de los que ya estaban incluidos en HPV2 (ver tabla 3), se han evaluado los parámetros diagnósticos con el siguiente estudio:

Se han analizado 678 muestras, de ellas 213 eran positivas para alguno de los genotipos detectados en HPV2 (todos los genotipos están representados), y 465 eran negativas.

De las 678 muestras analizadas, 10 muestras han resultado positivas para alguno de los nuevos genotipos, concretamente para los genotipos 34, 67, 87 y 102.

Para los restantes genotipos, no ha encontrado ninguna muestra positiva.

La especificidad diagnóstica es del 100% para los 14 nuevos tipos.

10. REFERENCIAS

Alameda, F., Bellosillo, B., Fusté, P., Musset, M., Marifloso, M-L., Mancebo, G., Lopez-Yarto, M.T., Carreras, R., Serrano, S.: "Human papillomavirus Detection in Urine Samples: An alternative screening method". American Society for Colposcopy and cervical pathology of the lower Genital Tract disease, Volume 17, Number 1, 2007, 5-7.

Bosch, F.X., Lorincz, A., Muñoz, N., Maijer, C.J.L.M. and Shah K.V.: "The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer". J. Clin. Pathl. 55, 244-265 (2002).

Calleja-Macías, I.E., Villa, L.L., Prado, J.C. et al. "Worldwide genomic diversity of the high-risk human papillomavirus types 31, 35, 52, 58, for close relatives of human papilloma virus type 16". Journal of Virology. 79, 13630-13640 (2005).

De Villiers, E.M.: "Heterogeneity of the human papillomavirus group". J. Virol. 63, 4898-4903 (1989).

Dunne, E.F., Unger E.R., Sternberg m., McQuillan G., Swan D.C., Patel S.S., Markowitz L.E.: "Prevalence of VPH infection among females in the United States". JAMA, February 28, 2007-Vol 297, nº 8.

Flavio, L.: "VPH genotyping: are different hybridization methods comparable in detecting high risk infections?" 23rd International papillomavirus conference and clinical workshop. September 2006. Praga.

Galan, F., Anaya, B., Rodriguez-Iglesias, M.A.: "Comparison of three hybridization methods for the human papillomavirus genotyping". EUROGIN. April 2006. Paris.

Galan, F., Anaya, B., Fomán, M., Rodriguez-Iglesias, M.A.: "Comparison of an Array System versus hybridization Reverse in the Human Papillomavirus Genotyping". Women and Infectious diseases. March 2006. Athlanta.

Gomez-Roman, J.J., Echevarria, C., Salas, S. : "A type-specific study of Human Papillomavirus incidente in Cervico-vaginal samples in three different Spanish regions". APMIS, 117: 22-27.

Kjær S.K., Frederiksen K., Munk C., Iftner T. Long-term Absolute Risk of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 3 or Worse Following Human Papillomavirus Infection: Role of Persistence. J Natl Cancer Inst. 2010 Sep 14.

Manos, M.M., Ting, Y., Wright, D.K., Lewis, A.J., Broker, T.R. y Wolinsky, S.M.: "Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus". Cancer Cells 7, 209-214 (1989).

Muñoz, N., Bosch, X., Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K.V., Snijders, P.J.F. y Meijer, C.J.L.M.: "Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer". N. Engl. J. Med. 348, 518-527 (2003).

Perez, C., Velasco, J., Alonso, J., Solares, C., Tardón, A., Pinto, J., Iglesias, E.: Comparison of the performance of two VPH ADN Genotyping methods from paraffin-embedded cervical tissues". 23rd International papillomavirus conference and clinical workshop. September 2006. Praga.

Perez, C., Velasco, J., Alonso, J., Solares, C., Tardón, A., Pinto, J., Iglesias, E.: Prevalence of humana papillomavirus types in invasive squamous cell carcinomas and adenocarcinomas between 1998 and 2005 in area sanitaria III of principality of Asturias". 23rd International papillomavirus conference and clinical workshop. September 2006. Praga.

G. Ronco, P. Giorgi-Rossi, F. Carozzi, M. Confortini, P. Palma, A. Mistro, B. Ghiringhella, S. Girlando, A. Gillio-Tos, L. Marco, C. Naldoni, P. Pierotti, R. Rizzolo, P. Schincaglia, M. Zorzi, M. Zappa, N. Segnan, J. Cuzick. "Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial". Lancet Oncol. 2010 Mar;11(3):249-57.

Santos Salas, J., González Morán, M.A., González Medina, A., Martín, Polo, R. Hernando Martín, M., Ribas Ariño, M.T.: "Asociación de mas de un tipo de VPH en lesiones displásicas de cervix". En publicación.

Suarez Moya, A., Esquivias Gómez, J.I., Vidart Aragón, J.A. Picazo de la Garza, J.J.: "Detección y tipificación mediante biología molecular del virus del Papilloma humano en muestras genitales". Rev. Esp. Quimioterap., Junio 2006; Vol. 19 (Nº2); 161-166.

Verdasca, N.; A. Coelho; F. Ribeiro; A. Pista.: "Detection of VPH ADN from cervical samples in a group of portuguese women: comparison of two VPH genotyping assays". 24th internacional papillomavirus conference and clinical workshop, Nov 3-9, 2007, Beijing, P.R.China."

Verdasca, N., A. Coelho, F. Ribeira, A. Pista.: "Detection of VPH ADN from cervical samples in a group of portuguese women: comparison of two VPH genotyping assays". 23rd International papillomavirus conference and clinical workshop. September 2006. Praga.

Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K.V., Snijders, P.J., Peto, J., Meijer, C.J., Munoz, N.: "Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide". Journal of Pathology 189, 12-19 (1999).

Anexo I: Tabla con clasificación según riesgo oncogénico* de los tipos de VPH que se detectan con el kit **CLART® HPV3**.

TIPO	RIESGO ONCOGÉNICO *
VPH 6	Bajo Riesgo
VPH 11	Bajo Riesgo
VPH 16	Alto Riesgo
VPH 18	Alto Riesgo
VPH 26	Alto Riesgo Probable
VPH 31	Alto Riesgo
VPH 33	Alto Riesgo
VPH 35	Alto Riesgo
VPH 39	Alto Riesgo
VPH 40	Bajo Riesgo
VPH 42	Bajo Riesgo
VPH 43	Bajo Riesgo
VPH 44	Bajo Riesgo
VPH 45	Alto Riesgo
VPH 51	Alto Riesgo
VPH 52	Alto Riesgo
VPH 53	Alto Riesgo Probable
VPH 54	Bajo Riesgo

TIPO	RIESGO ONCOGÉNICO *
VPH 56	Alto Riesgo
VPH 58	Alto Riesgo
VPH 59	Alto Riesgo
VPH 61	Bajo Riesgo
VPH 62	Bajo Riesgo
VPH 66	Alto Riesgo
VPH 68	Alto Riesgo
VPH 70	Bajo Riesgo
VPH 71	Bajo Riesgo
VPH 72	Bajo Riesgo
VPH 73	Alto Riesgo Probable
VPH 81	Bajo Riesgo
VPH 82	Alto Riesgo Probable
VPH 83	Bajo Riesgo
VPH 84	Bajo Riesgo
VPH 85	Bajo Riesgo
VPH 89	Bajo Riesgo

* Clasificación del riesgo oncogénico según: *Bouvar et al. A review of human carcinogens -Part B: biological agents. Lancet Oncol. 2009, 10(4):321 322.*