

VIASURE

Real Time PCR Detection Kit



High-Risk

Human Papilloma Virus

CE IVD



These instructions for use apply to the following references / Estas instrucciones de uso aplican para las siguientes referencias:

OPEN AND ROTOR-GENE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL (SEE ANNEX 1) / FORMATO OPEN Y ROTOR-GENE CON CONTROL INTERNO (VER ANEXO 1)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-HRP106L
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-HRP106H
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-HRP112L
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-HRP112H
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HRP136
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-HRP101L
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-HRP101H
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HRP101

Table A 1. References for Open and Rotor-Gene format with internal control products. / Referencias para productos Open and Rotor-Gene Format con control interno.

TUBE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL (SEE ANNEX 2) / FORMATO TUBO CON CONTROL INTERNO (VER ANEXO 2)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-HRP148T

Table A 2. References for Tube format with internal control products. / Referencias para productos formato Tubo con control interno.

OPEN AND ROTOR-GENE FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL (SEE ANNEX 3) / OPEN AND ROTOR-GENE FORMAT CON CONTROL DE EXTRACCIÓN (VER ANEXO 3)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-HRP106LE
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-HRP106HE
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-HRP112LE
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-HRP112HE
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HRP136E
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-HRP101HE
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-HRP101LE
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HRP101E

Table A 3. References for Open and Rotor-Gene format with extraction control products. / Referencias para productos Open and Rotor-Gene Format con control de extracción.

TUBE FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL (SEE ANNEX 4) / FORMATO TUBO CON CONTROL DE EXTRACCIÓN (VER ANEXO 4)

PRODUCT / PRODUCTO	REFERENCE / REFERENCIAS
VIASURE <i>High-Risk Human Papilloma Virus Real Time</i> PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-HRP148TE

Table A 4. References for Tube format with extraction control products. / Referencias para productos formato Tubo con control de extracción.

Content

1.	Intended use.....	8
2.	Summary and Explanation	8
3.	Principle of the procedure	9
4.	Reagents provided	9
5.	Reagents and equipment to be supplied by the user	9
6.	Transport and storage conditions	10
7.	Precautions for users	11
8.	Test procedure.....	12
8.1.	Specimen collection, transport and storage	12
8.2.	DNA extraction	13
9.	Result interpretation	13
9.1.	References with internal control (references in Annex 1 and 2).....	13
9.2.	References with extraction control (references in Annex 3 and 4)	15
10.	Limitations of the test	17
11.	Quality control	18
12.	Performance characteristics.....	19
12.1.	Clinical sensitivity and specificity	19
12.2.	Analytical sensitivity.....	20
12.3.	Analytical specificity	24
12.4.	Analytical reactivity	25
	ANNEX 1	26
A1.1	Principle of the procedure.....	26
A1.2	Reagents provided	26
A1.3	Test procedure	27
A1.3.1	Lyophilized positive control.....	27
A1.3.2	PCR protocol	28
	ANNEX 2	29
A2.1	Principle of the procedure.....	29
A2.2	Reagents provided	29
A2.3	Test procedure	30
A2.3.1	Lyophilized positive control.....	30

A2.3.2 Lyophilized reaction mix tube	30
A2.3.3 PCR protocol	30
ANNEX 3	32
A3.1 Principle of the procedure	32
A3.2 Reagents provided	32
A3.3 Test procedure	34
A3.3.1 Lyophilized extraction control	34
A3.3.2 Lyophilized positive control.....	34
A3.3.3 PCR protocol	34
ANNEX 4	36
A4.1 Principle of the procedure	36
A4.2 Reagents provided	36
A4.3 Test procedure	37
A4.3.1 Lyophilized extraction control	37
A4.3.2 Lyophilized positive control.....	37
A4.3.3 Lyophilized reaction mix tube.....	37
A4.3.4 PCR protocol	37

Contenido

1. Uso previsto	39
2. Introducción y explicación	39
3. Procedimiento	40
4. Reactivos suministrados	41
5. Material requerido y no suministrado	41
6. Condiciones de transporte y almacenamiento	42
7. Precauciones para el usuario	42
8. Procedimiento del test.....	43
8.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras.....	44
8.2. Extracción de DNA.....	44
9. Interpretación de resultados.....	45
9.1. Referencias con Control Interno (referencias en Anexos 1 y 2)	45
9.2. Referencias con Control de Extracción (referencias en Anexos 3 y 4)	47
10. Limitaciones del test.....	49

11.	Control de calidad.....	51
12.	Características del test.....	51
12.1.	Sensibilidad y especificidad clínica	51
12.2.	Sensibilidad analítica	52
12.3.	Especificidad analítica	57
12.4.	Reactividad analítica	58
	ANEXO 1	59
A1.1	Procedimiento.....	59
A1.2	Reactivos suministrados	59
A1.3	Procedimiento del test	60
A1.3.1	Control positivo liofilizado	60
A1.3.2	Protocolo PCR	61
	ANEXO 2	62
A2.1	Procedimiento.....	62
A2.2	Reactivos suministrados	62
A2.3	Procedimiento del test	63
A2.3.1	Control positivo liofilizado	63
A2.3.2	Mezcla de reacción liofilizada	63
A2.3.3	Protocolo PCR	64
	ANEXO 3	65
A3.1	Procedimiento.....	65
A3.2	Reactivos suministrados	65
A3.3	Procedimiento del test	67
A3.3.1	Control de extracción liofilizado	67
A3.3.2	Control positivo liofilizado	67
A3.3.3	Protocolo PCR	67
	ANEXO 4	69
A4.1	Procedimiento.....	69
A4.2	Reactivos suministrados	69
A4.3	Procedimiento del test	70
A4.3.1	Control de extracción liofilizado	70
A4.3.2	Control positivo liofilizado	70
A4.3.3	Mezcla de reacción liofilizada	70
A4.3.4	Protocolo PCR	71

Bibliography/Bibliografía	73
Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico <i>in vitro</i>	73
Trademarks.....	74

ENGLISH

1. Intended use

VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit is designed for the simultaneous qualitative detection of DNA from 14 high risk Human papillomavirus (HPV: types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, and 68) as well as the identification of the two main HPVs, HPV 16 and HPV 18, from cervical samples (liquid base solution for cytology) of individuals suspected of infection by high-risk HPV, by their healthcare professional (HCP). This test is intended for use as an aid in the detection of infection caused by high-risk HPV, as well as the identification of HPV 16 and HPV 18, in combination with clinical and epidemiological risk factors. DNA is extracted from clinical specimens, amplified using real time PCR, and detected using fluorescent reporter dye probes specific for high-risk HPV DNA.

2. Summary and Explanation

Human papillomavirus (HPV) is a small, non-enveloped, double-stranded DNA virus that commonly infects human cutaneous and mucosal epithelial cells. It is included in the *Papillomaviridae* family, and more than 200 HPV genotypes have been identified and grouped in different genera (Alpha-, Nu/Mu-, Beta- and Gamma-papillomavirus) according to the viral genome structure and tropism to human epithelial tissues. The Alpha genus includes genotypes that have been described to cause cancer, while Beta- and Gamma-papillomavirus infection courses are generally asymptomatic. However, immunosuppression states (i.e. organ graft, HIV infection, epidermodysplasia verruciformis disorder among others) can trigger these types to produce cutaneous papilloma or increase the predisposition to skin cancer.

HPV infection is associated with virtually all cervical cancers and a significant proportion of anogenital (vulvar, vagina, penile, and anal) and oropharyngeal cancers, as well as with other skin and mucosal lesions such as warts and benign papillomas. HPV infects both men and women, although the burden of attributable disease is much larger in women because of the high susceptibility to HPV infection of cervical cells. Most human papillomavirus infection is harmless and clears spontaneously, but persistent infection with high-risk human papillomavirus (especially type 16) can cause cancer of cervix, vulva, vagina, anus, penis and oropharynx. Risk of cancer development depends on papilloma type, and the persistence of the infection. At least 14 HPV are known as high-risk types because they are associated with cervical cancer development: HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58, HPV59, HPV66 y HPV68. HPVs 16 and 18 account for roughly 70% of all cervical cancer, being type 16 detected in about 57% of women with cervical cancer, while type 18 has been detected in about 16%, with small regional variations.

Because of its crucial role and the need for continued expression to maintain the disease phenotype, HPV can be used as a biomarker of cervical cancer and precancer. Accurate HPV detection, genotyping and genome state evaluation is becoming increasingly important for: 1) cervical cancers screening programs, aiming to control expansion and to investigate its epidemiological behaviour, 2) assessment of HPV vaccines efficacy, and 3) the investigation of the role of HPV infection during diagnosis of different malignancies and the prognostic/predictive potential of HPV infection for different treatment types, particularly for the introduction of type-specific antiviral therapies or monovalent vaccines. Cytology using Papanicolau-stained smears has been the standard screening test for detection of premalignant lesions and cervical cancer since 1941 but carries a false-negative rate of about 5% to 20%. However, molecular HPV tests were incorporated into cervical cancer

screening for normal-risk women because of the limitations of cytology. Currently, molecular HPV tests are used for cervical cancer screening adjunctively cervical cytology, as a first-line primary cervical cancer screening test, for screening of abnormal cell changes on the cervix that might lead to cervical cancer, and for the detection of atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS), or squamous intraepithelial lesion (SIL). The most common commercially available molecular tests are designed to detect HPV DNA from high-risk types and generate a pooled result without identification of the specific type present. The most widely used protocols employs consensus primers that directed at a highly conserved region of the *L1* gene, since they are potentially capable of detecting all mucosal HPV types, although *E6* and *E7* genes are being targeted as well because of their oncogenic performance (they codify the oncoproteins E6 and E7, responsible for the inhibition of p53 and pRB tumor suppressors).

3. Principle of the procedure

VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit is designed for the qualitative detection of high-risk HPVs (types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, and 68), as well as the differentiation of HPV types 16 and 18, from cervical samples in liquid base solution for cytology. After DNA isolation, the identification of HPV is performed by the amplification of a conserved region of the *L2* gene (HPV 16), *L1* gene (HPV 18), *E6* gene (HPVs 35, 56 and 58) and *E7* gene (HPVs 31, 33, 39, 45, 51, 52, 59, 66, 68), using specific primers and a fluorescent-labelled probes.

VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit is based on 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bound to the complementary DNA sequence, separating the quencher dye from the reporter. This reaction generates an increase in the fluorescent signal, which is proportional to the quantity of target template. This fluorescence could be measured on Real Time PCR platforms.

VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer and polymerase) in a stabilized format, as well as an internal control to monitor PCR inhibition. Each kit includes two kinds of multiplex reaction mix, and each one corresponds to one different assay. The first reaction mix detects the HPV 16, HPV 18 and/or HPV 35, 58 and 66 (*High-Risk Human Papilloma Virus 1*) and contains the internal control (IC). The second reaction mix detects HPVs 31, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 59 and/or 68 (*High-Risk Human Papilloma Virus 2*).

4. Reagents provided

VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit includes the materials and reagents detailed in Annex 1 for open and rotor-gene format with internal control products, Annex 2 for tube format with internal control products, Annex 3 for open and rotor-gene format with extraction control products, and Annex 4 for tube format with extraction control products.

5. Reagents and equipment to be supplied by the user

The following list includes the materials that are required for use but not included in the VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler).

- Real Time PCR compatible plastic consumables (i.e. individual tubes, well-strips and/or microplates). Only for Tubes format (Annex 2 and 4).
- DNA extraction kit.
- Collection and transport system.
- Laboratory freezers: - 30°C to - 10°C and/or $\leq -70^{\circ}\text{C}$.
- Centrifuge for 1.5 mL tubes and PCR-well strips or 96-well plate (if available).
- Vortex.
- Micropipettes (0.5-20 μL , 20-200 μL).
- Filter tips.
- Powder-free disposable gloves.
- Loading block (for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments). Only for Rotor Gene format (Annex 1 and 3).

VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit has been tested on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast & 7500 Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTlite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen) and Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer.

When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend to place a plate holder to reduce the risk of crushed tube (Ref. PN 4388506). To check thermocycler compatibility and most common detection channels consult website www.certest.es.

Optical measurement parameters of some thermocyclers must be adjusted to be suitable for operation with VIASURE Real Time PCR Detection Kits. This assay has been validated with the following set exposition values:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology): FAM channel -500*, HEX channel – 500, ROX channel – 500 and Cy5 channel - 500.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology): FAM channel - 200, HEX channel - 500, ROX channel – 500 and Cy5 channel - 500.

*If the result in channel FAM is not as expected, there are no amplifications or high background noise is observed, please lower the exposure values indicated above to 150.

6. Transport and storage conditions

- The kits can be shipped and stored at 2-40°C until the expiration date which is stated on the label.
- Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles. Positive control has been validated as still being stable after 6 freeze-thaw cycles.
- Keep components away from light.
- For Tube format kits: Once the *High-Risk Human Papilloma Virus* Reaction-Mix tube has been reconstituted, it may be kept it at 25°C $\pm$ 5°C or 2°C to 8°C for up to 4 hours. For a longer period of time, it is recommended store at -20°C and to separate in aliquots to minimize freeze and thaw cycles (up to 6 times).

7. Precautions for users

- The product is intended for use by qualified and trained clinical laboratory personnel specifically instructed and trained in the techniques of real-time PCR and *in vitro* diagnostic procedures (including training on the Real Time PCR instrument (thermocycler) and Nucleic acid extraction system).
- For *in vitro* diagnostic use.
- Do not use expired reagents and/or materials.
- Do not use the kit if the label that seals the outer box is broken.
- Do not use reagents if the protective box is open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if the protective pouches are open or broken upon arrival.
- Do not use reagents if desiccant is not present or broken inside reagent pouches.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Close protective pouches of reagents promptly with the zip seal after each use (for references: VS-HRP136 and VS-HRP136E). Remove any air excess in the pouches prior to closing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different pouches and / or kits and / or lots and / or another supplier.
- Protect reagents against from humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- For references VS-HRP136 and VS-HRP136E (compatible for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments) use the loading block to pipette reagents and samples into each tube and to help with fitting caps properly and avoid cross contamination.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the bottom of the tube, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or color different from whitish) does not alter the functionality of the test.
- Design a unidirectional workflow. It should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Area. Do not return samples, equipment and reagents to the area in which the previous step was performed. Use separate areas for the preparation of patient samples and controls to prevent false positive results.
- In cases where other PCR tests are conducted in the same general area of the laboratory, care must be taken to ensure that the VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit and any additional reagents or equipments required for testing are not contaminated. Always avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile RNase/DNase-free disposable aerosol resistant or positive displacement pipette tips is recommended. Use a new tip for each specimen. Gloves must be changed before manipulating reagents.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink, smoke or apply cosmetic products in the working area. Wash your hands after finishing the test.
- Specimens must be treated as potentially infectious and/or biohazardous, as well as all the reagents and materials that have been exposed to the samples and they must be handled according to the national safety regulations. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, handling, and disposal of samples.
- Samples and reagents must be handled in a biological safety cabinet. Use personal protective equipment (PPE) consistent with current guidelines for the handling of potentially infectious samples. Dispose of waste in compliance with local and state regulations.

- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Make sure to use a well for determining HPV 16, 18, 35, 58, and 66, and another well for determining HPVs 31, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 59 and 68. Be careful not to mix them throughout the process.
- In accordance with Regulation (EC) No 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits do not require Material Safety Data Sheets on account of their classification as non-hazardous to health and the environment, because they do not contain substances and/or mixtures which meet the hazard classification criteria available in Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP), or which are in concentrations higher than the value established in the mentioned regulation for their declaration.
- Consult each Real Time PCR instrument's reference manual for additional warnings, precautions and procedures.

8. Test procedure

Please see Annex 1 for Open and Rotor-Gene format with internal control products Test Procedure, Annex 2 for Tube format with internal control products Test Procedure, Annex 3 for Open and Rotor-Gene format with extraction control products Test Procedure and Annex 4 for Tube format with extraction control products Test Procedure.

8.1. Specimen collection, transport and storage

The VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit has been tested on cervical (exocervical and endocervical) samples collected with endocervical swabs resuspended in PreservCyt® solution using ThinPrep® vials for the ThinPrep® system (HOLOGIC®). Other types of samples must be validated by the user.

Collection, storage and transport of specimens should be maintained per the conditions validated by the user. Overall, all specimens should be collected and labelled appropriately in clean containers. After collection, specimens should be placed in a biohazard bag and should be transported and processed as soon as possible to guarantee the quality of the test. The specimens collected in PreservCyt® solution should be transported at 15-30°C for up to 6 weeks, following the local and national regulations for the transport of pathogen material. For long term transport (more than 6 weeks), we recommend shipping at 2-8°C, or at -20°C or lower if preservation medium permits. It is recommended to use fresh specimens for the test. The samples can be stored at 2-8°C or frozen at -20°C or at -80°C for conservation **if preservation medium permits**. We recommend following appropriate laboratory guidelines and/or manufacturer's recommendations for proper preservation of samples in the selected collection and transport medium. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided in order to prevent degradation of the sample and nucleic acids.

The clinical specimens must be collected, transported and stored according to appropriate laboratory guidelines. For details, refer to the IDSA guideline (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94), and García-Lechuz Moya, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E.,

Cantón Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*.

8.2. DNA extraction

Perform the sample preparation according to the recommendations appearing in the instructions for use of the extraction kit used.

For DNA extraction from clinical samples, you can use your manual or automatic routine optimized system, or any commercially available DNA extraction kit and follow the manufacturer's instructions. The following extraction kits have been validated:

- MagDEA Dx SV Kit, using the magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.).
- MagMAX™ Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit, using the KingFisher™ Flex automatic extraction instrument (Thermo Fisher Scientific).
- Maxwell® RSC 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).

9. Result interpretation

9.1. References with internal control (references in Annex 1 and 2)

All the results of the test should be evaluated by a healthcare professional in the context of medical history, clinical symptoms, and other diagnostic tests. Check Internal Control (IC) signal to verify the correct functioning of the amplification mix. The analysis of the controls and samples is done by the software of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer's instructions.

The use of positive and negative controls in each run validates the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal for high-risk HPV in the positive control well.

For a valid diagnostic test run, the following control conditions must be met:

Controls	High-Risk Human Papilloma Virus 1				High-Risk Human Papilloma Virus 2			Interpretation of Controls
	HPV 16 (FAM) ¹	HPV 18 (HEX) ¹	Internal Control (ROX) ²	Other HR HPVs (HPVs 35/58/66) (Cy5) ¹	Other HR HPVs (HPVs 33/45/51) (FAM) ¹	Other HR HPVs (HPVs 52/59/68) (HEX) ¹	Other HR HPVs (HPVs 31/39/56) (ROX) ¹	
Positive Control (PC)	≤40	≤40	≤40	≤40	≤40	≤40	≤40	Valid
Negative Control (NC)	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≤40	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	Valid

Table 1. Expected Performance of Controls. Ct values, no signal = no amplification curve. HR HPVs = High-Risk Human Papilloma Virus.

1. In cases where either or both control assays have failed (an amplification signal is observed in the negative control and/or signals absence in the positive control well for any target channel), all results are reported as 'Invalid', and retesting is required.

2. The Internal Control (IC) should show an amplification signal (Ct ≤40) in PC and NC control wells.

Assessment of clinical samples test results should be performed after the positive and negative controls have been examined and determined to be valid and acceptable. If one or more controls are not valid, the patient results cannot be interpreted.

For interpretation of individual patient sample results, use the following table, read and analyze the results:

High-Risk Human Papilloma Virus 1				High-Risk Human Papilloma Virus 2			Interpretation for patients' individual samples
HPV 16 (FAM)	HPV 18 (HEX)	Internal Control (ROX)	Other HR HPV's (HPV's 35/58/66) (Cy5)	Other HR HPV's (HPV's 33/45/51) (FAM)	Other HR HPV's (HPV's 52/59/68) (HEX)	Other HR HPV's (HPV's 31/39/56) (ROX)	
≤40	≥40 or no signal	≤40 or no signal ¹	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	HPV 16 DNA detection
≥40 or no signal	≤40	≤40 or no signal ¹	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	HPV 18 DNA detection
≥40 or no signal	≥40 or no signal	≤40 or no signal ¹	An amplification signal in one or more channels (Ct ≤40)				Other HR HPV's different from HPV 16 and HPV 18 DNA detection
≤40	≤40	≤40 or no signal ¹	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	HPV 16 and HPV 18 DNA detection
≤40	≥40 or no signal	≤40 or no signal ¹	An amplification signal in one or more channels (Ct ≤40)				HPV 16 and other HR HPV's DNA detection
≥40 or no signal	≤40	≤40 or no signal ¹	An amplification signal in one or more channels (Ct ≤40)				HPV 18 and other HR HPV's DNA detection
≤40	≤40	≤40 or no signal ¹	An amplification signal in one or more channels (Ct ≤40)				HPV 16, HPV 18 and other HR HPV's DNA detection
≥40 or no signal	≥40 or no signal	≤35 ²	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	HR HPV's not detected ²
≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥ 35 or no signal ²	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	Test Failure- Repeat Testing ²

Table 2. Interpretation of individual patient sample results. Ct values. no signal = no amplification curve. HR HPV's = High-Risk Human Papilloma Virus.

1 The Internal Control (IC) shows or not an amplification signal (Ct ≤40 or no signal). Sometimes, its detection is not necessary because a high copy number of the target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.

2 In the case of HPV target genes negative, IC must show an amplification signal with Ct less than 35. If there is an absence of signal or Ct value ≥ 35 of the Internal Control, the result is considered as 'Invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the qPCR diluting the DNA sample 1:10 and/or 1:100, or re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition issues.

In case of a continued ambiguous result, it is recommended to review the instructions for use, the extraction process used by the user, to verify the correct performance of each qPCR steps and review the parameters, and to check the sigmoid shape of the curve and the intensity of fluorescence.

Figure 1. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System. (High-Risk Human Papilloma Virus 1).

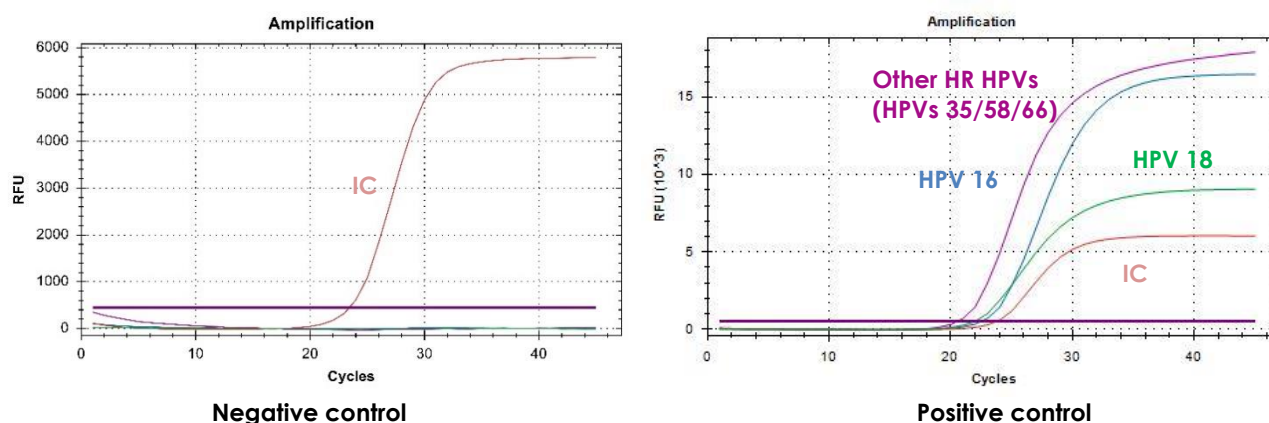
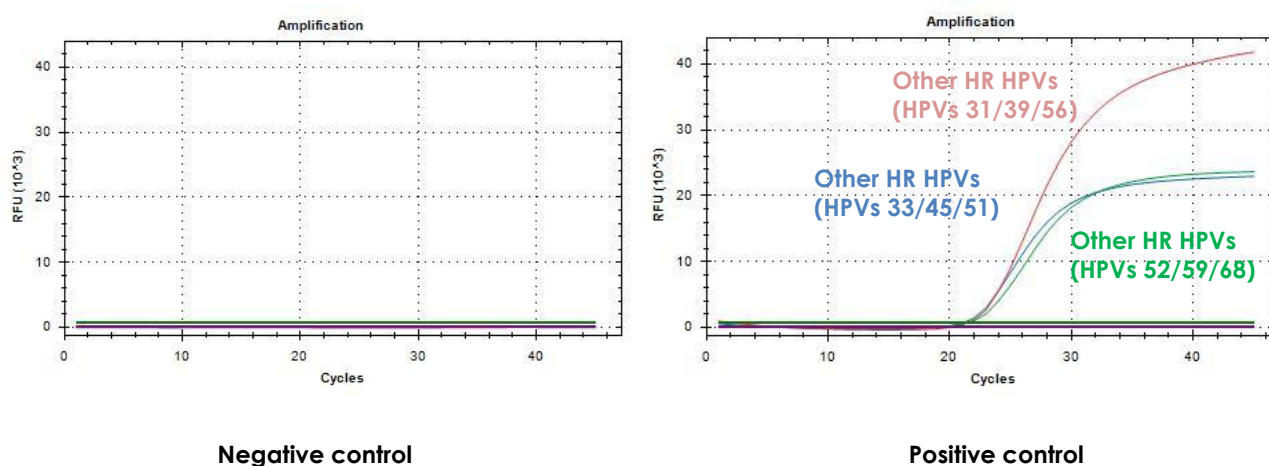


Figure 2. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System. (High-Risk Human Papilloma Virus 2).



9.2. References with extraction control (references in Annex 3 and 4)

All the results of the test should be evaluated by a healthcare professional in the context of medical history, clinical symptoms, and other diagnostic tests. Check Extraction Control (EC) signal to verify the correct functioning of the amplification mix. The analysis of the controls and samples is done by the software of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer's instructions.

The use of positive and negative controls in each run validates the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal for high-risk HPVs in the positive control well.

For a valid diagnostic test run, the following control conditions must be met:

Controls	High-Risk Human Papilloma Virus 1				High-Risk Human Papilloma Virus 2			Interpretation of Controls
	HPV 16 (FAM) ¹	HPV 18 (HEX) ¹	Extraction Control (ROX) ²	Other HR HPV (HPVs 35/58/66) (Cy5) ¹	Other HR HPV (HPVs 33/45/51) (FAM) ¹	Other HR HPV (HPVs 52/59/68) (HEX) ¹	Other HR HPV (HPVs 31/39/56) (ROX) ¹	
Positive Control (PC)	≤40	≤40	≤40	≤40	≤40	≤40	≤40	Valid
Negative Control (NC)	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≤40	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	Valid

Table 3. Expected Performance of Controls. Ct values. no signal = no amplification curve. HR HPVs = High-Risk Human Papilloma Virus.

1 In cases where either or both of the control assays have failed (an amplification signal is observed in the negative control and/or signals absence in the positive control well for any target channel), all results are reported as 'Invalid', and retesting is required.

2. The Extraction Control (EC) should show an amplification signal (Ct ≤40) in PC and NC control wells.

Assessment of clinical samples test results should be performed after the positive and negative controls have been examined and determined to be valid and acceptable. If one or more controls are not valid, the patient results cannot be interpreted.

For interpretation of individual patient sample results, use the following table, read and analyze the results:

High-Risk Human Papilloma Virus 1				High-Risk Human Papilloma Virus 2			Interpretation for patients' individual samples
HPV 16 (FAM)	HPV 18 (HEX)	Extraction Control (ROX)	Other HR HPV (HPVs 35/58/66) (Cy5)	Other HR HPV (HPVs 33/45/51) (FAM)	Other HR HPV (HPVs 52/59/68) (HEX)	Other HR HPV (HPVs 31/39/56) (ROX)	
≤40	≥40 or no signal	≤40 or no signal ¹	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	HPV 16 DNA detection
≥40 or no signal	≤40	≤40 or no signal ¹	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	HPV 18 DNA detection
≥40 or no signal	≥40 or no signal	≤40 or no signal ¹	An amplification signal in one or more channels (Ct ≤40)				Other HR HPVs different from HPV 16 and HPV 18 DNA detection
≤40	≤40	≤40 or no signal ¹	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	HPV 16 and HPV 18 DNA detection
≤40	≥40 or no signal	≤40 or no signal ¹	An amplification signal in one or more channels (Ct ≤40)				HPV 16 and other HR HPVs DNA detection
≥40 or no signal	≤40	≤40 or no signal ¹	An amplification signal in one or more channels (Ct ≤40)				HPV 18 and other HR HPVs DNA detection
≤40	≤40	≤40 or no signal ¹	An amplification signal in one or more channels (Ct ≤40)				HPV 16, HPV 18 and other HR HPVs DNA detection
≥40 or no signal	≥40 or no signal	≤35 ²	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	HR HPVs not detected²
≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥ 35 or no signal ²	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	≥40 or no signal	Test Failure- Repeat Testing²

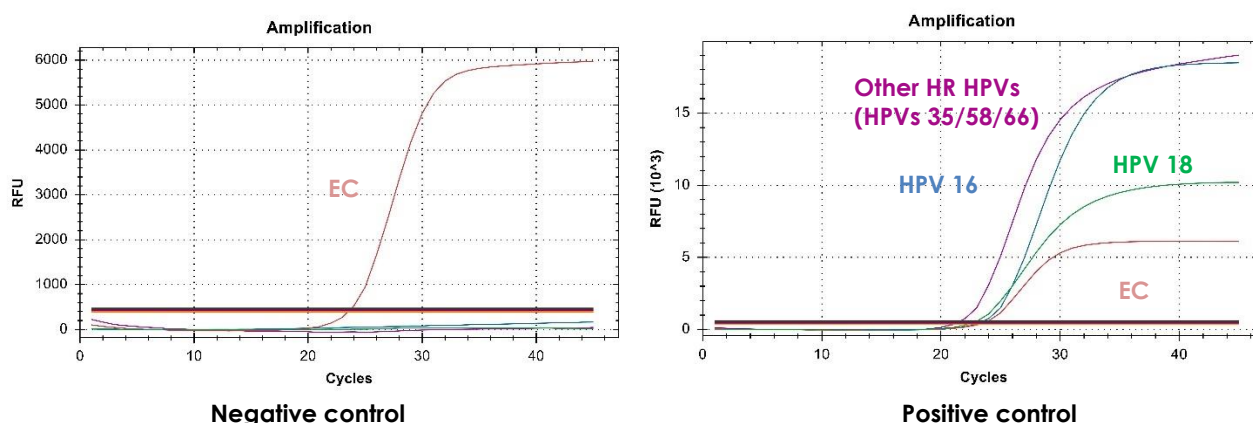
Table 4. Interpretation of individual patient sample results. Ct values. no signal = no amplification curve. HR HPVs = High-Risk Human Papilloma Virus.

1 The Extraction Control (EC) shows or not an amplification signal (Ct ≤40 or no signal). Sometimes, its detection is not necessary because a high copy number of the target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids.

2 In the case of high-risk HPV target genes negative, EC must show an amplification signal with Ct less than 35. If there is an absence of signal or Ct value ≥ 35 of the Extraction Control, the result is considered as 'Invalid', and retesting is required. It is recommended to repeat the qPCR diluting the DNA sample 1:10 and/or 1:100, or re-extract and retest to check for possible failure in the extraction procedure and/or inhibition issues.

In case of a continued ambiguous result, it is recommended to review the instructions for use, the extraction process used by the user, to verify the correct performance of each qPCR steps and review the parameters, and to check the sigmoid shape of the curve and the intensity of fluorescence.

Figure 3. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (High-Risk Human Papilloma Virus 1).



10. Limitations of the test

- The results of the test should be evaluated by a health care professional in the context of medical history, clinical symptoms and other diagnostic tests.
- Although this assay can be used with other types of samples, it has been validated only with DNA extracted from cervical (exocervical and endocervical) samples collected with endocervical swabs resuspended in PreservCyt® solution using ThinPrep® vials for the ThinPrep® system (HOLOGIC®).
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from samples must be done.
- This test is a qualitative test and does not provide quantitative values or indicate the number of organisms present.
- Extremely low levels of target below the limit of detection might be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by *High-Risk Human Papilloma Virus* Positive Control, either by samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination between Extraction Control and *High-Risk Human Papilloma Virus* Positive Control, which contains high copies template, during their reconstitution by adding of Water RNase/DNase free (white vial). Each procedure must take place in established order and in a separate laboratory areas.
- False Negative results may arise from several factors and their combinations, including:
 - Improper specimens' collection, transport, storage, and/or handling methods.
 - Improper processing procedures (including DNA extraction).

- Degradation of the DNA during sample shipping/storage and/or processing.
- A viral load in the specimen below the limit of detection for the assay.
- The presence of qPCR inhibitors or other types of interfering substances. The impacts of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, chemotherapeutics, immunosuppressant drugs or anti-fungal creams, used to prevent HPV infections or used during the treatment of the infection have not been evaluated.
- Failure to follow instructions for use and the assay procedure.
- A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable viruses and does not imply that these viruses are infectious or are the causative agents for clinical symptoms. However, a positive result is indicative of the presence of HPV target sequences (*L2* (HPV 16), *L1* (HPV 18), *E6* (HPVs 35, 56, 58), and *E7* (HPVs 31, 33, 39, 45, 51, 52, 59, 66, 68) genes).
- Negative results do not preclude high-risk HPV infection and should not be used as the sole basis for treatment or other patient management decisions. Optimum specimen types and timing for peak viral levels during infections caused by high-risk HPVs have not been determined. The collection of multiple specimens (types and time points) from the same patient may be necessary to detect the virus(es).
- If diagnostic tests for other Sexually Transmitted Diseases (STD) are negative and the patient's clinical presentation and epidemiological information suggest that high-risk HPV infection is possible, then a false negative result should be considered, and a re-testing of the patient should be discussed.
- Fluorescence values may vary due to multiple factors such as: PCR equipment, extraction system, type of sample, previous treatment of the sample, etc... among others.
- A bioinformatic analysis showed that the selected primers and probes detect their targets: HPV types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 59, 56, 58, 66 and 68. It was also observed that the primers and probe for the detection of HPV 39 could detect HPV 68 due to their genetic similarities.
- The intended use of VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit is the detection of high-risk HPV in clinical samples, which is performed in clusters of three genotypes per channel. For HPV 16 and HPV 18, the identification is also possible.
- This kit is not recommended for evaluation of suspected sexual abuse.
- Prevalence of HPV infection in a population may affect performance. Positive predictive values decrease when testing populations with low prevalence or individuals with no risk infection.
- Infection with high-risk HPV is not a definitive indicator of the presence of high-grade cervical disease, nor does it imply in all cases that high-grade cervical disease or cancer will develop.
- VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit detects high-risk HPV types. Thus, other low-risk HPV types not detected by this assay may be present in the specimen.

11. Quality control

VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit contains a positive and a negative control that must be included in each run to correctly interpret the results. Also, the internal control (IC) or the Extraction control (EC) in each well confirms the correct performance of the technique.

12. Performance characteristics

12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit was tested using exocervical and endocervical samples collected with endocervical swabs resuspended in PreservCyt® solution using ThinPrep® vials for the ThinPrep® system (HOLOGIC®). In order to determine the clinical diagnostic accuracy, a multicenter evaluation has been conducted through collaboration with national entities. A summary of the sites, sample type and workflow is included in the following table:

	Site	Sample type	Workflow	Target
1	'Servicio de Microbiología y Parasitología' of 'Hospital Universitario Miguel Servet', Biobank of Health System of Aragon and Certest Biotec (Zaragoza, Spain)	Exo- and endocervical samples collected with endocervical swabs resuspended in PreservCyt® solution using ThinPrep® vials (HOLOGIC®)	MagMAX™ Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit reagents using KingFisher Flex automatic extraction instrument (Thermo Fisher Scientific) + Maxwell® RSC 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit using Maxwell® RSC 16 Instrument (Promega) + Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR instrument + Applied Biosystems 7500 Fast & 7500 Real-Time PCR System	High-risk HPVs

Table 5. Site, sample type, workflow and target.

True positive and negative values, false positive and negative values, sensitivity, specificity, PPV, NPV values for VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit were calculated in relation to each comparator assay as shown in the following tables:

Site	Comparator assay	Target	TP	TN	FP	FN	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
1	cobas® HPV Test (Roche Diagnostics)	HPV 16	64	562	0	0	1 (0.94 – 1)	1 (0.99 – 1)	1 (0.94 – 1)	1 (0.99 – 1)
		HPV 18 and HPV 45	35	591	0	0	1 (0.90 – 1)	1 (0.99 – 1)	1 (0.90 – 1)	1 (0.99 – 1)
		other high-risk HPVs	190	435	0	1	0.99 (0.97 – 1)	1 (0.99 – 1)	0.99 (0.97-0.99)	1 (0.99-1)
	Anyplex™ II HPV HR (Seegene)	HPV 16	64	561	0	1	0.98 (0.91 – 1)	1 (0.99 – 1)	0.98 (0.91 – 0.99)	1 (0.99 – 1)
		HPV 18	18	608	0	0	1 (0.81 – 1)	1 (0.99 – 1)	1 (0.82-1)	1 (0.99 – 1)
		HPV 45	18	608	0	0	1 (0.81 – 1)	1 (0.99 – 1)	1 (0.82-1)	1 (0.99 – 1)
		HPV 35	25	598	2	1	0.96 (0.80 – 0.99)	0.99 (0.98 – 1)	0.96 (0.81 – 0.99)	0.99 (0.98 – 0.99)
		HPV 58	31	593	2	0	1 (0.88 – 1)	0.99 (0.98 – 1)	1 (0.89 – 1)	0.99 (0.98 – 0.99)
		HPV 66	15	609	2	0	1 (0.78 – 1)	0.99 (0.98 – 1)	1 (0.79 – 1)	0.99 (0.98 – 0.99)
		HPV 33	20	605	1	0	1 (0.83 – 1)	0.99 (0.99 – 1)	1 (0.83 – 1)	0.99 (0.99 – 1)
		HPV 51	18	607	1	0	1 (0.81 – 1)	0.99 (0.99 – 1)	1 (0.82 – 1)	0.99 (0.99 – 1)
		HPV 52	26	599	1	0	1 (0.86 – 1)	0.99 (0.99 – 1)	1 (0.87 – 1)	0.99 (0.99 – 1)
		HPV 59	25	600	1	0	1 (0.86 – 1)	0.99 (0.99 – 1)	1 (0.86 – 1)	0.99 (0.99-1)
		HPV 68	12	612	1	1	0.92 (0.64 – 0.99)	0.99 (0.99 – 1)	0.92 (0.66 – 0.98)	0.99 (0.99 – 1)
		HPV 31	35	586	4	1	0.97 (0.85 – 0.99)	0.99 (0.98 – 0.99)	0.97 (0.85 – 0.99)	0.99 (0.98 – 0.99)
		HPV 39	21	601	4	0	1 (0.83 – 1)	0.99 (0.98 – 0.99)	1 (0.84 – 1)	0.99 (0.98 – 0.99)
		HPV 56	21	600	4	1	0.95 (0.77 – 0.99)	0.99 (0.98 – 0.99)	0.95 (0.78 – 0.99)	0.99 (0.98 – 0.99)

Table 6. True positive (TP) and true negative values (TN), false positive (FP) and false negative (FN) values, sensitivity, specificity, Predictive Positive Values (PPV) and Predictive Negative Values (NPV) for VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit.

Results show high agreement to detect high-risk HPVs using VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Analytical sensitivity

VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of 10 DNA copies per reaction for HPVs 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 59 and 68; and 50 DNA copies per reaction for HPVs 16, 18, 58 and 66 (Figures 4-17).

Figure 4. Dilution series of HPV 16 (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (*High-Risk Human Papilloma Virus 1*, channel FAM).

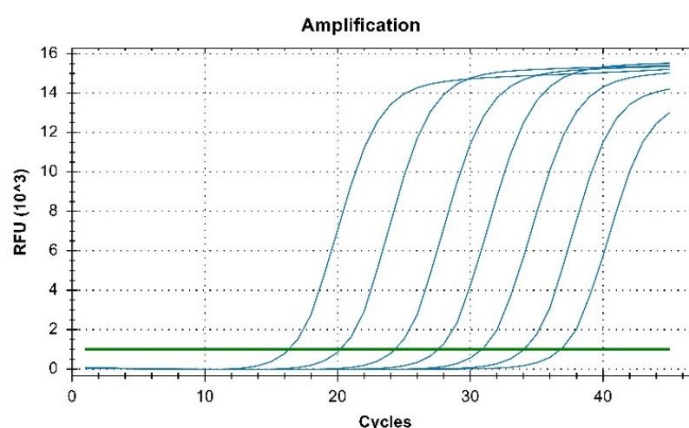


Figure 5. Dilution series of HPV 18 (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (*High-Risk Human Papilloma Virus 1*, channel HEX).

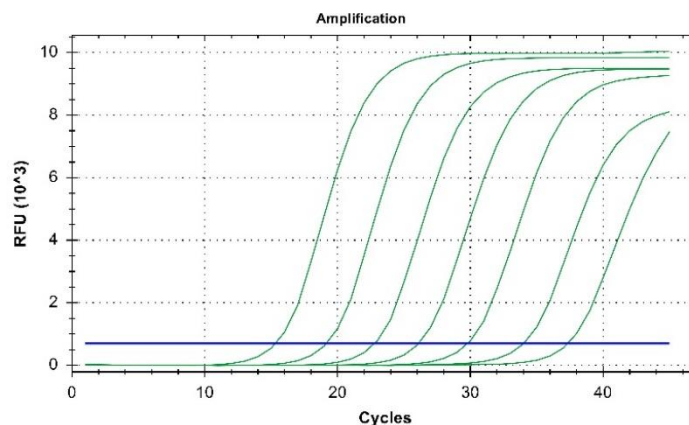


Figure 6. Dilution series of HPV 35 (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (*High-Risk Human Papilloma Virus 1*, channel Cy5).

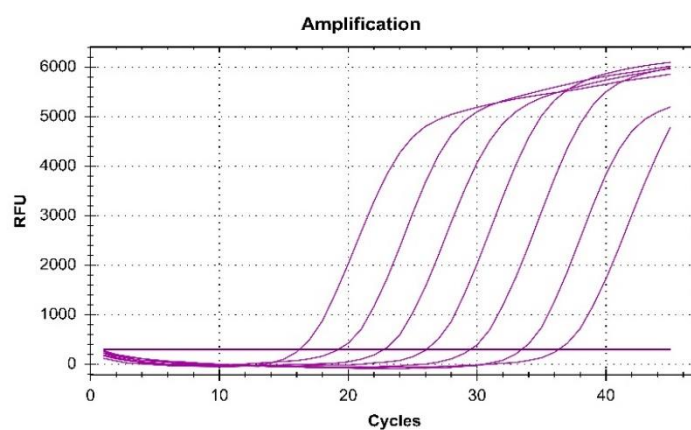


Figure 7. Dilution series of HPV 58 (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (*High-Risk Human Papilloma Virus 1*, channel Cy5).

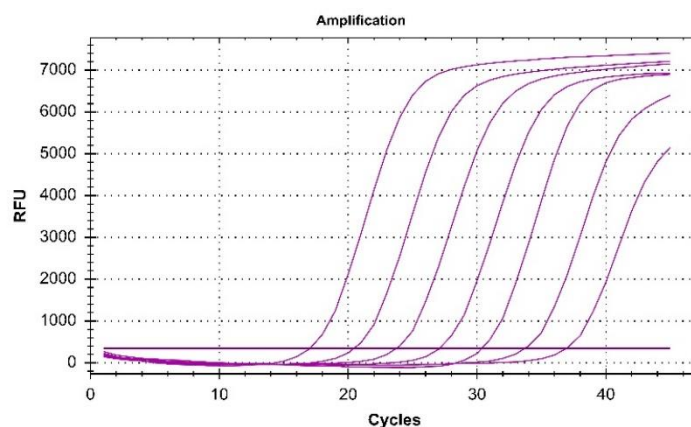


Figure 8. Dilution series of HPV 66 (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (*High-Risk Human Papilloma Virus 1*, channel Cy5).

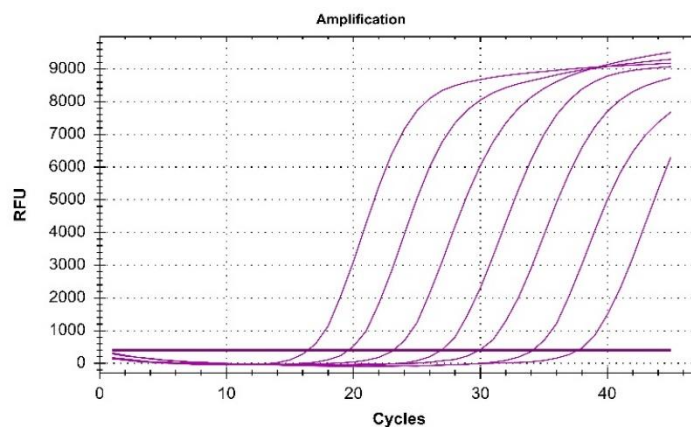


Figure 9. Dilution series of HPV 33 (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (*High-Risk Human Papilloma Virus 2*, channel FAM).

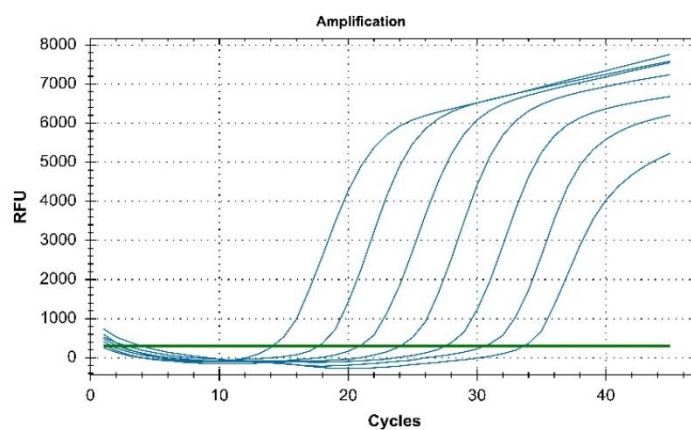


Figure 10. Dilution series of HPV 45 (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (*High-Risk Human Papilloma Virus 2*, channel FAM).

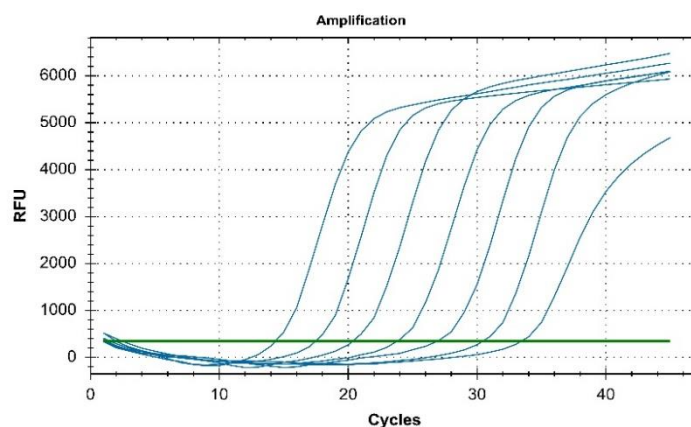


Figure 11. Dilution series of HPV 51 (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (*High-Risk Human Papilloma Virus 2*, channel FAM).

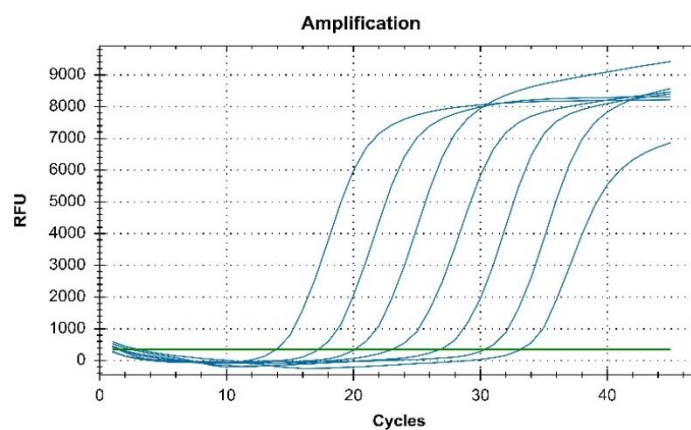


Figure 12. Dilution series of HPV 52 (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (High-Risk Human Papilloma Virus 2, channel HEX).

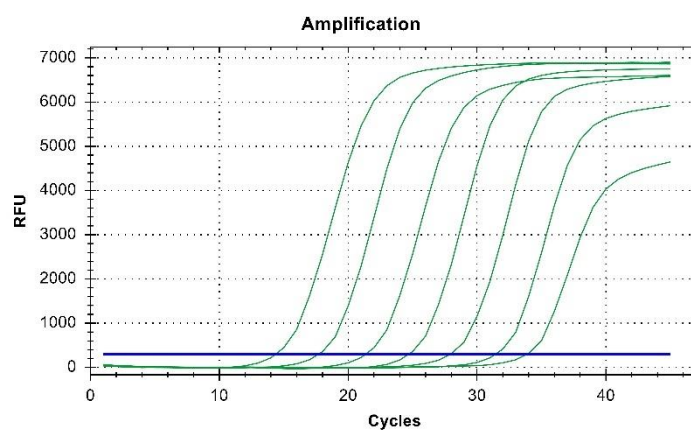


Figure 13. Dilution series of HPV 59 (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (High-Risk Human Papilloma Virus 2, channel HEX).

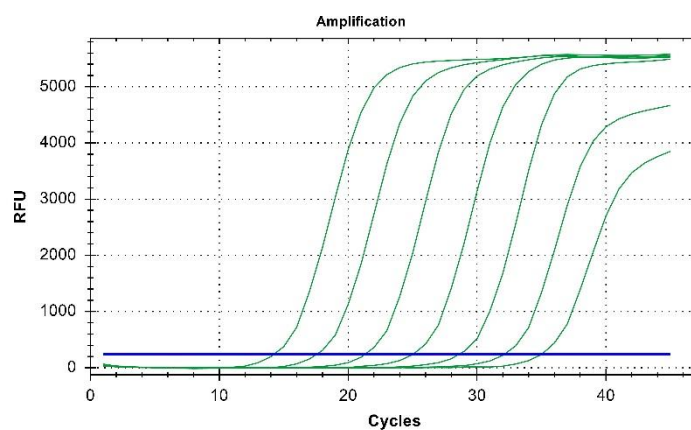


Figure 14. Dilution series of HPV 68 (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (High-Risk Human Papilloma Virus 2, channel HEX).

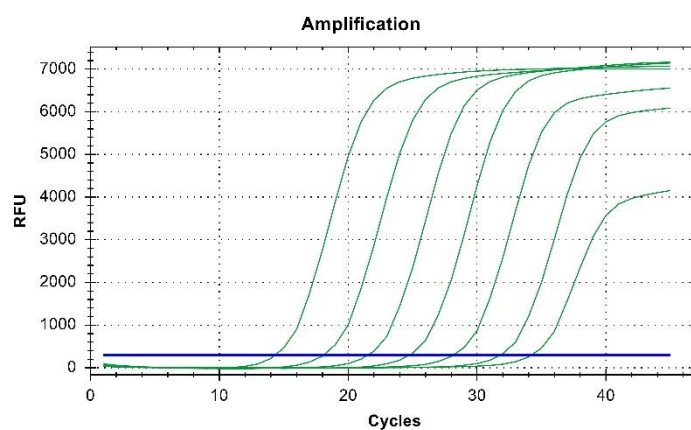


Figure 15. Dilution series of HPV 31 (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (High-Risk Human Papilloma Virus 2, channel ROX).

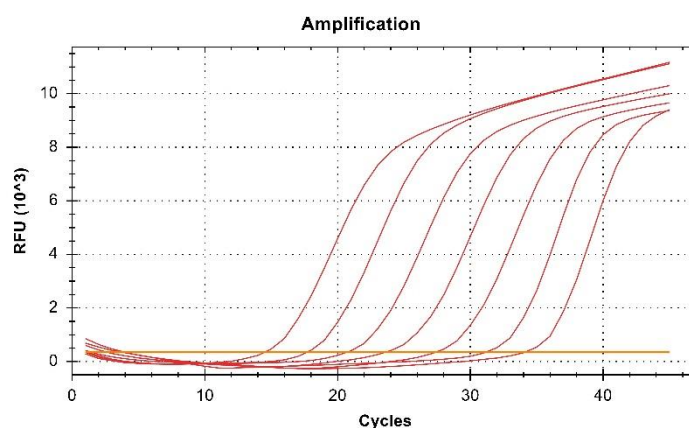


Figure 16. Dilution series of HPV 39 (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (High-Risk Human Papilloma Virus 2, channel ROX).

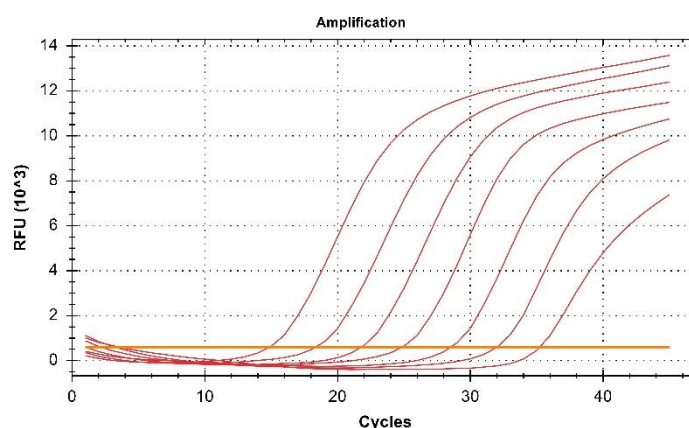
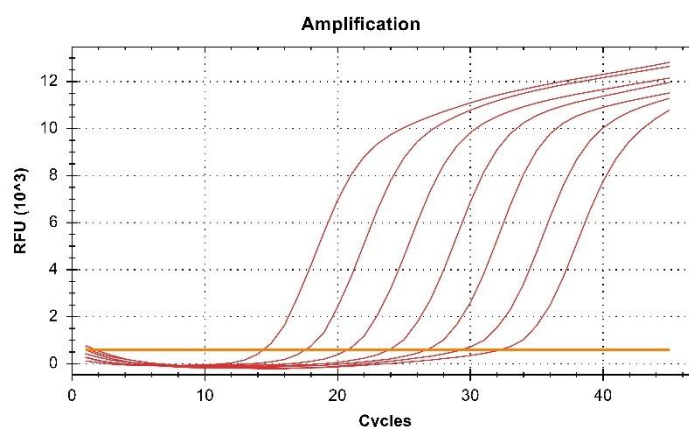


Figure 17. Dilution series of HPV 56 (10^7 - 10^1 copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (High-Risk Human Papilloma Virus 2, channel ROX).



12.3. Analytical specificity

The specificity of the VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit assay was confirmed by testing a panel of different microorganisms which represents the most common sexually transmitted diseases pathogens. No cross-reactivity of the VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit with any of the following microorganisms tested was observed.

Cross-reactivity testing					
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Mycoplasma hominis</i>	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> serotype 11	-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> strain 49226	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Escherichia coli</i> strain 0.1285; O18:H7:K1	-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> strain Lvl Ng PorA	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Gardnerella vaginalis</i>	-	<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup A	-
<i>Candida dubliniensis</i>	-	<i>Haemophilus ducreyi</i> strain Class 1	-	<i>Proteus mirabilis</i>	-
<i>Candida glabrata</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> strain Minn A	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Candida krusei</i> (<i>Issatchenkia orientalis</i>)	-	Hepatitis A virus	-	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-	Herpes Simplex Virus 1 strain Macintyre	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	Herpes Simplex Virus 2 strain MS	-	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> strain Swedish	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Streptococcus agalactiae</i> strain Z019	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> genovar F	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>Pneumoniae</i> serotype Capsular 2	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> strain Z022	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> (LGV)	-	<i>Listeria innocua</i> serotype 6a	-	<i>Treponema pallidum</i>	-
Cytomegalovirus strain AD-169	-	<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i> serovar 5	-	<i>Trichomonas vaginalis</i>	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> serotype Cloaca B	-	<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 4b	-	<i>Ureaplasma parvum</i>	-
<i>Enterobacter cloacae</i> serotype Cloaca A	-	<i>Mycoplasma genitalium</i>	-	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-

Table 7. Reference pathogenic microorganisms used in this study performed at CerTest facility.

12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit was evaluated against specific and synthetic DNAs, and against DNA extracted from clinical samples and simulated clinical samples from EQA panels positive for high-risk HPVs (HPV types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, and 68) as templates, showing positive results.

ANNEX 1

OPEN AND ROTOR-GENE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCES
VIASURE <i>High-Risk Human Papilloma Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-HRP106L
VIASURE <i>High-Risk Human Papilloma Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-HRP106H
VIASURE <i>High-Risk Human Papilloma Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-HRP112L
VIASURE <i>High-Risk Human Papilloma Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-HRP112H
VIASURE <i>High-Risk Human Papilloma Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HRP136
VIASURE <i>High-Risk Human Papilloma Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-HRP101L
VIASURE <i>High-Risk Human Papilloma Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-HRP101H
VIASURE <i>High-Risk Human Papilloma Virus</i> Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HRP101

Table A1 1. References

A1.1 Principle of the procedure

VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer and polymerase) in a stabilized format, as well as an internal control to monitor PCR inhibition.

Target	Channel	Gene
<i>High-Risk Human Papilloma Virus 1</i>	HPV 16	FAM
	Internal Control (IC)	ROX
	HPV 18	HEX, VIC or JOE *
	Other HR HPVs (HPVs 35, 58 and/or 66)	Cy5
<i>High-Risk Human Papilloma Virus 2</i>	Other HR HPVs (HPVs 33, 45 and/or 51)	FAM
	Other HR HPVs (HPVs 52, 59 and/or 68)	HEX, VIC or JOE *
	Other HR HPVs (HPVs 31, 39 and/or 56)	ROX

Table A1 2. Target, channel and genes. HR HPVs = High-Risk Human Papilloma Virus.

*Depending on the equipment used select the proper detection channel, to check most common detection channels consult the website www.ceratest.es.

A1.2 Reagents provided

VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Tables A1.3 and A1.4. Based on the commercial presentation and the Real Time PCR platform used, the stabilized PCR reaction mix could be placed inside different wells and could be marketed on multiple formats. Table A1.3 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible devices. Table A1.4 includes materials and reagents for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments for 4-well strips. (Consult the thermocycler compatibility on CerTest's website www.ceratest.es).

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
High-Risk Human Papilloma Virus 1 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format	White	1/3/6 x 8-well strip
High-Risk Human Papilloma Virus 2 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	White	1/3/6 x 8-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
High-Risk Human Papilloma Virus Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	2/6/12 x 8-cap strip

Table A1 3. Reagents and materials provided in VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-HRP101L, VS-HRP101H, VS-HRP106L, VS-HRP106H, VS-HRP112L and VS-HRP112H.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
High-Risk Human Papilloma Virus 1 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and internal control in stabilized format	Transparent	2/9 x 4-well strip
High-Risk Human Papilloma Virus 2 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	Transparent	2/9 x 4-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
High-Risk Human Papilloma Virus Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	4/18 x 4-cap strip

Table A1 4. Reagents and materials provided in VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-HRP101 and VS-HRP136. For use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments and compatible accessories with strips of 4 tubes 0.1 ml (72-Well Rotor and Locking Ring 72-Well Rotor).

A1.3 Test procedure

A1.3.1 Lyophilized positive control

High-Risk Human Papilloma Virus Positive Control contains high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized High-Risk Human Papilloma Virus Positive Control (red vial) by adding 200 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

A1.3.2 PCR protocol

Determine and separate the number of required reactions including samples and controls. One positive and negative control must be included in each run for each assay. Peel off protective aluminium seal from strips.

- 1) Reconstitute the number of wells you need.

Add 15 µL of Rehydration Buffer (blue vial) into each well.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of DNA sample, reconstituted *High-Risk Human Papilloma Virus* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close them with the provided caps. It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips or gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes (for Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Load the strips in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (consult thermocycler compatibility on CerTest's website www.certest.es).

Program the thermocycler following the conditions listed below and start the run:

Cycles	Step	Time	Temperature
1	Polymerase activation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 seg	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 seg	60°C

Table A1 5. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (HPV 16 other HR HPVs (HPVs 33, 45 and/or 51)), ROX (Internal Control (IC) and other HR HPVs (HPVs 31, 39 and/or 56)), HEX, JOE or VIC (HPV 18 and other HR HPVs (HPVs 52, 59 and/or 68)) and Cy5 (other HR HPVs (HPVs 35, 58 and/or 66)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certest.es). In Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

ANNEX 2

TUBE FORMAT WITH INTERNAL CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-HRP148T

Table A2. 1. References.

A2.1 Principle of the procedure

VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit contains in each Reaction-Mix tube all the components necessary for 24 real time PCR reactions (specific primers/probes, dNTPs, buffer and polymerase) in a stabilized format, as well as an internal control to discard the inhibition of the polymerase activity.

Target		Channel	Gene
High-Risk Human Papilloma Virus 1	HPV 16	FAM	L2
	Internal Control (IC)	ROX	-
	HPV 18	HEX, VIC or JOE *	L1
	Other HR HPVs (HPVs 35, 58 and/or 66)	Cy5	E6/E7
High-Risk Human Papilloma Virus 2	Other HR HPVs (HPVs 33, 45 and/or 51)	FAM	E7
	Other HR HPVs (HPVs 52, 59 and/or 68)	HEX, VIC or JOE *	E7
	Other HR HPVs (HPVs 31, 39 and/or 56)	ROX	E6/E7

Table A2. 2. Target, channel and genes. HR HPVs = High-Risk Human Papilloma Virus.

*Depending on the equipment used select the proper detection channel, channel, to check most common detection channels consult website www.certest.es.

A2.2 Reagents provided

VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table A2.3.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
High-Risk Human Papilloma Virus 1 Reaction-Mix tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and internal control in stabilized format	White	2 vials
High-Risk Human Papilloma Virus 2 Reaction-Mix tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	White	2 vials
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
High-Risk Human Papilloma Virus Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL

Table A2. 3. Reagents and materials provided in VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-HRP148T.

A2.3 Test procedure

A2.3.1 Lyophilized positive control

High-Risk Human Papilloma Virus Positive Control contains high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *High-Risk Human Papilloma Virus* Positive Control (red vial) by adding 200 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

A2.3.2 Lyophilized reaction mix tube

Determine the number of required reactions including samples and controls (one positive and negative control must be included in each run). Obtain the correct number of lyophilized Reaction-Mix vials (24-reactions each one) for testing.

Recommendation is to open and manipulate the *High-Risk Human Papilloma Virus* Reaction-Mix tube in pre-PCR laboratory area. Open lyophilized Reaction-mix tube (white vial) carefully to avoid disruption of the pellet and add 390 µL of Rehydration Buffer (blue vial) supplied. Mix gently by pipetting up and down. Spin down briefly to remove bubbles generated during mixing.

Once the Reaction-Mix tube has been re-suspended, return unused reagents to the appropriate storage conditions at -20°C. Recommendation is to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

Note: The volume of the rehydrated Reaction-Mix is sufficient for 24 reactions. The rehydrated Reaction-Mix may be kept at 25°C±5°C or 2-8°C for up to 4-hours (see Transport and storage conditions section for additional storage options).

A2.3.3 PCR protocol

- 1) Adding rehydrated Reaction-Mix to the number of required wells.

Add 15 µL of rehydrated *High-Risk Human Papilloma Virus* Reaction-Mix (white vial) into each well.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of DNA sample, reconstituted *High-Risk Human Papilloma Virus* Positive Control (red vial) or Negative Control (violet vial) in different wells and close the tubes with caps or seal the plate. Centrifuge briefly.

Load the plate, the strips, or tubes in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (consult thermocycler compatibility on CerTest's website www.certest.es).

Program the thermocycler following the conditions listed below and start the run:

Cycles	Step	Time	Temperature
1	Polymerase activation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 seg	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 seg	60°C

Table A2. 4. PCR protocol.

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (HPV 16 and other HR HPVs (HPVs 33, 45 and/or 51)), ROX (Internal Control (IC) and other HR HPVs (HPVs 31, 39 and/or 56)), HEX, JOE or VIC (HPV 18 and other HR HPVs (HPVs 52, 59 and/or 68)) and Cy5 (other HR HPVs (HPVs 35, 58 and/or 66)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certtest.es). In Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

ANNEX 3

OPEN AND ROTOR-GENE FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-HRP106LE
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-HRP106HE
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-HRP112LE
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-HRP112HE
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HRP136E
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-HRP101LE
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-HRP101HE
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HRP101E

Table A3. 1. References.

A3.1 Principle of the procedure

VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPs, buffer and polymerase) in a stabilized format. The assay can use an Extraction Control (EC) which can be introduced into each sample at the lysis buffer stage of the extraction process. This control can be used to monitor the extraction process and/or discard the inhibition of the polymerase activity.

Target	Channel	Gene
Extraction control (EC)	ROX	-
High-Risk Human Papilloma Virus 1	HPV 16	FAM
	HPV 18	HEX, VIC or JOE *
	Other HR HPVs (HPVs 35, 58 and/or 66)	Cy5
High-Risk Human Papilloma Virus 2	Other HR HPVs (HPVs 33, 45 and/or 51)	FAM
	Other HR HPVs (HPVs 52, 59 and/or 68)	HEX, VIC or JOE *
	Other HR HPVs (HPVs 31, 39 and/or 56)	ROX

Table A3. 2. Target, channel and genes. HR HPVs = High-Risk Human Papilloma Virus.

*Depending on the equipment used select the proper detection channel, to check most common detection channels consult website www.certest.es.

A3.2 Reagents provided

VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Tables A3.3 y A3.4. Based on the commercial presentation and the Real Time PCR platform used, the stabilized PCR reaction mix could be placed inside different wells and could be marketed on multiple formats. Table A3.3 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible devices. Table A3.4

includes materials and reagents for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments for 4-well strips. (Consult the thermocycler compatibility on CerTest's website www.certest.es)

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
High-Risk Human Papilloma Virus 1 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	White	1/3/6 x 8-well strip
High-Risk Human Papilloma Virus 2 8-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	White	1/3/6 x 8-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
High-Risk Human Papilloma Virus Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Extraction Control	Non-infectious nucleic acid lyophilized	Green	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Optical caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	2/6/12 x 8-cap strip

Table A3. 3. Reagents and materials provided in VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-HRP101LE, VS-HRP101HE, VS-HRP106LE, VS-HRP106HE, VS-HRP112LE and VS-HRP112HE.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
High-Risk Human Papilloma Virus 1 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	Transparent	2/9 x 4-well strip
High-Risk Human Papilloma Virus 2 4-well strips	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	Transparent	2/9 x 4-well strip
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
High-Risk Human Papilloma Virus Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Extraction Control	Non-infectious nucleic acid lyophilized	Green	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Caps for sealing wells during thermal cycling	Transparent	4/18 x 4-cap strip

Table A3. 4. Reagents and materials provided in VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-HRP101E and VS-HRP136TE. For use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments and compatible accessories with strips of 4 tubes 0.1 ml (72-Well Rotor and Locking Ring 72-Well Rotor).

A3.3 Test procedure

A3.3.1 Lyophilized extraction control

Recommendation is to open and manipulate the Extraction Control (EC) in pre-PCR laboratory area away from the lyophilized positive control. Reconstitute the lyophilized Extraction Control (green vial) by adding 500 µL of Water RNase/DNase free (white vial) supplied and vortex thoroughly.

Once the Extraction Control has been re-suspended, store it at -20°C. Recommendation is to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

Note: The Water RNase/DNase free vial must be utilized first to reconstitute the lyophilized Extraction Control in pre-PCR laboratory area, and subsequently, it can be used to reconstitute the lyophilized *High-Risk Human Papilloma Virus* Positive Control in an area away from the other components.

A3.3.2 Lyophilized positive control

High-Risk Human Papilloma Virus Positive Control contains high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *High-Risk Human Papilloma Virus* Positive Control (red vial) by adding 200 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

A3.3.3 PCR protocol

Determine and separate the number of required reactions including samples and controls. One positive and negative control must be included in each run for each assay. Peel off protective aluminium seal from strips.

- 1) Reconstitute the number of wells you need.

Add 15 µL of Rehydration Buffer (blue vial) into each well.

- 2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of Negative Control (violet vial) in the reserved wells for negative control.

Add 5 µL of DNA sample in different wells.

Add 5 µL of reconstituted *High-Risk Human Papilloma Virus* Positive Control (red vial) in the reserved wells for positive control.

If the EC is only used as PCR inhibition control, add 1 µL of the EC (green vial) to the negative control/sample/positive control wells.

It is recommended to briefly centrifuge the 8-well strips, or gently tap each strip onto a hard surface to ensure that all the liquids are at the bottom of the tubes (for Qiagen/Corbett Rotor-Gene® kit).

Load the strips in the thermocycler.

- 3) Set up the thermocycler (consult thermocycler compatibility on CerTest's website www.certest.es).

Program the thermocycler following the conditions listed below and start the run:

Cycles	Step	Time	Temperature
1	Polymerase activation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 seg	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 seg	60°C

Table A3. 5. PCR protocol.

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (HPV 16 and other HR HPVs (HPVs 33, 45 and/or 51)), ROX (Internal Control (IC) and other HR HPVs (HPVs 31, 39 and/or 56)), HEX, JOE or VIC (HPV 18 and other HR HPVs (HPVs 52, 59 and/or 68)) and Cy5 (other HR HPVs (HPVs 35, 58 and/or 66)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certest.es). In Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

ANNEX 4

TUBE FORMAT WITH EXTRACTION CONTROL

Annex for the following references:

PRODUCT	REFERENCE
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-HRP148TE

Table A4. 1. References.

A4.1 Principle of the procedure

VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit contains in each Reaction-Mix tube all the components necessary for 24 real time PCR reactions (specific primers/probes, dNTPs, buffer and polymerase) in a stabilized format. The assay can use an Extraction Control (EC) which can be introduced into each sample at the lysis buffer stage of the extraction process. This control can be used to monitor the extraction process and/or discard the inhibition of the polymerase activity.

Target		Channel	Gene
Extraction control (EC)		ROX	-
High-Risk Human Papilloma Virus 1	HPV 16	FAM	L2
	HPV 18	HEX, VIC or JOE *	L1
	Other HR HPVs (HPVs 35, 58 and/or 66)	Cy5	E6/E7
High-Risk Human Papilloma Virus 2	Other HR HPVs (HPVs 33, 45 and/or 51)	FAM	E7
	Other HR HPVs (HPVs 52, 59 and/or 68)	HEX, VIC or JOE *	E7
	Other HR HPVs (HPVs 31, 39 and/or 56)	ROX	E6/E7

Table A4. 2. Target, channel and genes. HR HPVs = High-Risk Human Papilloma Virus.

*Depending on the equipment used select the proper detection channel, to check most common detection channels consult website www.ceratest.es.

A4.2 Reagents provided

VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Table A4.3.

Reagent/Material	Description	Colour	Amount
High-Risk Human Papilloma Virus 1 Reaction-Mix tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	White	2 vials
High-Risk Human Papilloma Virus 2 Reaction-Mix tube	A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs and stabilizers in stabilized format	White	2 vials
Rehydration Buffer	Solution to reconstitute the stabilized product	Blue	1 vial x 1.8 mL
High-Risk Human Papilloma Virus Positive Control	Non-infectious synthetic lyophilized DNA	Red	1 vial
Extraction Control	Non-infectious nucleic acid lyophilized	Green	1 vial
Negative control	Non template control	Violet	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	RNase/DNase free water	White	1 vial x 1 mL

Table A4. 3. Reagents and materials provided in VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-HRP148TE.

A4.3 Test procedure

A4.3.1 Lyophilized extraction control

Recommendation is to open and manipulate the Extraction Control (EC) in pre-PCR laboratory area away from the lyophilized positive control. Reconstitute the lyophilized Extraction Control (green vial) adding 500 µL of Water RNase/DNase free (white vial) supplied and vortex thoroughly.

Once the Extraction Control has been re-suspended, store it at -20°C. Recommendation is to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

Note: The Water RNase/DNase free vial must be utilized first to reconstitute the lyophilized Extraction Control in pre-PCR laboratory area, and subsequently, it can be used for reconstitute the lyophilized *High-Risk Human Papilloma Virus* Positive Control in an area away from the other components.

A4.3.2 Lyophilized positive control

High-Risk Human Papilloma Virus Positive Control contains high copies of the template, the recommendation is to open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components. Reconstitute the lyophilized *High-Risk Human Papilloma Virus* Positive Control (red vial) by adding 200 µL of the supplied Water RNase/DNase free (white vial) and vortex thoroughly.

Once the positive control has been re-suspended, store it at -20°C. It is recommended to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

A4.3.3 Lyophilized reaction mix tube

Determine the number of required reactions including samples and controls (one positive and negative control must be included in each run). Obtain the correct number of lyophilized Reaction-Mix vials (24-reactions each one) for testing.

Recommendation is to open and manipulate the *High-Risk Human Papilloma Virus* Reaction-Mix tube in pre-PCR laboratory area. Open lyophilized Reaction-mix tube (white vial) carefully to avoid disruption of the pellet and add 390 µL of Rehydration Buffer (blue vial) supplied. Mix gently by pipetting up and down. Spin down briefly to remove bubbles generated during mixing.

Once the Reaction-Mix tube has been re-suspended, return unused reagents to the appropriate storage conditions at -20°C. Recommendation is to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

Note: The volume of the rehydrated Reaction-Mix is sufficient for 24 reactions. The rehydrated Reaction-Mix may be kept at 25°C±5°C or 2-8°C for up to 4-hours (see Transport and storage conditions section for additional storage options).

A4.3.4 PCR protocol

- 1) Adding rehydrated Reaction-Mix to the number of required wells.

Add 15 µL of rehydrated *High-Risk Human Papilloma Virus* Reaction-Mix (white vial) into each well.

2) Adding samples and controls.

Add 5 µL of Negative Control (violet vial) in the reserved wells for negative control.

Add 5 µL of DNA sample in different wells.

Add 5 µL of reconstituted *High-Risk Human Papilloma Virus* Positive Control (red vial) in the reserved wells for positive control.

If the EC is only used as PCR inhibition control, add 1 µL of the EC (green vial) to the negative control/sample/positive control wells.

Close the wells with the caps provided. Centrifuge briefly.

Load the plate, the strips or tubes in the thermocycler.

3) Set up the thermocycler (consult thermocycler compatibility on CerTest's website www.certest.es).

Program the thermocycler following the conditions listed below and start the run:

Cycles	Step	Time	Temperature
1	Polymerase activation	2 min	95°C
45	Denaturation	10 seg	95°C
	Annealing/Extension (Data collection*)	50 seg	60°C

Table A4. 4. PCR protocol.

Fluorogenic data should be collected during the extension step (*) through the FAM (HPV 16 and other HR HPVs (HPVs 33, 45 and/or 51)), ROX (Internal Control (IC) and other HR HPVs (HPVs 31, 39 and/or 56)), HEX, JOE or VIC (HPV 18 and other HR HPVs (HPVs 52, 59 and/or 68)) and Cy5 (other HR HPVs (HPVs 35, 58 and/or 66)). Depending on the equipment used select the proper detection channel (to check most common detection channels consult website www.certest.es). In Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none. In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System select Ramp Speed Standard in Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

ESPAÑOL

1. Uso previsto

VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit es una prueba de PCR en tiempo real diseñada para la detección cualitativa y simultánea de 14 virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo (VPH: tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68), así como la identificación de los dos genotipos VPHs principales, VPH 16 y VPH 18, en muestras cervicales (en solución de base líquida para citología), procedentes de personas con sospecha de infección por HPV de alto riesgo, recogidas por su profesional de la salud (PS). El uso previsto de este test es facilitar la detección de la infección causada por VPH de alto riesgo, así como la identificación de los VPH tipo 16 y 18, en combinación con factores de riesgo clínicos y epidemiológicos. El DNA se extrae de muestras clínicas, se amplifica mediante PCR a tiempo real y se detecta utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*), específicos para el DNA de VPHs de alto riesgo.

2. Introducción y explicación

El virus del papiloma humano (VPH) es un virus de DNA pequeño, no envuelto y de doble cadena, que infecta comúnmente a las células epiteliales humanas cutáneas y de la mucosa. Forma parte de la familia *Papillomaviridae*, y más de 200 genotipos de VPH han sido identificados y agrupados en géneros diferentes (Alfa-, Nu/Mu-, Beta- y Gamma- papilomavirus), en base a su estructura genómica viral y su tropismo por los tejidos epiteliales humanos. El género Alfa incluye genotipos de los que se han descrito su capacidad de causar cáncer, mientras que la infección por Beta- y Gamma- papilomavirus cursa generalmente de manera asintomática. Sin embargo, los estados de inmunosupresión (ej. los asociados a injertos de tejido, infección por VIH, o por el trastorno de epidermodisplasia verruciforme, entre otros), pueden desencadenar que estos tipos produzcan papilomas cutáneos o que aumenten la predisposición al cáncer de piel.

La infección por VPH se asocia con prácticamente todos los cánceres de cuello de útero, y con una proporción significativa de cánceres anogenitales (vulvar, vaginal, de pene y anal) y orofaríngeos, así como con otras lesiones de piel y de mucosa, tales como verrugas o papilomas benignos. El VPH infecta tanto a hombres como mujeres, si bien es cierto que la carga de la enfermedad atribuible es mucho mayor en mujeres debido a la alta susceptibilidad de la infección de células cervicales por parte del VPH. La mayoría de las infecciones son inofensivas y desaparecen espontáneamente, pero la infección persistente con VPH de alto riesgo (en especial por el de tipo 16) puede dar lugar al desarrollo de cáncer de cuello uterino, de vulva, de vagina, de ano, de pene y orofaríngeo. El riesgo de desarrollar cáncer depende del tipo de papiloma, así como de la persistencia de la infección. Al menos 14 VPH son conocidos como de tipo "alto-riesgo" debido a que se asocian con el desarrollo de cáncer de cuello de útero, los cuales son: VPH16, VPH18, VPH 31, VPH 33, VPH 35, VPH 39, VPH45, VPH51, VPH52, VPH56, VPH58, VPH59, VPH66 y VPH68. Los VPH de tipo 16 y 18 se asocian con aproximadamente el 70% de los cánceres de cuello uterino, siendo el de tipo 16 detectado en alrededor del 57% de las mujeres con este tipo de cáncer, mientras que el de tipo 18 se detecta en alrededor del 16%, con algunas variaciones según la región.

Debido a su papel crucial y a la necesidad de su expresión continuada para mantener el fenotipo asociado a la enfermedad, el VPH puede utilizarse como biomarcador de cáncer de cuello de útero y de pre-cáncer. La precisión en la detección del VPH, así como su genotipado y la evaluación de su estado genómico, están

cobrando más importancia en: 1) programas de cribado de cánceres de cuello uterino, que ayuden tanto a controlar la expansión como a la investigación de su comportamiento epidemiológico; 2) en la evaluación de la eficacia de las vacunas contra el VPH, y 3) en la investigación del papel de la infección del VPH durante el diagnóstico de otras enfermedades, así como el potencial del pronóstico/predicción de la infección por VPH para la aplicación de diferentes tipos de tratamiento, particularmente la introducción de terapias antivirales tipo-específicas o vacunas monovalentes. La citología que emplea la tinción de Papanicolaou sobre frotis ha sido el método de cribado estándar utilizado para la detección de lesiones pre-malignas y cáncer de cuello uterino desde el año 1941, pero lleva asociada una ratio de falsos negativos de entre un 5 % a un 20%. No obstante, los tests moleculares de DNA de VPH se han incorporado al cribado de cáncer de cuello de útero de mujeres de normo-riesgo debido a las limitaciones de la citología. Actualmente, las pruebas moleculares de detección del VPH se utilizan: para el cribado de cáncer de cuello de útero en paralelo a la citología cervical; como prueba de detección primaria de cáncer de cuello uterino; para el cribado de cambios celulares anormales en el cuello del útero, que puedan derivar en cáncer de cuello uterino; y para la detección de células escamosas atípicas indeterminadas (ASCUS por sus siglas en inglés), o lesión intraepitelial escamosa (SIL de sus siglas en inglés). Los tests moleculares disponibles comercialmente más comunes están diseñados para la detección de DNA de VPH de alto riesgo que generan resultados agrupados sin identificar de manera específica el tipo de VPH presente. Los protocolos más ampliamente usados utilizan primers consenso dirigidos a una región altamente conservada del gen *L1*, debido a que son potencialmente capaces de detectar todos los tipos de VPH con tropismo hacia las células de mucosa, aunque los genes *E6* y *E7* también están siendo utilizados como diana por su actividad oncogénica (codifican las oncoproteínas *E6* y *E7*, responsables de la inhibición de los supresores tumorales *p53* y *pRB*).

3. Procedimiento

VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit* está diseñado para la detección cualitativa de los VPH de alto riesgo (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68), así como para la diferenciación de los VPH de tipo 16 y 18, a partir de muestras cervicales recogidas en solución de base líquida para citología. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de VPH se realiza mediante la amplificación de una región conservada del gen *L2* (VPH 16), *L1* (VPH 18), *E6* (VPH 35, 56 y 58) y *E7* (VPH 31, 33, 39, 45, 51, 52, 59, 66, 68), usando cebadores específicos y sondas marcadas con fluorescencia.

VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit* se basa en la actividad exonucleasa 5' de la DNA polimerasa. Durante la amplificación del DNA, esta enzima hidroliza la sonda unida a la secuencia de DNA complementaria, separando el fluoróforo del *quencher*. Esta reacción genera un aumento en la señal fluorescente proporcional a la cantidad de DNA diana. Dicha fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit* contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para el ensayo de PCR en tiempo real (cebadores / sondas específicas, dNTPs, tampón, polimerasa) en un formato estabilizado, así como un control interno para monitorizar la inhibición de la PCR. Cada kit incluye dos tipos de mezclas de reacción, y cada una corresponde a un ensayo diferente. La primera mezcla de reacción multiplex detecta VPH 16, VPH 18 y/o VPH 35, 58 y 66 (*High-Risk Human Papilloma Virus 1*), así como el Control Interno (CI). La segunda mezcla de reacción multiplex detecta los VPH 31, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 59 y/o 68 (*High-Risk Human Papilloma Virus 2*).

4. Reactivos suministrados

VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit incluye los materiales y reactivos detallados en el Anexo 1 para "open format" y "rotor-gene format" con control interno, el Anexo 2 para formato de tubo con de control interno, el Anexo 3 para "open format" y "rotor-gene format" con control de extracción, y el Anexo 4 para formato de tubo con de control de extracción.

5. Material requerido y no suministrado

La siguiente lista incluye los materiales que se requieren para el uso pero que no se incluyen en VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Consumibles de plástico compatibles con PCR a tiempo real (por ejemplo, tubos individuales, tiras de tubos y/o placas). Solo para formato tubo (Anexos 2 y 4).
- Kit de extracción de DNA.
- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio: -30°C a -10°C y / o $\leq -70^{\circ}\text{C}$.
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL y para tiras de tubos de PCR o placas de 96 pocillos (si está disponible).
- Vórtex.
- Micropipetas (0,5-20 μL , 20-200 μL).
- Puntas con filtro.
- Guantes desechables sin polvo.
- Loading block (para usar con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®). Solo para formato Rotor Gene (Anexos 1 y 3).

VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast & 7500 Real-Time PCR System, Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System, Agilent Technologies AriaMx Real-Time PCR System, DNA-Technology DTprime Real-time Detection Thermal Cycler, DNA-Technology DTLite Real-Time PCR System, Rotor-Gene® Q (Qiagen) and Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer.

Cuando se utiliza el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para reducir el riesgo de aplastar el tubo (Ref. PN 4388506). Para comprobar la compatibilidad del termociclador y los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es.

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test VIASURE Real Time PCR Detection Kits. Este ensayo ha sido validado con los siguientes valores de exposición:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology): canal FAM -500*, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 -500.

- DTLite Real-Time PCR System (DNA-Technology): canal FAM -200, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 - 500.

*Si el resultado en el canal FAM no es el esperado, no hay amplificaciones o se observa elevado ruido de fondo, por favor, baje los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.

6. Condiciones de transporte y almacenamiento

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación. Se ha validado la estabilidad del control positivo tras 6 ciclos de congelación y descongelación.
- Proteger los componentes de la luz.
- Para kits en formato tubo: Una vez el vial *High-Risk Human Papilloma Virus Reaction-Mix* ha sido reconstituido, puede mantenerse a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas. Para períodos de tiempo prolongados, se recomienda almacenar a -20°C y separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación (hasta un máximo de 6 ciclos).

7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado a ser utilizado por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado, instruido y entrenado específicamente en las técnicas de PCR en tiempo real y en los procedimientos de diagnóstico *in vitro* (incluida la capacitación en el instrumento de PCR en tiempo real (termociclador) y el sistema de extracción de ácido nucleico).
- Para diagnóstico *in vitro*.
- No se recomienda usar reactivos y/o materiales caducados.
- No utilizar el kit si la etiqueta de control de la caja exterior está rota o dañada.
- No utilizar los reactivos si el estuche exterior está abierto o dañado en el momento que se recibe.
- No utilizar los reactivos si los sobres o las bolsas que protegen los tubos están abiertos o dañados en el momento que se reciben.
- No utilizar los tubos de reacción si el material desecante que se incluye en cada sobre de aluminio no está o está dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio que contienen los tubos de reacción una vez abiertos.
- Cerrar los sobres de aluminio que protegen los tubos de reacción con el cierre zip inmediatamente después de cada uso (para las referencias VS-HRP136 y VS-HRP136E). Antes de cerrar los sobres eliminar cualquier exceso de aire.
- No utilizar los tubos de reactivos si el aluminio protector está roto o dañado.
- No mezclar reactivos de diferentes sobres y/o kits y/o lotes y/u otro proveedor.
- Proteger los reactivos de la humedad. Una exposición prolongada a la humedad puede afectar al rendimiento del producto.
- Para VS-HRP136 y VS-HRP136E (compatible con instrumentos Qiagen/Corbett Rotor-Gene®) utilice el loading block para pipetear reactivos y muestras en cada tubo y para ayudar en el ajuste correcto de las tapas, así como para evitar la contaminación.

- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- Diseñar un flujo de trabajo unidireccional. Se debe comenzar en el área de extracción y después pasar al área de amplificación y de detección. No poner en contacto las muestras, equipos y reactivos utilizados en un área con la zona en la que se realizó el paso anterior. Use áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles para evitar resultados falsos positivos.
- En el caso de que otros ensayos de PCR se estén llevando a cabo dentro de la misma área del laboratorio, asegurarse que el test *VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit* y cualquier otro reactivo y equipo adicional que se necesite para realizar el ensayo no estén contaminados. Evite en todo momento la contaminación microbiana y de ribonucleasa (RNasa)/desoxirribonucleasa (DNasa) de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo de RNasa/DNasa. Use una nueva punta para cada muestra. Es necesario cambiarse los guantes antes de la manipulación de los reactivos.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber, fumar o aplicar productos cosméticos en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas y/o biopeligrosas, así como los reactivos que han estado en contacto con las muestras, y deben ser gestionadas según la legislación sobre residuos sanitarios nacional. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Las muestras y los reactivos deben ser manejados en una cabina de seguridad biológica. Utilice equipo de protección personal (PPE) de acuerdo con las directrices actuales para la manipulación de muestras potencialmente infecciosas. Deseche los residuos de acuerdo con las regulaciones locales y estatales.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Asegúrese de utilizar un pocillo para la detección de los VPH 16, 18, 35, 58 y 66, y otro pocillo para la detección de los VPH 31, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 59 and 68. Tenga cuidado de no mezclarlos durante todo el proceso.
- De conformidad con el Reglamento (CE) n° 1907/2006 (REACH), VIASURE Real Time PCR Detection Kits no requieren ficha de datos de seguridad, debido a que se clasifican como no peligrosos para la salud y el medio ambiente por no contener sustancias y/o mezclas que reúnan los criterios de clasificación de peligrosidad dispuestos en el Reglamento (CE) n° 1272/2008 (CLP), o que se encuentren en una concentración superior al valor establecido en dicho reglamento para su declaración.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.

8. Procedimiento del test

Consulte el Anexo 1 para el "open format" y "rotor-gene format" con productos con control interno, el Anexo 2 para formato de tubo con productos con control interno, el Anexo 3 para el formato open format" y "rotor-gene format" con productos con control de extracción, y el Anexo 4 para formato de tubo con productos con control de extracción.

8.1. Recolección, transporte y almacenamiento de muestras

VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit ha sido testado en cervicales (muestras exocervicales y endocervicales) recogidas con hisopos endocervicales en solución PreservCyt®, empleando los viales ThinPrep® para el sistema ThinPrep® (HOLOGIC®). Otros tipos de muestras deben ser validados por el usuario.

La recolección, el almacenamiento y el transporte de las muestras deben mantenerse según las condiciones validadas por el usuario. En general, todas las muestras deben recolectarse y etiquetarse adecuadamente en recipientes limpios. Después de la recolección, las muestras deben colocarse en una bolsa de riesgo biológico y deben transportarse y procesarse lo antes posible para garantizar la calidad de la prueba. Las muestras recogidas en solución PreservCyt® deben transportarse a 15-30°C durante un máximo de 6 semanas, siguiendo las normativas locales y nacionales para el transporte de material patógeno. Para el transporte a largo plazo (más de 6 semanas), recomendamos el envío a 2-8° C, o a -20 ° C o menos si el medio de conservación lo permite. Se recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. Las muestras pueden almacenarse a 2-8° C o congeladas a -20°C o a -80°C para su conservación **si el medio de conservación lo permite**. Recomendamos seguir unas pautas de laboratorio apropiadas y/o las recomendaciones del fabricante para una correcta conservación de las muestras en el medio de recogida y transporte seleccionado. Deben evitarse ciclos de congelación-descongelación para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras clínicas deben recolectarse, transportarse y almacenarse de acuerdo con las pautas de laboratorio apropiadas. Para obtener más información, consulte la guía IDSA (Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., ... & Pritt, B. S. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94), y García-Lechuz Moya, J.M., González López, J.J., Orta Mira, N., Sánchez Romero, M.I. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero, M.I., (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla, E., Cantón Moreno, R., (editores). *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*.

8.2. Extracción de DNA

Realizar la preparación de la muestra de acuerdo con las recomendaciones que aparecen en las instrucciones de uso del kit de extracción utilizado.

Para la extracción de DNA a partir muestras clínicas puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático o cualquier kit de extracción de DNA disponible en el mercado y seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

- MagDEA Dx SV Kit, empleando el equipo de extracción magLEAD® 12gC instrument (Precision System Science Co.).
- MagMAX™ Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit, empleando el equipo de extracción automático KingFisher™ Flex (Thermo Fisher Scientific).
- Maxwell® RSC 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).

9. Interpretación de resultados

9.1. Referencias con Control Interno (referencias en Anexos 1 y 2)

Todo el resultado de la prueba debe ser evaluado por un profesional de la salud en el contexto de la historia clínica, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico. Compruebe la señal de control interno (CI) para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de los controles y las muestras se realiza mediante el software del equipo de PCR en tiempo real utilizado según las instrucciones del fabricante.

El uso de controles positivos y negativos en cada carrera valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo de control negativo y la presencia de señal en el pocillo de control positivo para VPH de alto riesgo.

Para una prueba de diagnóstico válida, se deben cumplir las siguientes condiciones de control:

Controles	High-Risk Human Papilloma Virus 1				High-Risk Human Papilloma Virus 2			interpretación de los controles
	VPH 16 (FAM) ¹	VPH 18 (HEX) ¹	Control Interno (ROX) ²	Otros VPH AR (VPH 35/58/66) (Cy5) ¹	Otros VPH AR (VPH 33/45/51) (FAM) ¹	Otros VPH AR (VPH 52/59/68) (HEX) ¹	Otros VPH AR (VPH 31/39/56) (ROX) ¹	
Control Positivo (CP)	≤40	≤40	≤40	≤40	≤40	≤40	≤40	Válido
Control Negativo (CN)	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≤40	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	Válido

Tabla 1. Rendimiento esperado de los controles. Ct no señal = sin curva de amplificación. VPH AR = Virus del papiloma humano de alto riesgo.

1. En los casos en los que falla uno o ambos controles (se observa una señal de amplificación en el control negativo y/o la ausencia de señales en el pocillo de control positivo para cualquier canal), todos los resultados se consideran "inválidos" y se requiere repetir el ensayo.

2. El Control Interno (CI) debería mostrar una señal de amplificación (Ct ≤40) en los pocillos del CP y CN.

La valoración de los resultados de las muestras clínicas debe realizarse tras el examen de los resultados de los controles positivo y negativo, una vez que se ha determinado que son válidos y aceptables. Si uno o más controles no son válidos, los resultados del paciente no se pueden interpretar.

Para la interpretación de los resultados de la muestra individual del paciente, use la siguiente tabla:

High-Risk Human Papilloma Virus 1				High-Risk Human Papilloma Virus 2			Interpretación para muestras individuales de pacientes
VPH 16 (FAM)	VPH 18 (HEX)	Control Interno (ROX)	Otros VPH AR (VPH 35/58/66) (Cy5)	Otros VPH AR (VPH 33/45/51) (FAM)	Otros VPH AR (VPH 52/59/68) (HEX)	Otros VPH AR (VPH 31/39/56) (ROX)	
≤40	≥40 o no señal	≤40 o no señal ¹	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	Detección de DNA de VPH 16
≥40 o no señal	≤40	≤40 o no señal ¹	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	Detección de DNA de VPH 18
≥40 o no señal	≥40 o no señal	≤40 o no señal ¹	Señal de amplificación en uno o más canales (Ct ≤40)				Detección de DNA de otros VPH AR diferentes de VPH 16 y VPH 18
≤40	≤40	≤40 o no señal ¹	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	Detección de DNA de VPH 16 y VPH 18
≤40	≥40 o no señal	≤40 o no señal ¹	Señal de amplificación en uno o más canales (Ct ≤40)				Detección de DNA de VPH 16 y otros VPH AR
≥40 o no señal	≤40	≤40 o no señal ¹	Señal de amplificación en uno o más canales (Ct ≤40)				Detección de DNA de VPH 18 y otros VPH AR
≤40	≤40	≤40 o no señal ¹	Señal de amplificación en uno o más canales (Ct ≤40)				Detección de DNA de VPH 16, VPH 18 y otros VPH AR
≥40 o no señal	≥40 o no señal	≤35 ²	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	VPH AR no detectado ²
≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥ 35 o no señal ²	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	Test Fallido- Repita el test ²

Tabla 2. Interpretación de resultados de muestras individuales de pacientes. Ct no señal = sin curva de amplificación. VPH AR = Virus del papiloma humano de alto riesgo.

1 El control interno (CI) muestra o no una señal de amplificación (Ct ≤40 o no señal). En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

2 En el caso de que los genes diana de VPH de alto riesgo resulten negativos, el CI debe mostrar una señal de amplificación con Ct menor de 35. En el caso de ausencia de señal o valor de Ct ≥ 35 del control interno, el resultado se considera "invalido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1: 100, o volver a extraer y repetir el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

En caso de un resultado ambiguo continuo, se recomienda revisar las instrucciones de uso, el proceso de extracción utilizado por el usuario, verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la qPCR y revisar los parámetros; verificar la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia.

Figura 1. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (High-Risk Human Papilloma Virus 1).

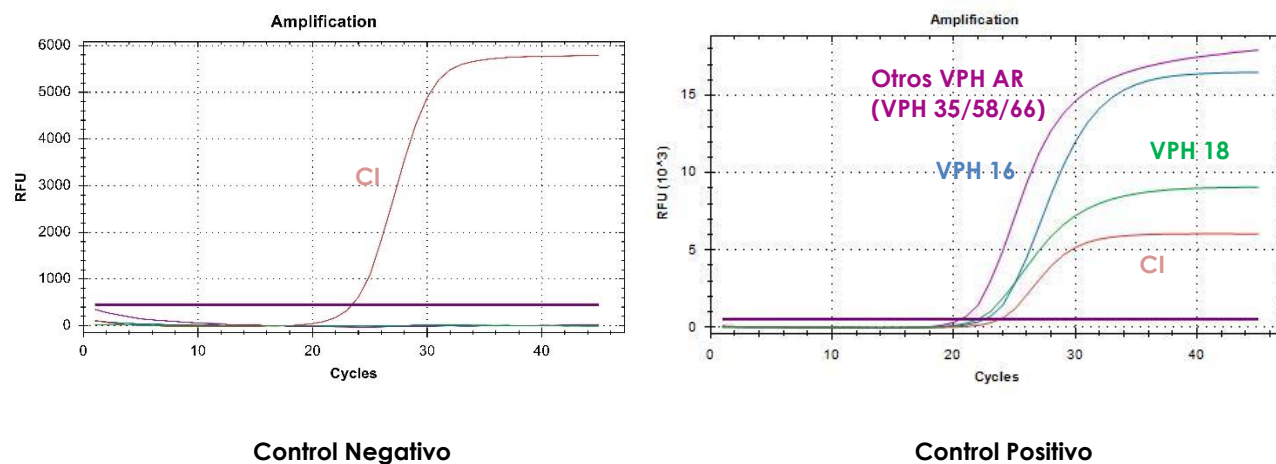
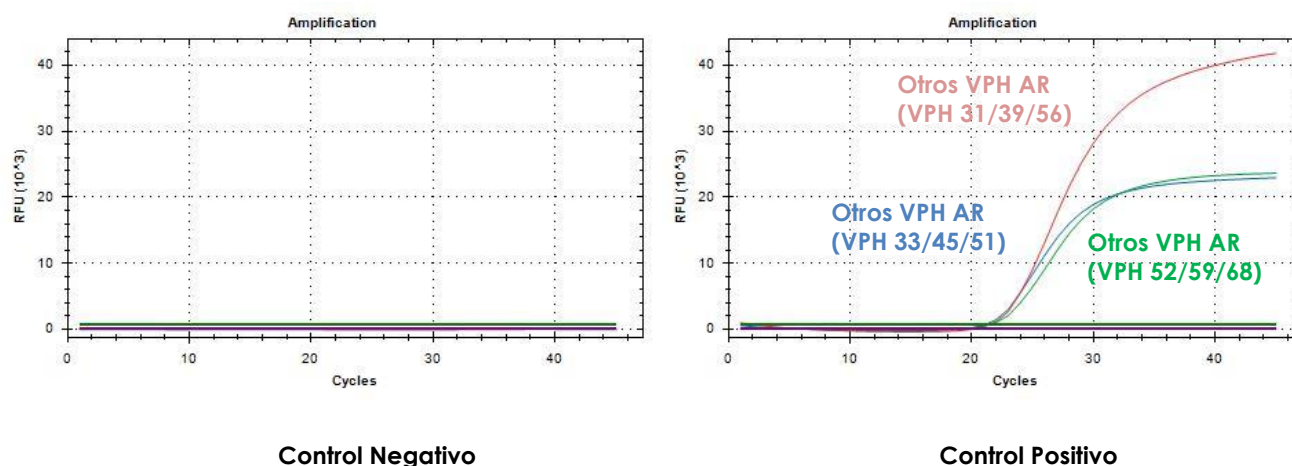


Figura 2. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (High-Risk Human Papilloma Virus 2).



9.2. Referencias con Control de Extracción (referencias en Anexos 3 y 4)

Todo el resultado de la prueba debe ser evaluado por un profesional de la salud en el contexto de la historia clínica, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico. Compruebe la señal del control de extracción (CE) para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de los controles y las muestras se realiza mediante el software del equipo de PCR en tiempo real utilizado según las instrucciones del fabricante.

El uso de controles positivo y negativo en cada carrera valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de señal para VPH de alto riesgo en el pocillo de control positivo.

Para una prueba de diagnóstico válida, se deben cumplir las siguientes condiciones de control:

Controles	High-Risk Human Papilloma Virus 1				High-Risk Human Papilloma Virus 2			interpretación de los controles
	VPH 16 (FAM) ¹	VPH 18 (HEX) ¹	Control de Extracción (ROX) ²	Otros VPH AR (VPH 35/58/66) (Cy5) ¹	Otros VPH AR (VPH 33/45/51) (FAM) ¹	Otros VPH AR (VPH 52/59/68) (HEX) ¹	Otros VPH AR (VPH 31/39/56) (ROX) ¹	
Control Positivo (CP)	≤40	≤40	≤40	≤40	≤40	≤40	≤40	Válido
Control Negativo (CN)	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≤40	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	Válido

Tabla 3. Rendimiento esperado de los controles. Ct no señal = sin curva de amplificación. VPH AR = Virus del papiloma humano de alto riesgo.

1 En los casos en los que falla uno o ambos controles (se observa una señal de amplificación en el control negativo y/o la ausencia de señales en el pocillo de control positivo para cualquier canal), todos los resultados se consideran "inválidos" y se requiere repetir el ensayo.

2 El Control de Extracción (CE) debería mostrar una señal de amplificación (Ct ≤40) en los pocillos del CP y CN.

La valoración de los resultados de las muestras clínicas debe realizarse tras el examen de los resultados de los controles positivo y negativo, una vez que se ha determinado que son válidos y aceptables. Si uno o más controles no son válidos, los resultados del paciente no se pueden interpretar.

Para la interpretación de los resultados de la muestra individual del paciente, use la siguiente tabla:

High-Risk Human Papilloma Virus 1				High-Risk Human Papilloma Virus 2			Interpretación para muestras individuales de pacientes
VPH 16 (FAM)	VPH 18 (HEX)	Control de Extracción (ROX)	Otros VPH AR (VPH 35/58/66) (Cy5)	Otros VPH AR (VPH 33/45/51) (FAM)	Otros VPH AR (VPH 52/59/68) (HEX)	Otros VPH AR (VPH 31/39/56) (ROX)	
≤40	≥40 o no señal	≤40 o no señal ¹	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	Detección de DNA de VPH 16
≥40 o no señal	≤40	≤40 o no señal ¹	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	Detección de DNA de VPH 18
≥40 o no señal	≥40 o no señal	≤40 o no señal ¹	Señal de amplificación en uno o más canales (Ct ≤40)				Detección de DNA de otros VPH AR diferentes de VPH 16 y VPH 18
≤40	≤40	≤40 o no señal ¹	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	Detección de DNA de VPH 16 y VPH 18
≤40	≥40 o no señal	≤40 o no señal ¹	Señal de amplificación en uno o más canales (Ct ≤40)				Detección de DNA de VPH 16 y otros VPH AR
≥40 o no señal	≤40	≤40 o no señal ¹	Señal de amplificación en uno o más canales (Ct ≤40)				Detección de DNA de VPH 18 y otros VPH AR
≤40	≤40	≤40 o no señal ¹	Señal de amplificación en uno o más canales (Ct ≤40)				Detección de DNA de VPH 16, VPH 18 y otros VPH AR
≥40 o no señal	≥40 o no señal	≤35 ²	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	VPH AR no detectado²
≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥ 35 o no señal ²	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	≥40 o no señal	Test Fallido- Repita el test²

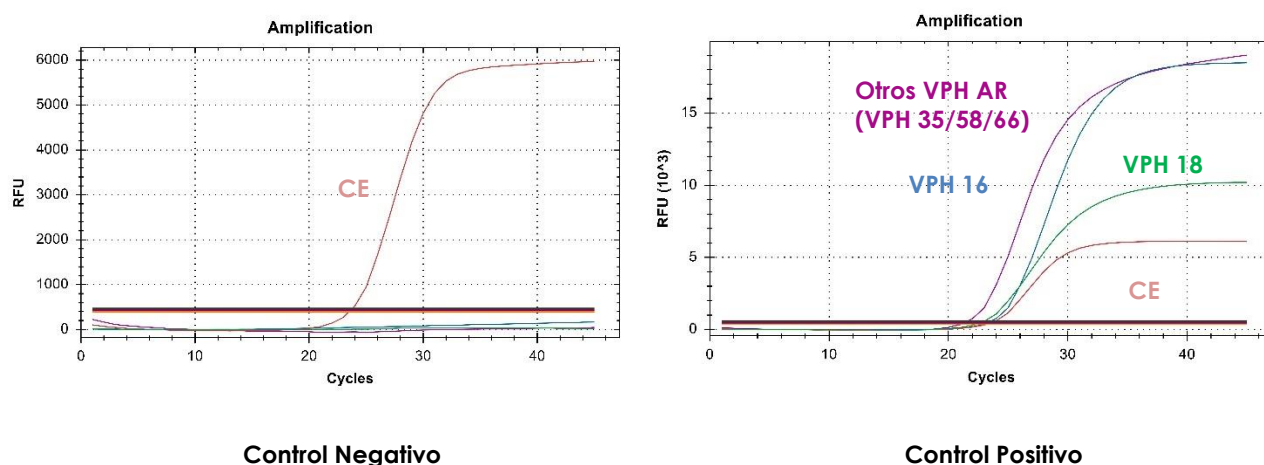
Tabla 4. Interpretación de resultados de muestras individuales de pacientes. Ct no señal = sin curva de amplificación. VPH AR = Virus del papiloma humano de alto riesgo.

1 El Control de Extracción (CE) muestra o no una señal de amplificación ($C_t \leq 40$ o no señal). En ocasiones, la detección del control de extracción no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico diana puede causar una amplificación preferencial de esta última.

2 En el caso de que los genes diana de VPH de alto riesgo resulten negativos, el CE debe mostrar una señal de amplificación con C_t menor de 35. En el caso de ausencia de señal o valor de $C_t \geq 35$ del control de extracción, el resultado se considera "invalido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1: 100, o volver a extraer y repetir el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

En caso de un resultado ambiguo continuo, se recomienda revisar las instrucciones de uso, el proceso de extracción utilizado por el usuario, verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la qPCR y revisar los parámetros; verificar la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de la fluorescencia.

Figura 3. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (High-Risk Human Papilloma Virus 1).



10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Este ensayo se podría utilizar con diferentes tipos de muestras, aunque sólo ha sido validado con DNA extraído de muestras cervicales (exo- y endocervicales) recogidas con hisopos endocervicales en solución PreservCyt®, empleando los viales ThinPrep® para el sistema ThinPrep® (HOLOGIC®).
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Esta prueba es una prueba cualitativa y no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de obtener resultados falsos positivos debido a la contaminación cruzada por *High-Risk Human Papilloma Virus* Positive Control, ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA diana, o contaminación debido a productos de PCR de reacciones previas.
- Existe la posibilidad de obtener falsos positivos debido a la contaminación cruzada entre el Control de Extracción y *High-Risk Human Papilloma Virus* Positive Control, el cual contiene un elevado número de copias molde, durante su reconstitución al añadir el agua libre RNAsa/DNAsa (vial blanco). Cada uno de los procesos se debe de llevar a cabo siguiendo el orden establecido y en áreas del laboratorio separadas.

- Varios factores y sus combinaciones pueden dar lugar a Falsos Negativos, incluyendo:
 - Métodos inadecuados de recolección, transporte, almacenamiento y/o manipulación de muestras.
 - Procedimientos de procesamiento incorrectos (incluyendo la extracción de DNA).
 - Degradación del DNA durante el envío/almacenamiento y/o procesamiento de la muestra.
 - Una carga viral en la muestra por debajo del límite de detección para el ensayo.
 - La presencia de inhibidores de qPCR u otros tipos de sustancias interferentes. No se ha evaluado el impacto de las vacunas, terapias antivirales, antibióticos, quimioterapéuticos, fármacos inmunosupresores o cremas antifúngicas utilizados para prevenir infecciones por VPH o durante el tratamiento de la infección.
 - No seguir las instrucciones de uso y el procedimiento de ensayo.
- Un resultado positivo no indica necesariamente la presencia de virus viables y no implica que dichos virus sean infecciosos o que sean los agentes causantes de los síntomas clínicos. Sin embargo, un resultado positivo puede ser indicativo de la presencia de las secuencias diana de VPH de alto riesgo (genes L2 (VPH 16), L1 (VPH 18), E6 (VPH 35, 56, 58) y E7 (VPH 31, 33, 39, 45, 51, 52, 59, 66, 68)).
- Resultados negativos no excluyen padecer infección por VPH de alto riesgo, y no deben usarse como la única base para el tratamiento u otras decisiones de manejo del paciente. No se han determinado los tipos de muestras óptimas y el momento en el que se alcanzan los máximos niveles de la carga viral durante las infecciones causadas por VPH de alto riesgo. La recolección de múltiples muestras (tipos de muestras y en varios puntos a lo largo del tiempo) del mismo paciente puede ser necesaria para detectar el/los virus.
- Si las pruebas de diagnóstico de otras Enfermedades de Transmisión Sexual (ETS) son negativas y la presentación clínica del paciente y la información epidemiológica sugieren una posible infección por VPH de alto riesgo, entonces se debe considerar el resultado como un falso negativo y se debe discutir realizar nuevas pruebas al paciente.
- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como: equipo de PCR utilizado, sistema de extracción, tipo de muestra, tratamiento previo de la muestra etc.... entre otros.
- El análisis bioinformático mostró que los primers y sondas seleccionados son específicos para sus dianas establecidas: VPH tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 59, 56, 58, 66 y 68. También se observó que los primers y la sonda que detectan VPH 39 podrían detectar el VPH 68 debido a sus similitudes genéticas.
- El uso previsto de VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit es la detección de VPH de alto riesgo en muestras clínicas, llevándose a cabo dicha detección en grupos de tres genotipos por canal. Para VPH 16 y VPH 18 es posible además su identificación.
- Este kit no está indicado para la evaluación de un posible abuso sexual.
- La prevalencia de la infección por VPH en una población puede afectar al procedimiento. Los valores predictivos positivos disminuyen cuando se evalúa una población con prevalencia baja, o a individuos sin riesgo de infección.
- La infección por VPH de alto riesgo no es un indicador definitivo de la presencia de enfermedad de cuello uterino de alto grado, ni tampoco implica que en todos los casos vaya a desarrollarse ni dicha enfermedad, ni cáncer de cuello de útero.
- VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit detecta VPH de alto riesgo. Por tanto, otros VPH de bajo riesgo no detectados mediante este ensayo pueden estar presentes en la muestra.

11. Control de calidad

VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el Control Interno (CI) o el Control de Extracción (CE) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

El rendimiento clínico de VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit se probó utilizando muestras exocervicales y endocervicales recogidas con hisopos endocervicales en solución PreservCyt®, empleando los viales ThinPrep® para el sistema ThinPrep® (HOLOGIC®), mediante la realización de una evaluación multicéntrica en colaboración con entidades nacionales. En la siguiente tabla se incluye un resumen de las localizaciones, tipos de muestra y flujo de trabajo aplicado. Los resultados fueron los siguientes:

	Lugar	Tipo de muestra	Flujo de trabajo	Diana
1	Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Universitario Miguel Servet, Biobanco del Sistema de Salud de Aragón, y Certest Biotec (Zaragoza, España)	Muestras exo- y endocervicales recogidas con hisopos endocervicales en solución PreservCyt®, empleando los viales ThinPrep® (HOLOGIC®)	MagMAX™ Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit reagents empleando el equipo de extracción automática KingFisher Flex (Thermo Fisher Scientific) + Maxwell® RSC 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit empleando el equipo Maxwell® RSC 16 Instrument (Promega) + Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR instrument + Applied Biosystems 7500 Fast & 7500 Real-Time PCR System	VPH de alto riesgo

Tabla 5. Lugar, tipo de muestra, flujo de trabajo y diana.

Los valores positivos y negativos verdaderos, los falsos negativos y falsos positivos, la sensibilidad, la especificidad, el PPV, los valores de NPV para VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit se calcularon en relación con cada ensayo comparador, como se muestra en la siguiente tabla:

Lugar	Kit comparador	Diana	TP	TN	FP	FN	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV
1	cobas® HPV Test (Roche Diagnostics)	VPH 16	64	562	0	0	1 (0.94 – 1)	1 (0.99 – 1)	1 (0.94 – 1)	1 (0.99 – 1)
		VPH 18 y VPH 45	35	591	0	0	1 (0.90 – 1)	1 (0.99 – 1)	1 (0.90 – 1)	1 (0.99 – 1)
		Otros VPH de alto riesgo	190	435	0	1	0.99 (0.97 – 1)	1 (0.99 – 1)	0.99 (0.97-0.99)	1 (0.99-1)
	Anyplex™ II HPV HR (Seegene)	VPH 16	64	561	0	1	0.98 (0.91 – 1)	1 (0.99 – 1)	0.98 (0.91 – 0.99)	1 (0.99 – 1)
		VPH 18	18	608	0	0	1 (0.81 – 1)	1 (0.99 – 1)	1 (0.82-1)	1 (0.99 – 1)
		VPH 45	18	608	0	0	1 (0.81 – 1)	1 (0.99 – 1)	1 (0.82-1)	1 (0.99 – 1)
		VPH 35	25	598	2	1	0.96 (0.80 – 0.99)	0.99 (0.98 – 1)	0.96 (0.81 – 0.99)	0.99 (0.98 – 0.99)
		VPH 58	31	593	2	0	1 (0.88 – 1)	0.99 (0.98 – 1)	1 (0.89 – 1)	0.99 (0.98 – 0.99)
		VPH 66	15	609	2	0	1 (0.78 – 1)	0.99 (0.98 – 1)	1 (0.79 – 1)	0.99 (0.98 – 0.99)
		VPH 33	20	605	1	0	1 (0.83 – 1)	0.99 (0.99 – 1)	1 (0.83 – 1)	0.99 (0.99 – 1)
		VPH 51	18	607	1	0	1 (0.81 – 1)	0.99 (0.99 – 1)	1 (0.82 – 1)	0.99 (0.99 – 1)
		VPH 52	26	599	1	0	1 (0.86 – 1)	0.99 (0.99 – 1)	1 (0.87 – 1)	0.99 (0.99 – 1)
		VPH 59	25	600	1	0	1 (0.86 – 1)	0.99 (0.99 – 1)	1 (0.86 – 1)	0.99 (0.99-1)
		VPH 68	12	612	1	1	0.92 (0.64 – 0.99)	0.99 (0.99 – 1)	0.92 (0.66 – 0.98)	0.99 (0.99 – 1)
		VPH 31	35	586	4	1	0.97 (0.85 – 0.99)	0.99 (0.98 – 0.99)	0.97 (0.85 – 0.99)	0.99 (0.98 – 0.99)
		VPH 39	21	601	4	0	1 (0.83 – 1)	0.99 (0.98 – 0.99)	1 (0.84 – 1)	0.99 (0.98 – 0.99)
		VPH 56	21	600	4	1	0.95 (0.77 – 0.99)	0.99 (0.98 – 0.99)	0.95 (0.78 – 0.99)	0.99 (0.98 – 0.99)

Tabla 6. Valores verdaderos positivos (TP) y valores verdaderos negativos (TN), falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN), sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (PPV) y valor predictivo negativo (NPV) para VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit.

Los resultados muestran una alta concordancia para detectar VPH de alto riesgo utilizando VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit.

12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit presenta un límite de detección de 10 copias de DNA por reacción para los VPH 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 59 y 68; y 50 copias de DNA por reacción para VPH 16, 18, 58 y 66 (Figuras 4-17).

Figure 4. Diluciones seriadas de un estándar del VPH 16 (10^7 - 10^1 copies/rxn). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (High-Risk Human Papilloma Virus 1, canal FAM).

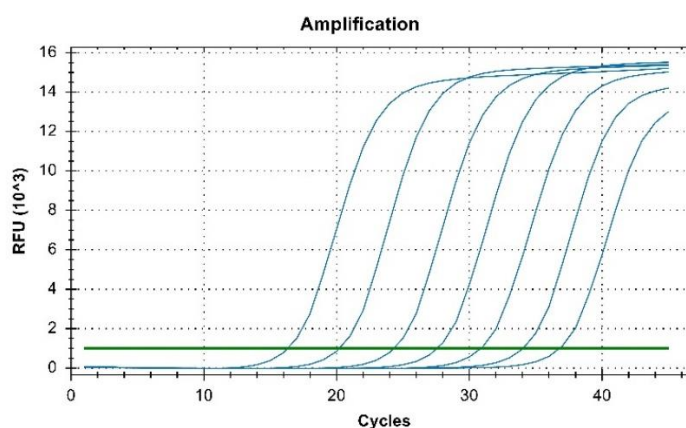


Figura 5. Diluciones seriadas de un estándar del VPH 18 (10^7 - 10^1 copias/rxn). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (High-Risk Human Papilloma Virus 1, canal HEX).

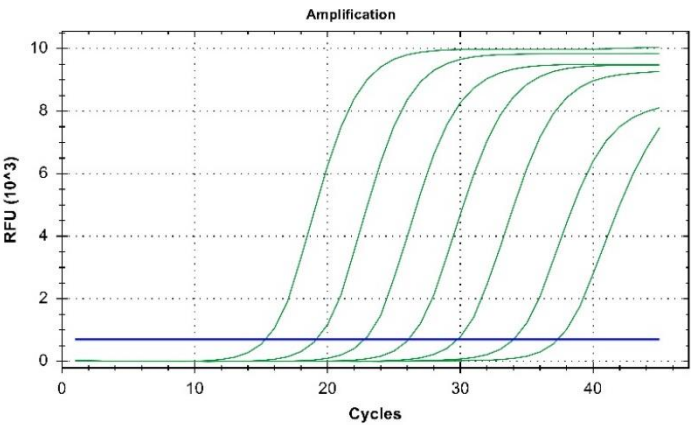


Figura 6. Diluciones seriadas de un estándar del VPH 35 (10^7 - 10^1 copias/rxn). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (High-Risk Human Papilloma Virus 1, canal Cy5).

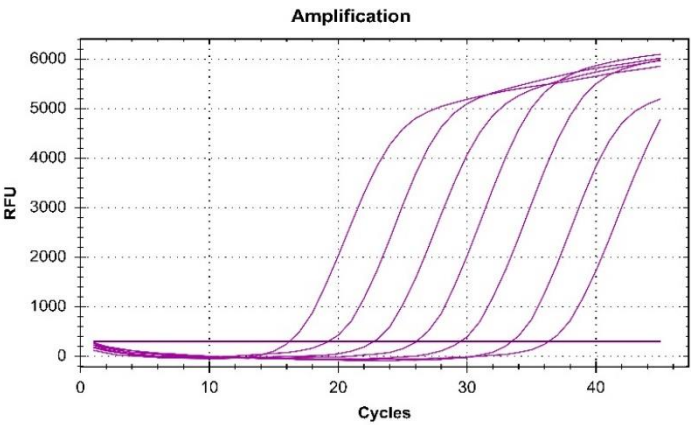


Figura 7. Diluciones seriadas de un estándar del VPH 58 (10^7 - 10^1 copias/rxn). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (High-Risk Human Papilloma Virus 1, canal Cy5).

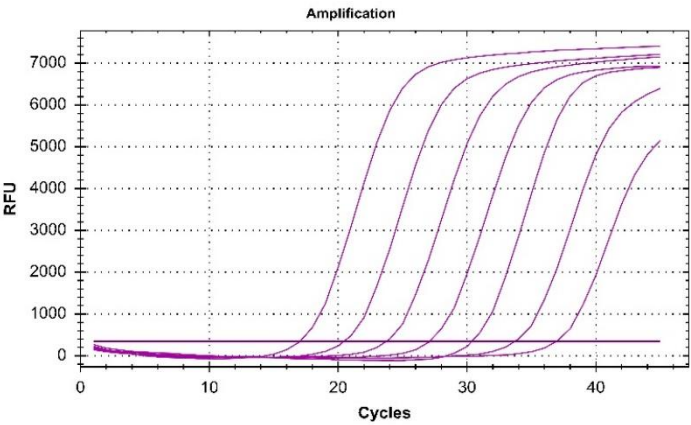


Figura 8. Diluciones seriadas de un estándar del VPH 66 (10^7 - 10^1 copies/rxn). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (High-Risk Human Papilloma Virus 1, canal Cy5).

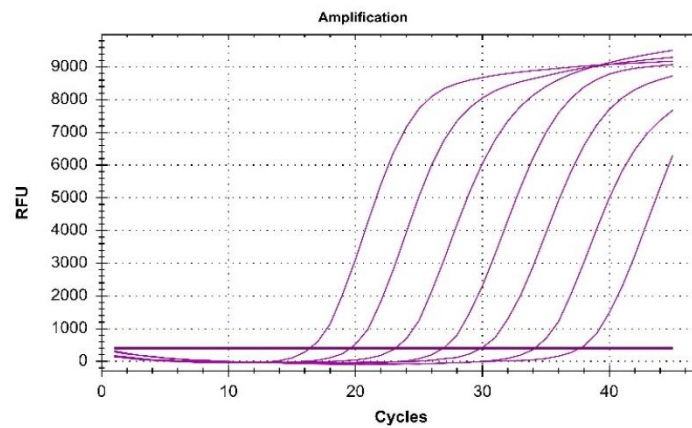


Figura 9. Diluciones seriadas de un estándar del VPH 33 (10^7 - 10^1 copies/rxn). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (High-Risk Human Papilloma Virus 2, canal FAM).

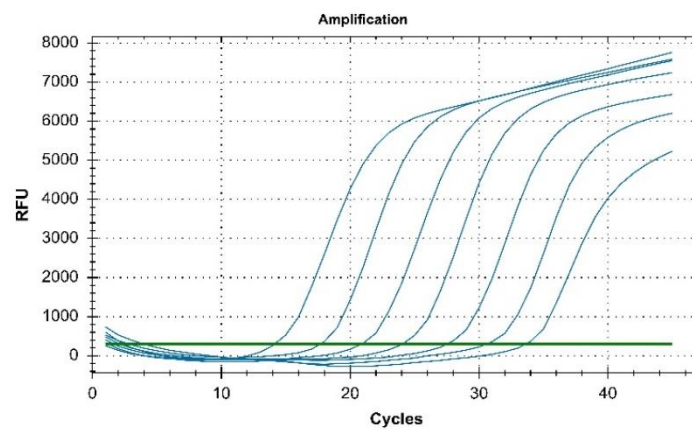


Figura 10. Diluciones seriadas de un estándar del VPH 45 (10^7 - 10^1 copies/rxn). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (High-Risk Human Papilloma Virus 2, canal FAM).

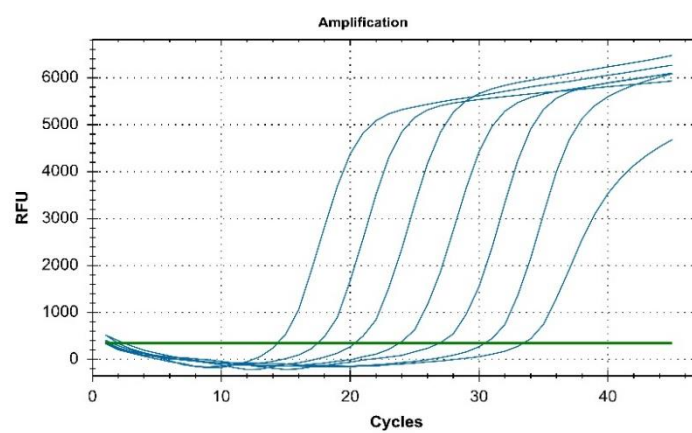


Figura 11. Diluciones seriadas de un estándar del VPH 51 (10^7 - 10^1 copias/rxn). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (High-Risk Human Papilloma Virus 2, canal FAM).

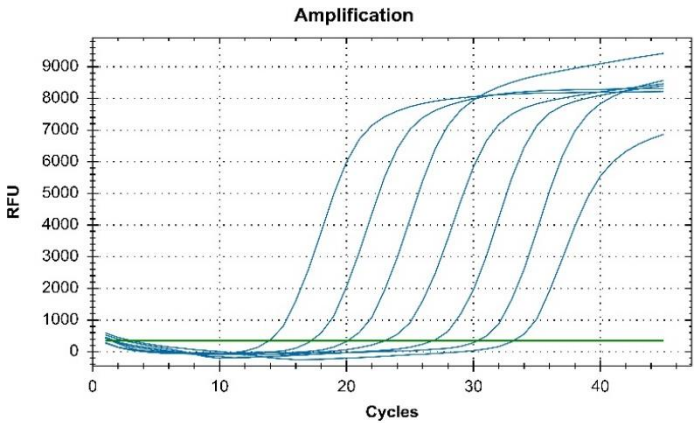


Figura 12. Diluciones seriadas de un estándar del VPH 52 (10^7 - 10^1 copias/rxn). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (High-Risk Human Papilloma Virus 2, canal HEX).

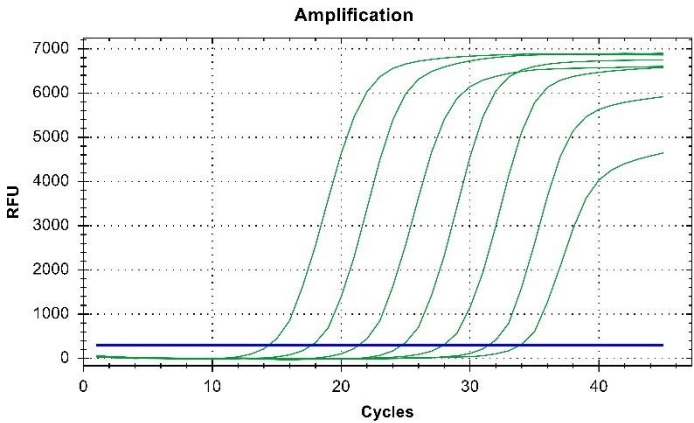


Figura 13. Diluciones seriadas de un estándar del VPH 59 (10^7 - 10^1 copias/rxn). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (High-Risk Human Papilloma Virus 2, canal HEX).

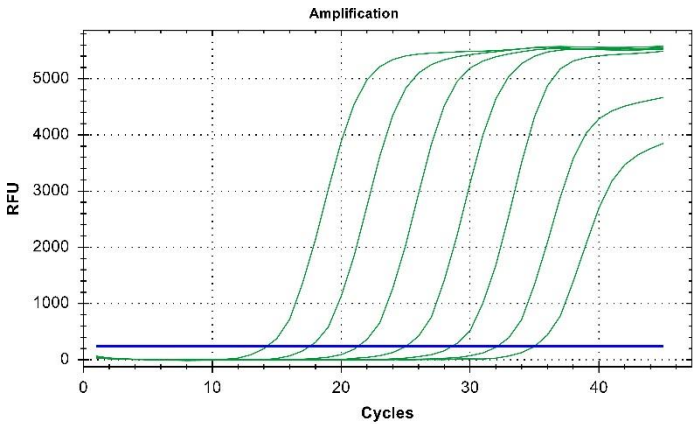


Figura 14. Diluciones seriadas de un estándar del VPH 68 (10^7 - 10^1 copias/rxn). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (High-Risk Human Papilloma Virus 2, canal HEX).

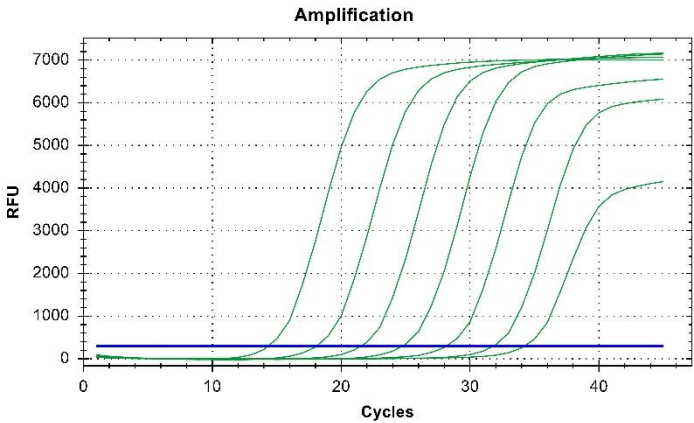


Figura 15. Diluciones seriadas de un estándar del VPH 31 (10^7 - 10^1 copias/rxn). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (High-Risk Human Papilloma Virus 2, canal ROX).

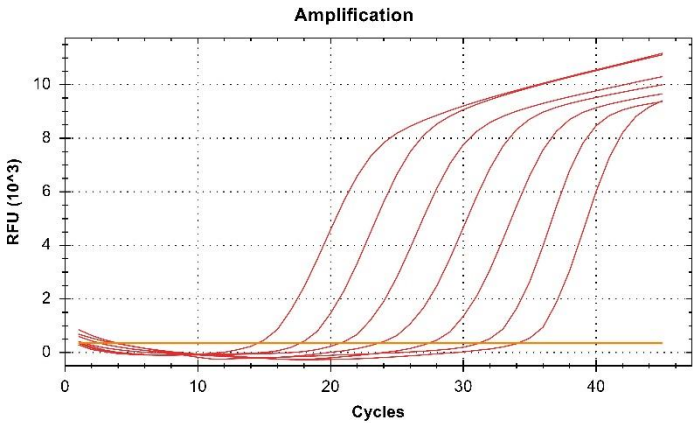


Figura 16. Diluciones seriadas de un estándar del VPH 39 (10^7 - 10^1 copias/rxn). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (High-Risk Human Papilloma Virus 2, canal ROX).

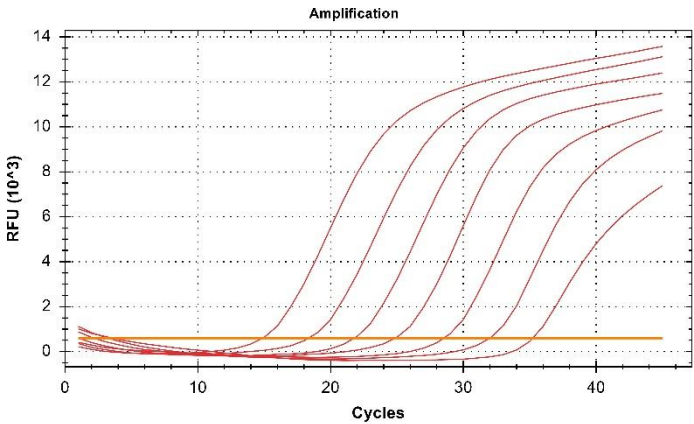
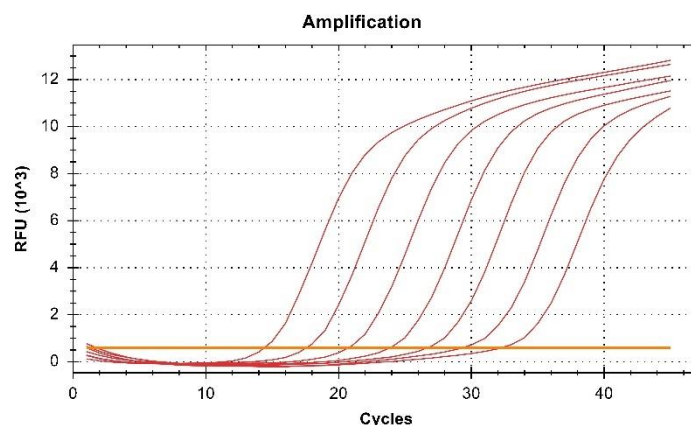


Figura 17. Diluciones seriadas de un estándar del VPH 56 (10^7 - 10^1 copios/rxn). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (High-Risk Human Papilloma Virus 2, canal ROX).



12.3. Especificidad analítica

La especificidad de VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit fue confirmada probando un panel compuesto por diferentes microorganismos que representan los patógenos más comunes implicados en las Enfermedades de Transmisión Sexual. No se detectaron reacciones cruzadas de VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit con ninguno de los siguientes microorganismos testados.

Cross-reactivity testing					
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Mycoplasma hominis</i>	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i> serotipo 11	-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> cepa 49226	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Escherichia coli</i> cepa 0.1285; O18:H7:K1	-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> cepa Lvl Ng PorA	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Gardnerella vaginalis</i>	-	<i>Neisseria meningitidis</i> serogrupo A	-
<i>Candida dubliniensis</i>	-	<i>Haemophilus ducreyi</i> cepa Class 1	-	<i>Proteus mirabilis</i>	-
<i>Candida glabrata</i>	-	<i>Haemophilus influenzae</i> cepa Minn A	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Candida krusei</i> (<i>Issatchenkia orientalis</i>)	-	Virus Hepatitis A	-	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-	Virus Herpes Simplex 1 cepa Macintyre	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	Virus Herpes Simplex 2 cepa MS	-	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> cepa Swedish	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Streptococcus agalactiae</i> cepa Z019	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> genovar F	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>Pneumoniae</i> serotipo Capsular 2	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> cepa Z022	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> (LGV)	-	<i>Listeria innocua</i> serotipo 6a	-	<i>Treponema pallidum</i>	-
Cytomegalovirus cepa AD-169	-	<i>Listeria ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i> serovar 5	-	<i>Trichomonas vaginalis</i>	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> serotipo Cloaca B	-	<i>Listeria monocytogenes</i> serovar 4b	-	<i>Ureaplasma parvum</i>	-
<i>Enterobacter cloacae</i> serotipo Cloaca A	-	<i>Mycoplasma genitalium</i>	-	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-

Tabla 7. Microorganismos patógenos de referencia utilizados en este estudio realizado en Certest.

12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit se evaluó frente a DNA sintético y específico, y frente a DNA extraído de muestras clínicas y de muestras clínicas simuladas procedentes de panels EQAs, positivas para VPH de alto riesgo (VPH tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68), mostrando resultados positivos.

ANEXO 1

FORMATO OPEN Y ROTOR-GENE CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIAS
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-HRP106L
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-HRP106H
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-HRP112L
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-HRP112H
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HRP136
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-HRP101L
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-HRP101H
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 1 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HRP101

Tabla A1. 1. Referencias

A1.1 Procedimiento

VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa.

Diana		Canal	Gen
High-Risk Human Papilloma Virus 1	VPH 16	FAM	L2
	Control Interno (CI)	ROX	-
	VPH 18	HEX, VIC or JOE *	L1
	Otros VPH AR (VPH 35, 58 y/o 66)	Cy5	E6/E7
High-Risk Human Papilloma Virus 2	Otros VPH AR (VPH 33, 45 y/o 51)	FAM	E7
	Otros VPH AR (VPH 52, 59 y/o 68)	HEX, VIC or JOE *	E7
	Otros VPH AR (VPH 31, 39 y/o 56)	ROX	E6/E7

Tabla A1. 2. Diana, canal y genes. VPH AR = Virus del papiloma humano de alto riesgo.

*Seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado. Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A1.2 Reactivos suministrados

VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas A1.3 y A1.4. Según la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos, y por tanto, comercializar en múltiples formatos. La Tabla A1.3 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos. La Tabla A1.4 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos

Qiagen / Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos. (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.cerTEST.es).

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
High-Risk Human Papilloma Virus 1 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control Interno en formato estabilizado	Blanco	1/3/6 tiras de 8 pocillos
High-Risk Human Papilloma Virus 2 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	1/3/6 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
High-Risk Human Papilloma Virus Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNase/DNase	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	2/6/12 tiras de 8 tapones

Tabla A1.3. Reactivos y materiales proporcionados VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-HRP101L, VS-HRP101H, VS-HRP106L, VS-HRP106H, VS-HRP112L y VS-HRP112H.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
High-Risk Human Papilloma Virus 1 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control Interno en formato estabilizado	Transparente	2/9 tiras de 4 pocillos
High-Risk Human Papilloma Virus 2 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Transparente	2/9 tiras de 4 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
High-Risk Human Papilloma Virus Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNase/DNase	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	4/18 tiras de 4 tapones

Tabla A1.4. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-HRP101 y VS-HRP136. Para uso en Qiagen/Corbett Rotor-Gene® y compatible con accesorios con tiras de 4 tubos 0,1 ml (72-Well Rotor and Locking Ring 72-Well Rotor).

A1.3 Procedimiento del test

A1.3.1 Control positivo liofilizado

El vial de *High-Risk Human Papilloma Virus* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *High-Risk Human Papilloma Virus* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 200 µL de Agua libre de RNase/DNase (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

A1.3.2 Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo. Retirar el aluminio protector de las tiras.

- 1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL del tampón de rehidratación (vial azul) en cada pocillo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *High-Risk Human Papilloma Virus* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatible con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar las tiras en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.certest.es).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Activación de la polimerasa	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla A1. 5. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (VPH 16 y otros VPH AR (VPH 33, 45 y/o 51)), ROX (Control Interno (CI) y otros VPH AR (VPH 31, 39 y/o 56)), HEX, JOE o VIC (VPH 18 y otros VPH AR (VPH 52, 59 y/o 68)) y Cy5 (otros VPH AR (VPH 35, 58 y/o 66)). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

ANEXO 2

FORMATO TUBO CON CONTROL INTERNO

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-HRP148T

Tabla A2. 1. Referencias.

A2.1 Procedimiento

VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit contiene en cada tubo de Reaction-Mix todos los componentes necesarios para llevar a cabo 24 reacciones de PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón, polimerasa) en formato estabilizado, así como un control interno para descartar la inhibición de la actividad polimerasa.

Diana		Canal	Gen
High-Risk Human Papilloma Virus 1	VPH 16	FAM	L2
	Control Interno (CI)	ROX	-
	VPH 18	HEX, VIC or JOE *	L1
	Otros VPH AR (VPH 35, 58 y/o 66)	Cy5	E6/E7
High-Risk Human Papilloma Virus 2	Otros VPH AR (VPH 33, 45 y/o 51)	FAM	E7
	Otros VPH AR (VPH 52, 59 y/o 68)	HEX, VIC or JOE *	E7
	Otros VPH AR (VPH 31, 39 y/o 56)	ROX	E6/E7

Tabla A2. 2. Diana, canal y genes. VPH AR = Virus del papiloma humano de alto riesgo.

*seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado, Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.ceratest.es.

A2.2 Reactivos suministrados

VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla A2.3.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>High-Risk Human Papilloma Virus 1</i> Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control Interno en formato estabilizado	Blanco	2 viales
<i>High-Risk Human Papilloma Virus 2</i> Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	2 viales
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
<i>High-Risk Human Papilloma Virus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNAsa/DNAsa	Blanco	1 vial x 1 mL

Tabla A2. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-HRP148T.

A2.3 Procedimiento del test

A2.3.1 Control positivo liofilizado

El vial de *High-Risk Human Papilloma Virus* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *High-Risk Human Papilloma Virus* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 200 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

A2.3.2 Mezcla de reacción liofilizada

Determinar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles (en cada serie de muestras a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo). Determinar el número de viales de Reaction-Mix liofilizados necesarios (24 reacciones cada uno) para realizar el ensayo.

Se recomienda abrirlo y manipularlo en el área de laboratorio de pre-PCR. Abrir el tubo de mezcla de reacción (vial blanco) con cuidado para evitar perturbar el pellet y añadir 390 µL de tampón de rehidratación (vial azul) suministrado. Mezclar suavemente mediante pipeteo arriba y abajo. Centrifugar brevemente para eliminar las burbujas formadas durante la mezcla.

Una vez el vial de Reaction-Mix ha sido resuspendido, guardar la cantidad no empleada en las condiciones de almacenamiento adecuadas a -20°C. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: El volumen de mezcla de reacción rehidratada es adecuado para llevar a cabo 24 reacciones. La mezcla de reacción rehidratada se puede mantener a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas (ver la sección Condiciones de transporte y almacenamiento para consultar opciones adicionales de almacenamiento).

A2.3.3 Protocolo PCR

- 1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL de *High-Risk Human Papilloma Virus* Reaction-Mix (vial blanco) rehidratado en cada tubo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *High-Risk Human Papilloma Virus* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) y cerrar los tubos con los tapones o sellar la placa. Centrifugar brevemente.

Colocar la placa, las tiras o tubos en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.certest.es).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Activación de la polimerasa	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla A2. 4. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (VPH 16 y otros VPH AR (VPH 33, 45 y/o 51)), ROX (Control Interno (CI) y otros VPH AR (VPH 31, 39 y/o 56)), HEX, JOE o VIC (VPH 18 y otros VPH AR (VPH 52, 59 y/o 68)) y Cy5 (otros VPH AR (VPH 35, 58 y/o 66)). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005PT™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

ANEXO 3

FORMATO OPEN Y ROTOR-GENE CON CONTROL DE EXTRACCIÓN

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIAS
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile	VS-HRP106LE
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile	VS-HRP106HE
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile	VS-HRP112LE
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile	VS-HRP112HE
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HRP136E
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, low profile	VS-HRP101LE
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 1 x 8-well strips, high profile	VS-HRP101HE
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit 2 x 4-well strips, Rotor-Gene®	VS-HRP101E

Tabla A3. 1. Referencias.

A3.1 Procedimiento

VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit contiene en cada pocillo todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón, polimerasa) en formato estabilizado. Este ensayo también se puede utilizar con un Control de Extracción (CE) que puede añadirse en cada muestra durante la etapa de adición del tampón de lisis del proceso de extracción. Este control sirve para monitorizar el proceso de extracción y/o descartar una posible inhibición de la actividad polimerasa.

Diana		Canal	Gen
Control de Extracción (CE)		ROX	-
High-Risk Human Papilloma Virus 1	VPH 16	FAM	L2
	VPH 18	HEX, VIC or JOE *	L1
	Otros VPH AR (VPH 35, 58 y/o 66)	Cy5	E6/E7
High-Risk Human Papilloma Virus 2	Otros VPH AR (VPH 33, 45 y/o 51)	FAM	E7
	Otros VPH AR (VPH 52, 59 y/o 68)	HEX, VIC or JOE *	E7
	Otros VPH AR (VPH 31, 39 y/o 56)	ROX	E6/E7

Tabla A3. 2. Diana, canal y genes. VPH AR = Virus del papiloma humano de alto riesgo.

*seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado, Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A3.2 Reactivos suministrados

VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas A3.3 y A3.4. Según la presentación comercial y la plataforma de PCR en tiempo real utilizada, la mezcla de reacción de PCR estabilizada se puede encontrar en diferentes tubos o pocillos, y por

tanto, comercializar en múltiples formatos. La Tabla A3.3 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos. La Tabla A3.4 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos. (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.certest.es).

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
High-Risk Human Papilloma Virus 1 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	1/3/6 tiras de 8 pocillos
High-Risk Human Papilloma Virus 2 8-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	1/3/6 tiras de 8 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
High-Risk Human Papilloma Virus Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
Tear-off 8-cap strips	Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	2/6/12 tiras de 8 tapones

Tabla A3.3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-HRP101LE, VS-HRP101HE, VS-HRP106LE, VS-HRP106HE, VS-HRP112LE y VS-HRP112HE.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
High-Risk Human Papilloma Virus 1 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Transparente	2/9 tiras de 4 pocillos
High-Risk Human Papilloma Virus 2 4-well strips	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Transparente	2/9 tiras de 4 pocillos
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
High-Risk Human Papilloma Virus Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL
4-cap strips	Tapones para sellar los pocillos durante el ciclo térmico	Transparente	4/18 tiras de 4 tapones

Tabla A3. 4. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-HRP101E y VS-HRP136E. Para usar con instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® y accesorios compatibles con tiras de 4 tubos 0,1 ml (72-Well Rotor y Locking Ring 72-Well Rotor).

A3.3 Procedimiento del test

A3.3.1 Control de extracción liofilizado

Se recomienda abrir y manipular el control de extracción (CE) en el área pre-PCR del laboratorio, alejada del control positivo liofilizado. Reconstituir el Control de Extracción liofilizado (vial verde) añadiendo 500 µL del Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el Control de Extracción a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: Se debe utilizar en primer lugar el vial de Agua libre de RNAsa/DNAsa para reconstituir el Control de Extracción liofilizado en el área pre-PCR del laboratorio, y después se debe usar para reconstituir el *High-Risk Human Papilloma Virus* Positive Control liofilizado en un área separada de los demás componentes.

A3.3.2 Control positivo liofilizado

El vial de *High-Risk Human Papilloma Virus* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *High-Risk Human Papilloma Virus* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 200 µL de Agua libre de RNAsa/DNAsa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

A3.3.3 Protocolo PCR

Determinar y separar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles. En cada serie de muestras para cada uno de los ensayos a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo. Retirar el aluminio protector de las placas o tiras.

- 1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL del tampón de rehidratación (vial azul) en cada pocillo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de Negative Control (vial morado) en los pocillos reservados para el control negativo.

Añadir 5 µL de la muestra de DNA en los diferentes pocillos.

Añadir 5 µL de *High-Risk Human Papilloma Virus* Positive Control (vial rojo), en los pocillos reservados para el control positivo.

Si el CE se utiliza sólo como control de la inhibición de la PCR, añadir 1 µL del CE (vial verde) a los pocillos en los que se encuentre la muestra/control positivo/control negativo.

Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o golpear suavemente cada tira sobre una superficie dura para asegurarse de que todos los líquidos queden en el fondo de los tubos (para los kits compatible con Qiagen/Corbett Rotor-Gene®).

Colocar las tiras en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.cer-test.es).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Activación de la polimerasa	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla A3. 5. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (VPH 16 y otros VPH AR (VPH 33, 45 y/o 51)), ROX (Control Interno (CI) y otros VPH AR (VPH 31, 39 y/o 56)), HEX, JOE o VIC (VPH 18 y otros VPH AR (VPH 52, 59 y/o 68)) y Cy5 (otros VPH AR (VPH 35, 58 y/o 66)). (Para comprobar los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.cer-test.es). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005PT™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

ANEXO 4

FORMATO TUBO CON CONTROL DE EXTRACCIÓN

Anexo para las siguientes referencias:

PRODUCTO	REFERENCIA
VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit, 4 tubes x 24 reactions	VS-HRP148TE

Tabla A4. 1. Referencias.

A4.1 Procedimiento

VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit contiene en cada tubo de Reaction-Mix todos los componentes necesarios para llevar a cabo 24 reacciones de PCR a tiempo real (cebadores/sondas específicos, dNTPs, tampón, polimerasa) en formato estabilizado. Este ensayo también se puede utilizar con un Control de Extracción (CE) que puede añadirse en cada muestra durante la etapa de adición del tampón de lisis del proceso de extracción. Este control sirve para monitorizar el proceso de extracción y/o descartar una posible inhibición de la actividad polimerasa.

Diana		Canal	Gen
Control de Extracción (CE)		ROX	-
High-Risk Human Papilloma Virus 1	VPH 16	FAM	L2
	VPH 18	HEX, VIC or JOE *	L1
	Otros VPH AR (VPH 35, 58 y/o 66)	Cy5	E6/E7
High-Risk Human Papilloma Virus 2	Otros VPH AR (VPH 33, 45 y/o 51)	FAM	E7
	Otros VPH AR (VPH 52, 59 y/o 68)	HEX, VIC or JOE *	E7
	Otros VPH AR (VPH 31, 39 y/o 56)	ROX	E6/E7

Tabla A4. 2. Diana, canal y genes. VPH AR = Virus del papiloma humano de alto riesgo.

*seleccionar el canal de detección según el equipo utilizado. Para comprobar la compatibilidad del termociclador, consulte el sitio web www.certest.es.

A4.2 Reactivos suministrados

VIASURE High-Risk Human Papilloma Virus Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en la Tabla A4.3.

Reactivo/Material	Descripción	Color	Cantidad
<i>High-Risk Human Papilloma Virus 1</i> Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	2 viales
<i>High-Risk Human Papilloma Virus 2</i> Reaction-Mix tube	Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs y estabilizadores en formato estabilizado	Blanco	2 viales
Rehydration Buffer	Solución para la reconstitución del producto estabilizado	Azul	1 vial x 1,8 mL
<i>High-Risk Human Papilloma Virus</i> Positive Control	DNA sintético liofilizado no infeccioso	Rojo	1 vial
Extraction Control	Ácido nucleico liofilizado no infeccioso	Verde	1 vial
Negative control	Control negativo	Morado	1 vial x 1 mL
Water RNase/DNase free	Agua libre de RNasa/DNasa	Blanco	1 vial x 1 mL

Tabla A4. 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *High-Risk Human Papilloma Virus* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-HRP148TE.

A4.3 Procedimiento del test

A4.3.1 Control de extracción liofilizado

Se recomienda abrir y manipular el Control de Extracción (CE) en el área pre-PCR del laboratorio, alejada del control positivo liofilizado. Reconstituir el Control de Extracción liofilizado (vial verde) añadiendo 500 µL del Agua libre de RNasa/DNasa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex. Almacenar el Control de Extracción a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: Se debe utilizar en primer lugar el vial de Agua libre de RNasa/DNasa para reconstituir el Control de Extracción liofilizado en el área pre-PCR del laboratorio, y después se debe usar para reconstituir el *High-Risk Human Papilloma Virus* Positive Control liofilizado en un área separada de los demás componentes.

A4.3.2 Control positivo liofilizado

El vial de *High-Risk Human Papilloma Virus* Positive Control contiene una gran cantidad de copias molde, por lo que se recomienda abrirlo y manipularlo en una zona del laboratorio separada del resto de los componentes. Reconstituir *High-Risk Human Papilloma Virus* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 200 µL de Agua libre de RNasa/DNasa (vial blanco) suministrada y mezclar bien con la ayuda del vórtex.

Almacenar el control positivo a -20°C tras su re-suspensión. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

A4.3.3 Mezcla de reacción liofilizada

Determinar el número de reacciones necesarias incluyendo las muestras y los controles (en cada serie de muestras a analizar se deben incluir un control positivo y uno negativo). Determinar el número de viales de Reaction-Mix liofilizados necesarios (24 reacciones cada uno) para realizar el ensayo.

Se recomienda abrirlo y manipularlo en el área de laboratorio de pre-PCR. Abrir el tubo de mezcla de reacción (vial blanco) con cuidado para evitar perturbar el pellet y añadir 390 µL de tampón de rehidratación (vial azul) suministrado. Mezclar suavemente mediante pipeteo arriba y abajo. Centrifugar brevemente para eliminar las burbujas formadas durante la mezcla.

Una vez el vial de Reaction-Mix ha sido resuspendido, guardar la cantidad no empleada en las condiciones de almacenamiento adecuadas a -20°C. Se recomienda separar en alícuotas para minimizar los ciclos de congelación y descongelación.

Nota: El volumen de mezcla de reacción rehidratada es adecuado para llevar a cabo 24 reacciones. La mezcla de reacción rehidratada se puede mantener a 25°C±5°C o 2-8°C hasta 4 horas (ver la sección Condiciones de transporte y almacenamiento para consultar opciones adicionales de almacenamiento).

A4.3.4 Protocolo PCR

- 1) Reconstituir el número de pocillos que sean necesarios.

Añadir 15 µL de *High-Risk Human Papilloma Virus* Reaction-Mix (vial blanco) rehidratado en cada tubo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de Negative Control (vial morado) en los pocillos reservados para el control negativo.

Añadir 5 µL de la muestra de DNA en los diferentes pocillos.

Añadir 5 µL de *High-Risk Human Papilloma Virus* Positive Control (vial rojo), en los pocillos reservados para el control positivo.

Si el CE se utiliza sólo como control de la inhibición de la PCR, añadir 1 µL del CE (vial verde) a los pocillos en los que se encuentre la muestra.

Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente.

Colocar la placa, las tiras o tubos en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (Comprobar la compatibilidad del termociclador en la web de CerTest www.cerTEST.es).

Programar el termociclador siguiendo las condiciones descritas en la siguiente tabla e iniciar el programa:

Ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura
1	Activación de la polimerasa	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	50 seg	60°C

Tabla A4. 4. Protocolo PCR.

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (*) a través de los canales FAM (VPH 16 y otros VPH AR (VPH 33, 45 y/o 51)), ROX (Control Interno (CI) y otros VPH AR (VPH 31, 39 y/o 56)), HEX, JOE o VIC (VPH 18 y otros VPH AR (VPH 52, 59 y/o 68)) y Cy5 (otros VPH AR (VPH 35, 58 y/o 66)). (Para comprobar

los canales de detección más comunes, consulte el sitio web www.certest.es). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada. En el termociclador Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System seleccionar Ramp Speed Standard en el menú Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

Bibliography/Bibliografía

1. Arbyn, M., Tommasino, M., Depuydt, C., & Dillner, J. (2014). Are 20 human papillomavirus types causing cervical cancer? *Journal of Pathology*, 234, 431–435. <https://doi.org/10.1002/path.4424>
2. Burd, E., & Dean, C. (2016). Human papillomavirus. *Microbiology Spectrum*, 4(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.DMIH2-0001-2015>
3. Crosbie, E. J., Einstein, M. H., Franceschi, S., & Kitchener, H. C. (2013). Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*, 382, 889–899. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60022-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60022-7)
4. de Sanjosé, Silvia, Brotons, M., & Pavón, M. A. (2018). The natural history of human papillomavirus infection. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 47, 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2017.08.015>
5. Gibson, J. S. (2014). Nucleic acid-based assays for the detection of high-risk human papillomavirus: A technical review. *Cancer (Cancer Cytopathology)*, 122, 639–645. <https://doi.org/10.1002/cncy.21451>
6. Husain, R. S. A., & Ramakrishnan, V. (2015). Global Variation of Human Papillomavirus Genotypes and Selected Genes Involved in Cervical Malignancies. *Annals of Global Health*, 81(5), 675–683. <https://doi.org/10.1016/j.aogh.2015.08.026>
7. Robadi, I. A., Pharaon, M., & Ducatman, B. S. (2018). The importance of high-risk human papillomavirus types other than 16 and 18 in cervical neoplasia. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 142, 693–695. <https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0563-RA>
8. Sanjosé, S., Díaz, M., Castellsagué, X., Clifford, G., Bruni, L., Muñoz, N., & Bosch, F. (2007). Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 7, 453–459. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17597569>
9. World Health Organization, & IARC. (2007). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans VOLUME 90 Human Papillomaviruses. In *Iarc Monographs On The Evaluation Of Carcinogenic Risks To Humans* (Vol. 90). <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Monographs+on+the+Evaluation+of+Car+cinogenic+Risks+to+Humans+VOLUME+90+Human+Papillomaviruses#0>

Symbols for IVD components and reagents/Símbolos para reactivos y productos para diagnóstico in vitro

	In vitro diagnostic device Producto para diagnóstico in vitro		Keep dry Almacenar en lugar seco		Use by Fecha de caducidad		Manufacturer Fabricante		Batch code Número de lote
	Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso		Temperature limitation Limitación de temperatura		Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test		Unique Device Identification Identificación única de dispositivo		Catalogue number Número de referencia

Trademarks

Modification rights reserved. All rights reserved. © CerTest Biotec, S.L.

All other trademarks that may appear in this package insert are the property of their respective owners.

Control de Cambios / Change Control		
Versión / Version nº	Cambios / Changes	Fecha / Date
00	Versión Original / Original Version	20/07/2021

Table A 5. Tabla de Control de Cambios / Control change table.

Revision: 20th July 2021.

VIASURE



CerTest Biotec, S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)

Tel. (+34) 976 520 354

Fax (+34) 976 106 268

certest@certest.es | viasure@certest.es

www.certest.es

One step ahead



F-566 rev01