



CLART® HPV4

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

CLART® HPV4

CLART®, CLART-Strip®, CAR®, SAICLART® y AUTOCLART® 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 8
Febrero 2019

Contenido

1. GLOSARIO DE TÉRMINOS	4
2. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA DE DETECCIÓN	5
3. COMPONENTES Y CONSERVACIÓN DEL KIT	7
3.1. Reactivos de amplificación.....	7
3.2. Componentes de visualización	7
3.3 Otros componentes.....	8
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	12
7.1. Procesamiento de la muestra sin necesidad de extracción de ADN.	13
7.2. Reacción de Amplificación	14
7.2.1. Recomendaciones específicas para la amplificación	14
7.2.2. Protocolo de Amplificación	14
7.3. Visualización del producto amplificado	15
7.3.1. Recomendaciones específicas para la visualización.....	15
7.3.2. Protocolo de visualización manual.....	16
7.3.3. Protocolo de visualización en autoclart®	17
7.3.4. Protocolo de visualización en autoclart® plus.....	19
8. RESULTADOS	24
9. ESPECIFICACIONES TÉCNICAS Y DE FUNCIONAMIENTO.....	26
9.1. Control de interferencias conocidas	26
9.2. Especificaciones técnicas	26
9.2.1. Parámetros analíticos.....	26
Sensibilidad analítica	26
9.2.2. Parámetros de utilidad diagnóstica.....	27
10. REFERENCIAS	30

1. GLOSARIO DE TÉRMINOS



Atención, ver instrucciones de uso



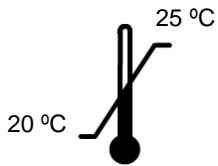
Fecha de caducidad



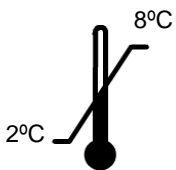
Producto sanitario para Diagnóstico *In Vitro*



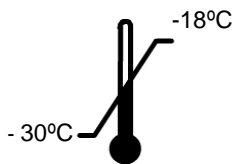
Lote



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® HPV4 se presenta en los dos siguientes formatos:

- **CLART® HPV4**, capaz de detectar la presencia de los 35 tipos del virus del papiloma humano (VPH) con mayor importancia clínica (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 68a y b, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 85 y 89);
y
- **CLART® HPV4S**, capaz de detectar la presencia de los 16 tipos siguientes de VPH: 14 tipos de alto riesgo oncogénico (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) y 2 tipos de bajo riesgo oncogénico (6 y 11).

Ambos formatos permiten llevar a cabo la detección tanto a partir de frotis como de suspensiones celulares (ver Apartado 6).

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.

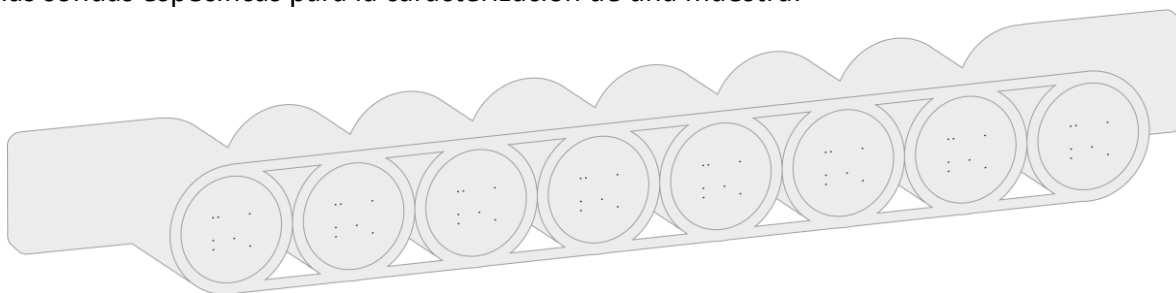


Figura 1. CLART-Strip® en forma de tira de 8 pocillos.

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, inmobilizadas 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. Alternativamente, se puede emplear el autoclart® plus (ver apartado 8).

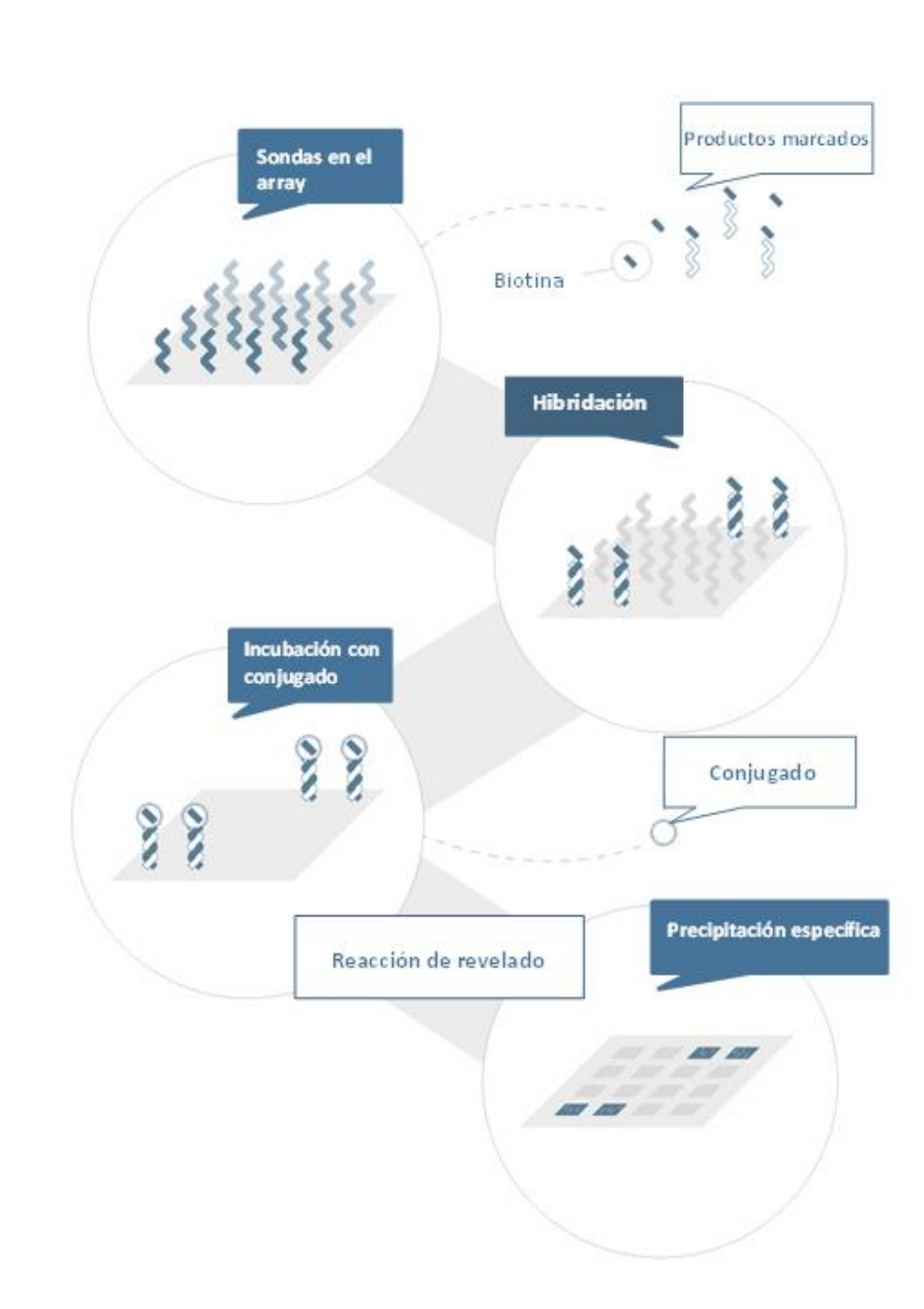


Figura 2. Esquema del Sistema de detección. Las sondas inmovilizadas en la superficie del microarray capturan sus respectivos productos de amplificación complementarios, marcados con biotina. A continuación tiene lugar la unión de la biotina con el conjugado de estreptavidina-peroxidasa, seguida de una 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® HPV4**, en sus dos formatos, contiene suficientes reactivos para el análisis de 16, 48 ó 96 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 amplificación

Envío y almacenaje a -20°C.

Existen dos posibles formatos:

- Tubos de Amplificación.
- Placa de Amplificación.

Tanto los tubos de amplificación como los pocillos de placa contienen 45 µl de mezcla de reacción. Se envían listos para su uso. Sólo se debe descongelar 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.

3.2. 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.**

3.3 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)

- **autoclart**[®] de GENOMICA.

Posibilita el procesamiento automático de hasta 12 tiras de **CSs** (96 muestras) durante la fase de visualización.

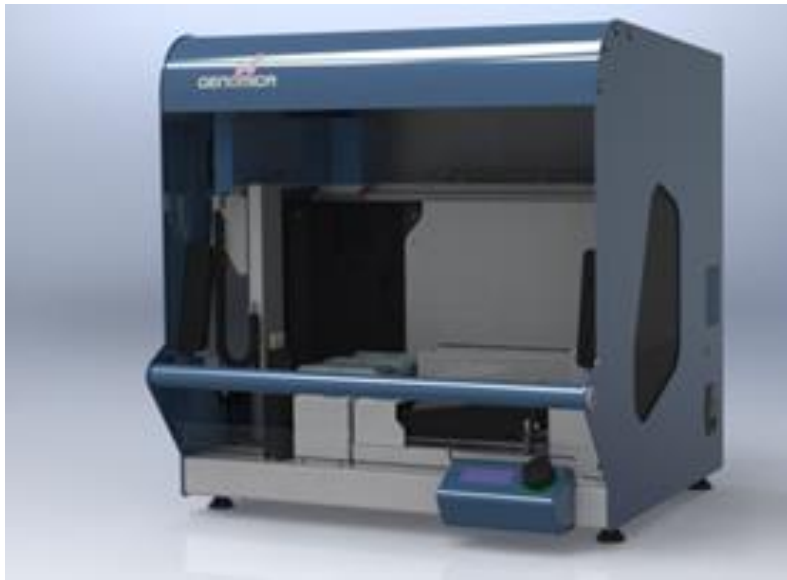


Figura 4. autoclart®

- **autoclart® plus** de GENOMICA.

Es un equipo electromédico totalmente automatizado capaz de analizar hasta 96 muestras al mismo tiempo, desde el producto desnaturalizado hasta la emisión del informe diagnóstico.

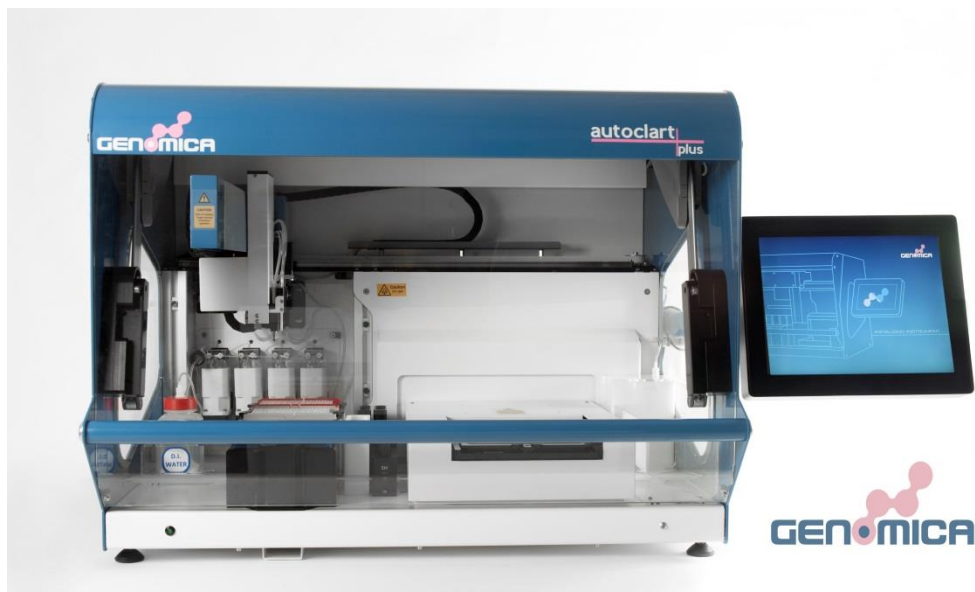


Figura 5. autoclart® plus

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.
- 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. Esta técnica únicamente ha sido validada en termocicladores con rampas estándar, no rápidas.
- 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 25°C, 30°C y 65°C.
- Vórtex.
- Bomba de vacío (opcional).

5. RECOMENDACIONES GENERALES Y PROCEDIMIENTOS DE MANIPULACIÓN

Léase detenidamente para evitar contaminaciones.

1. La técnica CLART® HPV4 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 y la adición de material de las mismas a los tubos/ placas 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 dicha 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/ placa 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 termomixers 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® HPV4** permite analizar los 2 tipos siguientes 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. 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.

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

7. PROTOCOLO DE TRABAJO

El kit **CLART® HPV4** ha sido diseñado y validado para los siguientes usos:

	Amplificación a partir de muestra directa.	Amplificación a partir de DNA extraído.
Visualización manual	Torunda seca Captura de Híbridos ThinPrep® SurePath®	En todos los sistemas de visualización
Visualización en autoclart®	Torunda seca Captura de Híbridos ThinPrep® SurePath®	
Visualización en autoclart® plus	Torunda seca	

Elija el protocolo que mejor se ajuste a sus necesidades, y proceda de acuerdo con las instrucciones de uso correspondientes.

- Amplificación a partir de muestra directa. Ténganse en cuenta los protocolos de más abajo.
- Amplificación a partir de DNA extraído. En este caso, se recomienda verificar que el proceso de extracción elegido es adecuado a la técnica *CLART*[®].

7.1. Procesamiento de la muestra sin necesidad de extracción de ADN.

7.1.1. Torunda seca

- Añadir 1-1.5 ml de suero salino cuando se vaya procesar, nunca antes. Dar un vórtex como mínimo de 30 segundos. Ya está listo para la reacción de amplificación. No es aconsejable un segundo uso de la mezcla del suero con las células.

7.1.2. Specimen Transport Medium™ Digene, Medio de Captura de Híbridos

- Tomar 200 µl de muestra en un tubo de 1.5 ml.
- Centrifugar 1 min a 4.000rpm. Retirar el sobrenadante.
- Añadir 1 ml de suero salino, vortexear bien y mezclar, centrifugar 1 min a 4.000rpm. Retirar el sobrenadante.
- Añadir 1 ml de suero salino, vortexear bien y mezclar, centrifugar 1 min a 4.000rpm. Retirar el sobrenadante.
- Resuspender en 50 µl de agua DNAsa free.

7.1.3. Suspension celular_ ThinPrep[®]

- Tomar 400 µl de suspensión celular en un tubo de 1.5ml.
- Centrifugar 1 min a 13.000rpm. Retirar el sobrenadante.
- Resuspender en 400 µl de Suero Salino.
- Centrifugar 1 min a 13.000rpm. Retirar el sobrenadante.
- Resuspender en 25 µl de agua DNAsa free.

7.1.4. Suspension celular_SurePath[®]

- Tomar 800µl de suspensión celular en un tubo de 1.5ml
- Centrifugar 1 min a 13000rpm. Desechar el sobrenadante.
- Resuspender en 1000µl de suero salino.
- Centrifugar 1 min a 13000rpm. Desechar el sobrenadante.
- Resuspender en 1000µl de suero salino.
- Centrifugar 1 min a 13000rpm. Desechar el sobrenadante.
- Resuspender en 25µl de agua DNAsa free.

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 y siguiendo las recomendaciones de la Sección 5.
- No usar temperaturas superiores a 37°C para la descongelación de los tubos/ placas de amplificación.

7.2.2. Protocolo de Amplificación

1. Descongelar en hielo el número necesario de tubos/ placas de amplificación según el número de muestras a procesar. Mantener a 4°C.
2. Centrifugar brevemente los tubos/ placas de amplificación para trasladar todo el líquido al fondo del tubo (en caso de no disponer de adaptadores de microcentrifuga para tubo, se pueden sustituir por tubos más grandes a los que se haya cortado la tapa).
3. Añadir 5 µl de muestra directa o de ADN extraído a cada uno de los tubos de amplificación o pocillos de la placa. Mantener los tubos/ placa a 4°C.
4. Programar en el termociclador los siguientes ciclos de temperaturas:

1 ciclo	98°C 5 min
45 ciclos	98°C 15 seg 55°C 15 seg 72°C 30 seg
1 ciclo	72°C 1,0 min
4°C continuo hasta retirada del tubo/ placa	

5. Iniciar el programa y colocar los tubos/ placa de amplificación en el termociclador. La duración de la amplificación es de unas 2 horas, aunque puede variar ligeramente dependiendo del termociclador. Esta técnica únicamente ha sido validada en termocicladores con rampas estándar, no rápidas.

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 30 minutos.
3. Atemperar SH a temperatura ambiente hasta la desaparición de los cristales. En el caso de éstos no desaparezcan del todo, introducir la botella en el thermomixer mientras se calienta para la hibridación.
4. No añadir SH a los pocillos del CS hasta que la desnaturalización haya concluido.
5. Preparar TL diluido inmediatamente antes de su uso; no reutilizar soluciones preparadas con anterioridad.
6. 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.
7. Emplear bombas de vacío para aspirar las soluciones, y 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.
8. 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.
9. 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.
10. No dejar secar el pocillo totalmente.
11. Evitar generar espuma al añadir reactivos.
12. 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.

La visualización puede llevarse a cabo de manera Manual (apartado 7.3.2), en “autoclart®” (apartado 7.3.3) y en “autoclart® plus” (apartado 7.3.4).

7.3.2. Protocolo de visualización manual

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/ placa en el termociclador, e incubar a 95°C **durante 10 minutos exactos**. A continuación, sacar los tubos/ placa de la incubación a 95°C y colocarlos inmediatamente en un recipiente con hielo o a 4°C.
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, **10 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 **30 minutos 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 una 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 de 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 **9 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 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.

7.3.3. Protocolo de visualización en autoclart®

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/ placa en el termociclador, e incubar a 95°C **durante 10 minutos exactos**. A continuación, sacar los tubos/ placa de la incubación a 95°C y colocarlos inmediatamente en un recipiente con hielo o a 4°C.
3. Encender el equipo autoclart® y seguir las instrucciones que aparecen en la pantalla.
4. Cerrar la puerta y pulsar el mando.
5. Seleccionar “Run” en el menú de inicio.
6. Seleccionar el tipo de ensayo a realizar: **CLART® HPV 4 o CLART® HPV 4S**
7. Seleccionar el pocillo de la tira en el que se desea comenzar: A1 o E1, éste último en el caso de que se reutilice un CS donde se hayan procesado previamente los 4 primeros pocillos.
8. Seleccionar el número de muestras. Con autoclart® se pueden procesar desde 4 a 96 muestras. El número de muestras debe ser un múltiplo de 4.
9. Verificar que el número de muestras y el pocillo de inicio (A1 o E1) indicados son correctos.
10. Colocar el rack completo de puntas en su posición correspondiente.
11. Chequear que el contenedor de puntas y el contenedor de desecho de reactivos están vacíos.
12. Llenar la botella de agua destilada con 250 ml de agua destilada.
13. Añadir los volúmenes de reactivos que autoclart® solicita en función del número de muestras que se quieran procesar:

TL. El volumen que aparece en la pantalla indica la cantidad de TL diluido necesaria. Para prepararlo realizar una dilución 1:10 de TL en agua destilada.

SH. Añadir el volumen de SH atemperada que aparece en la pantalla.

CJ. Centrifugar la solución CJ durante 10 segundos antes de usarla. A continuación preparar la Solución CJ diluida que indique la pantalla. Para ello añadir 9 µL de CJ en 1 mL de DC (cantidades adecuadas para un CS). Se debe dar un vórtex a la solución una vez diluida para homogenizar.

RE. Añadir el volumen de RE indicado en la pantalla.

14. Cerrar la puerta y pulsar el mando para comenzar. El equipo realizará el pre-lavado de los CS y la adición de SH; a continuación emitirá un pitido para indicar que es el momento de la adición de las muestras; el pitido cesará cuándo el usuario abra la puerta del equipo.
15. Para añadir las muestras, sacar los **CSs** del autoclart® y añadir **10 µl** de producto amplificado desnaturalizado a cada pocillo del CS. Resuspender varias veces para que se mezcle con SH, con cuidado de no tocar el fondo del pocillo. A continuación, introducir de nuevo la placa en el autoclart® y pulsar el mando para que continúe el proceso de visualización.
16. Cuando ha terminado el proceso de visualización, el autoclart® emite un pitido hasta que el usuario abre la puerta del equipo para sacar los CS y proceder a la lectura en el CAR®. Leer de manera inmediata.
17. Coloque la placa en el CAR® para tomar las imágenes de todos los pocillos. El CAR® automáticamente llevará a cabo la lectura y emitirá un informe de resultados.

7.3.4. Protocolo de visualización en autoclart® plus

El equipo puede ser utilizado de tres formas, dependiendo de las necesidades del cliente. Para más información ver más abajo y también el Manual de usuario del “autoclart® plus.

A) Con adición automática de la muestra. Exclusivo para placas.

1. Encender el equipo autoclart® plus y seguir las instrucciones que aparecen en la pantalla.
2. Seleccionar “Nuevo análisis” en el menú inicio.
3. Indicar el número de **CSs** necesarios presionando las cruces que aparecen en la fila superior.
4. Seleccionar el tipo de ensayo “HPV-4” o “HPV-4S” de los listados. Para llevar a cabo el mismo ensayo en todos los **CSs** presione “Auto Select”. Después pulse la flecha de dirección derecha para continuar.

5. En la pantalla de Configuración del análisis seleccionar “**Adición automática de la muestra**” y pulse la flecha de dirección derecha para continuar.
6. El instrumento comenzará el paso de acondicionamiento de temperaturas. Para ello aparecerán en pantalla una serie de requisitos; pulse la flecha de dirección para aceptarlos.
7. Colocar los racks completos de puntas de 10 µl y de 1000 µl para dispensar los reactivos.

Nota: Tenga en cuenta que en este momento comienza la refrigeración de los reactivos. Cuando termina, el equipo emite una señal acústica.

8. Desnaturalización: utilizar el termociclador para desnaturalizar los productos de amplificación. Colocar la placa en el termociclador cuando éste haya alcanzado 95°C, e incubar los tubos durante **10 minutos**. Sacar la placa de la incubación a 95°C y colocarla inmediatamente en un recipiente con hielo.
9. Colocar el soporte con el número requerido de **CSs** en el equipo.
10. Chequear que el contenedor de puntas y el contenedor de desecho de reactivos están vacíos y continuar.
11. Llenar la botella de agua con 250 ml de agua destilada, pulsar siguiente paso.
12. Añadir los volúmenes de reactivos que autoclart® plus solicita en función del número de muestras que se quieran procesar.

TL. El volumen que aparece en la pantalla indica la cantidad de Solución de Lavado necesaria. Para preparar la Solución de Lavado, realizar una dilución 1:10 del TL en agua destilada.

SH. Añadir el volumen de SH atemperada que aparece en la pantalla.

CJ. Se recomienda centrifugar el CJ durante 10 segundos antes de usarse. Cada 1 ml de solución CJ diluida que indique la pantalla, se prepara añadiendo 1 ml de DC y 5µl de Solución CJ. Se debe dar un vórtex a la solución una vez diluida para homogenizar.

RE. Añadir el volumen de RE indicado en la pantalla.

13. Colocar la placa de amplificación en el autoclart® plus.

14. Cerrar la puerta y pulsar “inicio” para comenzar.
15. Cuando ha terminado el proceso de visualización y lectura el autoclart® plus emite una señal acústica para indicar la finalización del test.

B) Con adición manual de la muestra

1. Encender el equipo autoclart® plus y seguir las instrucciones que aparecen en la pantalla.
2. Seleccionar “Nuevo análisis” en el menú inicio.
3. Indicar el número de **CSs** necesarios presionando las cruces que aparecen en la fila superior.
4. Seleccionar el tipo de ensayo “HPV-4” o “HPV-4S” de los listados. Para llevar a cabo el mismo ensayo en todos los **CSs** presione “Auto Select”. Después pulse la flecha de dirección derecha para continuar.
5. En la pantalla de Configuración del análisis seleccionar “Adición manual de la muestra” y pulse la flecha de dirección derecha para continuar.
6. El instrumento comenzará el paso de acondicionamiento de temperaturas. Para ello aparecerán en pantalla una serie de requisitos; pulse la flecha de dirección para aceptarlos.
7. Colocar los racks completos de puntas de 1000 µl para dispensar los reactivos.

¡ADVERTENCIA! Las puntas de 10 µl para la adición de muestras NO SON NECESARIAS.

Nota: Tenga en cuenta que en este momento comienza la refrigeración de los reactivos. Cuando termina, el equipo emite una señal acústica.

8. Desnaturalización: utilizar el termociclador para desnaturalizar los productos de amplificación. Colocar los tubos amplificados/ placa en el termociclador, e incubar a 95°C durante 10 minutos. Sacar los tubos/ placa de la incubación a 95°C y colocarlos inmediatamente en un recipiente con hielo.
9. Colocar el soporte con el número requerido de **CSs** en el equipo.
10. Chequear que el contenedor de puntas y el contenedor de desecho de reactivos están vacíos y continuar.

11. Llenar la botella de agua con 250 ml de agua destilada, pulsar siguiente paso.
12. Añadir los volúmenes de reactivos que autoclart® plus solicita en función del número de muestras que se quieran procesar.

TL. El volumen que aparece en la pantalla indica la cantidad de Solución de Lavado necesaria. Para preparar la Solución de Lavado, realizar una dilución 1:10 del TL en agua destilada.

SH. Añadir el volumen de SH atemperada que aparece en la pantalla.

CJ. Se recomienda centrifugar el CJ durante 10 segundos antes de usarse. Cada 1 ml de solución CJ diluida que indique la pantalla, se prepara añadiendo 1 ml de DC y 5µl de Solución CJ. Se debe dar un vórtex a la solución una vez diluida para homogenizar.

RE. Añadir el volumen de RE indicado en la pantalla.

13. Cerrar la puerta y pulsar “inicio” para comenzar. El equipo realizará el pre-lavado de los **CSs** y la adición de SH; a continuación emitirá un pitido para indicar que es el momento de la adición de las muestras; el pitido cesará cuando el usuario cierre la puerta del equipo o presione el símbolo que aparece en la pantalla táctil para acallarlo.
14. Para añadir las muestras, sacar los **CSs** del autoclart® plus y añadir **10 µl** de producto amplificado desnaturalizado a cada pocillo del CS. Resuspender varias veces para que se mezcle con SH, con cuidado de no tocar el fondo del pocillo. A continuación, introducir de nuevo la placa en el autoclart® plus y pulsar el mando para que continúe el proceso de visualización.
15. Cuando ha finalizado el proceso de visualización, el autoclart® plus emite una señal acústica para indicar la finalización del test.

C) Solo lectura de la muestra

1. Encender el equipo autoclart® plus.
2. Colocar el soporte con el número de **CSs** a leer en el equipo y seguir las instrucciones que aparecen en la pantalla.
3. Seleccionar “Nuevo análisis” en el menú inicio.

4. Indicar el número de **CSs** necesarios presionando la cruz que aparece en cada columna.
5. Seleccionar el tipo de ensayo “HPV-4” o “HPV-4S” del listado. Para llevar a cabo el mismo ensayo en todos los **CSs** presione “Auto Select”. Después **pulse la flecha de dirección derecha para continuar.**
6. **En la pantalla de “Configuración del análisis” seleccionar “Lectura” y pulse la flecha de dirección derecha para continuar.**
7. Cuando ha terminado la lectura, el autoclart® plus emite una señal acústica para indicar la finalización del test.

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® o autoclart® plus.

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 4** se han eliminado estos falsos negativos añadiendo dos controles internos en cada tubo de reacción o pocillo de placa:

- 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 o pocillo de placa 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 /pocillo y que se usa como control de amplificación de la reacción de PCR.
- Oligonucleótidos específicos de VPH.

Los tubos de amplificación/ pocillos de placa 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
x. NEGATIVO	√ CONFORME	NEGATIVO

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 funcionamiento del sistema **CLART® HPV 4**. Principalmente, son sustancias que inhiben la ADN polimerasa y, por tanto, la reacción de amplificación. Las interferencias más conocidas son:

1 Presencia de hemoglobina y exceso de detritus celulares. Al no realizarse una purificación de la muestra como tal, pueden producirse inhibiciones por exceso de hemoglobina o detritus que, añadidos al tubo de amplificación/ pocillo de la placa provoquen una inhibición.

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 4** 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 4**, 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, el resultado del análisis será de muestra inhibida por falta de amplificación del control del ADN de la muestra.

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 (2015 WHO HPV)	10 copias
6		100%	100%
11	100%	100%	80%
16	100%	100%	80%
18	100%	100%	80%
26			100%
31		100%	100%
33	100%	100%	80%
35	100%	100%	60%
39	100%	100%	80%
45	100%	100%	80%
51	100%	100%	80%
52		100%	100%
53			100%
56	100%	100%	80%
58	100%	100%	60%
59	100%	100%	80%
66		100%	100%
68a	100%	100%	
68b	100%	100%	80%
82			100%

N=110

Tabla 1. Sensibilidad analítica del formato *CLART® HPV4*

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. Además en la Tabla 1, se muestra la sensibilidad de otros tipos incluidos en dicho panel. 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 formato *CLART® HPV4*.

9.2.2. Parámetros de utilidad diagnóstica

Para determinar los parámetros de utilidad diagnóstica del sistema *CLART® HPV4*, se han realizado los siguientes estudios comparativos:

Para dar como válido el formato **CLART® HPV4**, se planteó la realización de estudios comparativos entre **CLART® HPV4** y **CLART® HPV2** en colaboración con cuatro hospitales españoles.

- Servicio de Microbiología del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona.
- Unidad de Virología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca.
- Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Clínico San Carlos.
- Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

Se analizaron 421 muestras de las cuales 88 fueron torundas secas, 101 muestras en medio de captura híbrida y 232 citologías líquidas tipo ThinPrep®.

En la Tabla 2 se ilustran los datos de sensibilidad y especificidad diagnósticas para los tipos de VPH detectados por el formato HPV4 desde muestra directa, sin necesidad de extracción de ADN:

Tipo	Sensibilidad	Especificidad	Tipo	Sensibilidad	Especificidad
Tipo 6	100,0	100,0	Tipo 56	100,0	99,7
Tipo 11	83,3	100,0	Tipo 58	93,3	100,0
Tipo 16	100,0	100,0	Tipo 59	95,0	99,7
Tipo 18	100,0	100,0	Tipo 61	100,0	100,0
Tipo 31	93,8	100,0	Tipo 62	87,0	100,0
Tipo 33	100,0	100,0	Tipo 66	100,0	99,8
Tipo 35	100,0	100,0	Tipo 68	100,0	99,8
Tipo 39	100,0	100,0	Tipo 70	81,8	100,0
Tipo 40	100,0	100,0	Tipo 71	100,0	100,0
Tipo 42	100,0	100,0	Tipo 72	100,0	100,0
Tipo 43	100,0	100,0	Tipo 73	100,0	100,0
Tipo 44	100,0	99,5	Tipo 81	100,0	100,0
Tipo 45	100,0	100,0	Tipo 82	90,0	100,0
Tipo 51	100,0	100,0	Tipo 83	100,0	100,0
Tipo 52	92,6	100,0	Tipo 84	100,0	100,0
Tipo 53	97,1	100,0	Tipo 89	100,0	99,5
Tipo 54	100,0	100,0			

Tabla 2. Parámetros diagnósticos del formato **CLART® HPV4**

Para dar como válido el formato **CLART® HPV4S** se planteó la realización de un estudio de concordancia entre los resultados obtenidos en **CLART® HPV4** y en **CLART® HPV4S**.

El objetivo marcado fue la obtención de un porcentaje de concordancia mayor o igual al 95% para los 16 tipos incluidos en el formato *CLART® HPV4S*.

Se estudiaron 495 muestras en paralelo. Los resultados obtenidos demuestran que el objetivo del estudio se alcanzó; por lo que concluimos que los resultados diagnósticos de *CLART® HPV4S* son asimilables a los de *CLART® HPV4*.

10. REFERENCIAS

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. Pathol. 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).

Chranioti A., Spathis A., Aga E., Merustoudis C. Pappas A., Panayiotides I. and Karakitsos P. "Comparison of two commercially available methods for HPV Genotyping: CLART HPV2 and Linear Arrays HPV Genotyping Test". Analytical and Quantitative Cytopathology and Histopathology. Volumen 34, number 5, October 2012.

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.

Garbugliaa A. R., Piselli P., Lapaa D., Sias C., Del Nonnoc F., Baiocchinic A., Cimagliab C., Agrestab A. and Capobianchia M. R. "Frequency and multiplicity of human papillomavirus infection in HIV-1 positive women in Italy". Journal of Clinical Virology. JCV-2429 (2012).

Goldman B., Rebolj M., Rygaard C., Preisler S., Ejegod DM, Lyngea E., and Jesper Bonde. "Patterns of cervical coinfection with multiple human papilloma virus types in a screening population in Denmark". Vaccine 2013 Mar 15;31 (12): 1604-9.

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.

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).

Pista, A., Freire de Oliveira C., Lopes C., and Cunha M. J., on behalf of the CLEOPATRE Portugal Study Group. "Human Papillomavirus Type Distribution in Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2/3 and Cervical Cancer in Portugal A CLEOPATRE II Study". International Journal of Gynecological Cancer & Volume 23, Number 3, March 2013

Ronco G., P. Giorgi-Rossi, F. Carozzi, M. Confortini, P. Palma, A. Mistro, B. Ghiringhello, 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.

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 international 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.

Anexo I: Tabla con clasificación según riesgo oncogénico* de los tipos de VPH que se detectan con el kit **CLART® HPV4**

TIPOS ALTO RIESGO
VPH 16
VPH 18
VPH 31
VPH 33
VPH 35
VPH 39
VPH 45
VPH 51
VPH 52
VPH 56
VPH 58
VPH 59
VPH 66
VPH 68

TIPOS (PROB. ALTO RIESGO)
VPH 26
VPH 53
VPH 73
VPH 82
VPH 70

VIRUS BAJO RIESGO
VPH 6
VPH 11
VPH 40
VPH 42
VPH 43
VPH 44
VPH 54

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