

# VIASURE

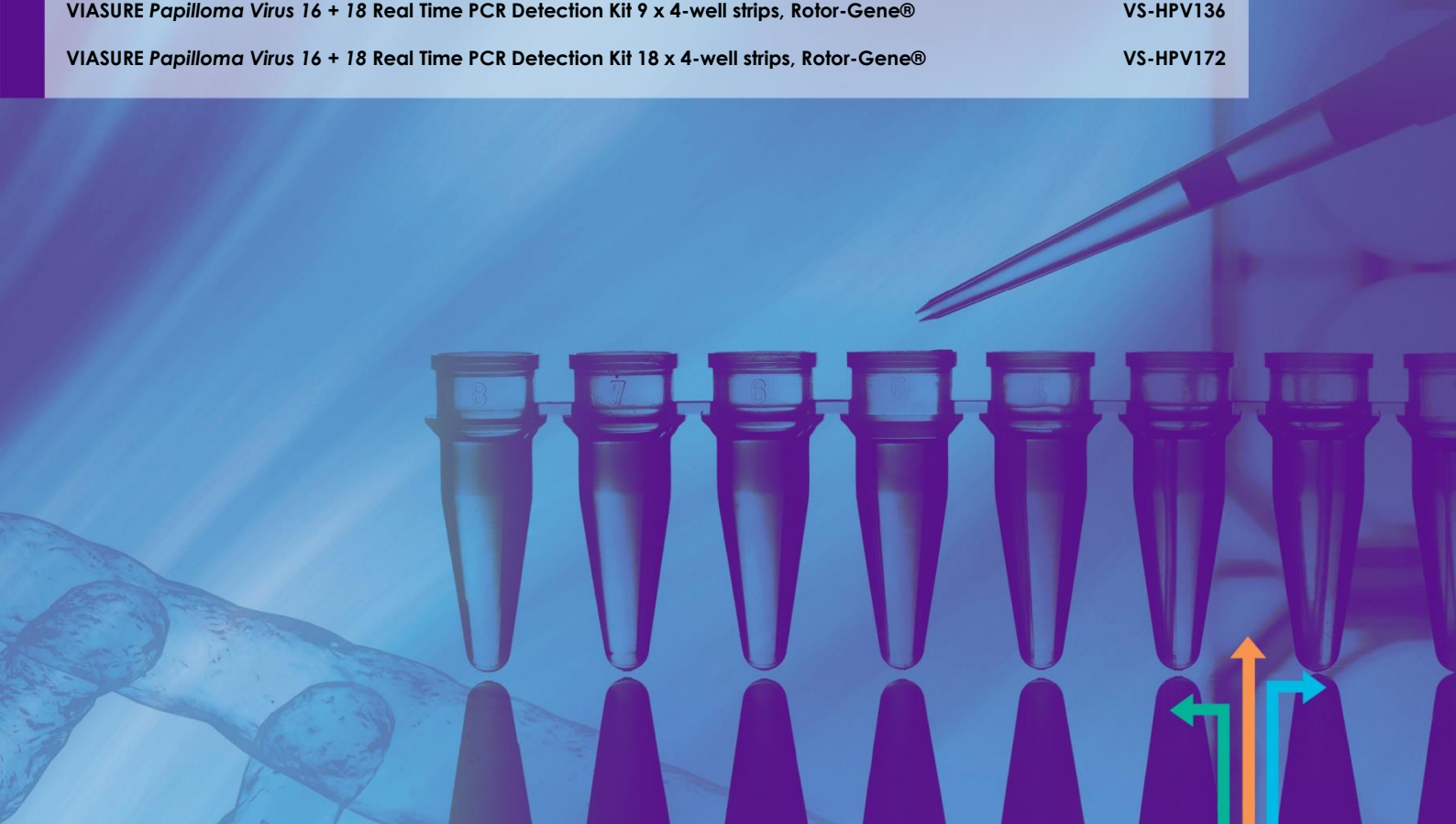
## Real Time PCR Detection Kits

by CerTest  
BIOTEC

### *Papilloma Virus 16 + 18*

Handbook for the following references/  
Manual para las siguientes referencias:

|                                                                                                     |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| VIASURE <i>Papilloma Virus 16 + 18</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, low profile   | VS-HPV106L |
| VIASURE <i>Papilloma Virus 16 + 18</i> Real Time PCR Detection Kit 6 x 8-well strips, high profile  | VS-HPV106H |
| VIASURE <i>Papilloma Virus 16 + 18</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, low profile  | VS-HPV112L |
| VIASURE <i>Papilloma Virus 16 + 18</i> Real Time PCR Detection Kit 12 x 8-well strips, high profile | VS-HPV112H |
| VIASURE <i>Papilloma Virus 16 + 18</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, low profile       | VS-HPV113L |
| VIASURE <i>Papilloma Virus 16 + 18</i> Real Time PCR Detection Kit 96-well plate, high profile      | VS-HPV113H |
| VIASURE <i>Papilloma Virus 16 + 18</i> Real Time PCR Detection Kit 9 x 4-well strips, Rotor-Gene®   | VS-HPV136  |
| VIASURE <i>Papilloma Virus 16 + 18</i> Real Time PCR Detection Kit 18 x 4-well strips, Rotor-Gene®  | VS-HPV172  |



## ENGLISH

### 1. Intended use

VIASURE *Papilloma Virus 16 + 18* Real Time PCR Detection Kit is designed for the specific identification and differentiation of Human papillomavirus 16 and/or Human papillomavirus 18 in clinical specimens from patients with signs and symptoms of Human papillomavirus infection. This test is intended to be used as an aid in the diagnosis of Human papillomavirus 16 and/or Human papillomavirus 18 in combination with clinical and epidemiological risk factors. DNA is extracted from specimens, multiplied using Real Time amplification and detected using fluorescent reporter dye probes specific for Human papillomavirus 16 and Human papillomavirus 18.

### 2. Summary and Explanation

Human papillomavirus (HPV) is the most common viral infection of the reproductive tract. Most sexually active women and men will be infected at some point in their lives and some may be repeatedly infected.

Human papillomaviruses (HPV) are small double stranded DNA viruses classified in the *Papillomaviridae* family. These viruses infect skin or mucosal epithelial cells, therefore, viral DNA can be detected from skin, oral and anogenital samples from all human populations. Currently, over 200 types of HPV have been fully characterized and predominantly assigned into three genera: Alphapapillomavirus, Betapapillomavirus and Gammapapillomavirus. Among the 65 HPV types belonging to Alphapapillomavirus (Alpha-HPV types), a limited set of viruses, the 15 high-risk genotypes, (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 and 82) are considered oncogenic and associated with the development of cervical cancer and its precursor lesions.

HPV is transmitted through intimate skin-to-skin contact, most commonly spread during vaginal, anal, or oral sex with someone who carries the virus. Nearly all men and women get it at some point in their lives due to this virus can be passed even when an infected person has no signs or symptoms. In fact, you can develop symptoms years after being infected, making it hard to know when you first became infected. The majority of HPV infections do not cause symptoms or disease and resolve spontaneously. But when HPV does not go away, it can cause health problems like genital warts, respiratory papillomatosis and cervical, anogenital and oropharyngeal cancer.

Cervical cancer is the fourth most common cancer among women worldwide and is of particular importance in developing countries based on the lack of proper cervical cancer screening programs. In particular, specific types of HPV (16 and 18) are the most frequently may lead to precancerous lesions. Men and women can get cancer of mouth/ throat, and anus/rectum caused by HPV infections. Men can also develop penile cancer. In women, HPV infection might cause cervical, vaginal, and vulvar cancers. Currently, there are vaccines that could prevent infection with the types of HPV that most commonly cause cancer.

A variety of diagnostic methods of differing sensitivity and specificity have been developed to detect HPV in skin, oral and anogenital samples (mostly, cervical scrapings and biopsy material). Since HPV cannot be cultured efficiently and the clinical performance of serological assays is poor, the diagnosis of HPV infection is almost entirely based on molecular tools. Currently, Real Time PCR offers a high sensitivity and can be performed in different types of samples.



### 3. Principle of the procedure

VIASURE *Papilloma Virus 16 + 18* Real Time PCR Detection Kit is designed for the diagnosis of Human papillomavirus 16 and Human papillomavirus 18 in clinical samples. After DNA isolation, the identification of Human papillomavirus 16 and/or Human papillomavirus 18 is performed by the amplification of a conserved region of the *L2* gene for Human papillomavirus 16 and *L1* gene for Human papillomavirus 18, using specific primers and a fluorescent-labelled probe.

VIASURE *Papilloma Virus 16 + 18* Real Time PCR Detection Kit is based on the 5' exonuclease activity of DNA polymerase. During DNA amplification, this enzyme cleaves the probe bounded 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 can be measured on Real Time PCR platforms.

VIASURE *Papilloma Virus 16 + 18* Real Time PCR Detection Kit contains in each well all the components necessary for real time PCR assay (specific primers/probes, dNTPS, buffer, polymerase) in a stabilized format, as well as an internal control to monitor PCR inhibition. Human papillomavirus 16 DNA targets are amplified and detected in the FAM channel, Human papillomavirus 18 DNA targets are amplified and detected in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex 2) and the internal control (IC) is amplified and detected in the Cy5 channel.

### 4. Reagents provided

VIASURE *Papilloma Virus 16 + 18* Real Time PCR Detection Kit includes the following materials and reagents detailed in Tables 1, 2 and 3. 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 1 includes materials and reagents to be used with 8-well strips compatible devices (See Annex 1). Table 2 includes materials and reagents to be used with 96-well plate compatible devices (See Annex 1). Table 3 includes materials and reagents for use with Qiagen/Corbett Rotor-Gene® instruments for 4-well strips.

| Reagent/Material                                   | Description                                                                                            | Colour      | Amount              |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|---------------------|
| <i>Papilloma Virus 16 + 18</i><br>8-well strips    | A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format | White       | 6/12 x 8-well strip |
| Rehydration Buffer                                 | Solution to reconstitute the stabilized product                                                        | Blue        | 1 vial x 1.8 mL     |
| <i>Papilloma Virus 16 + 18</i><br>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 | 6/12 X 8-cap strip  |

Table 1. Reagents and materials provided in VIASURE *Papilloma Virus 16 + 18* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-HPV106L, VS-HPV106H, VS-HPV112L and VS-HPV112H.



| Reagent/Material                                   | Description                                                                                            | Color       | Amount           |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|------------------|
| <i>Papilloma Virus 16 + 18</i><br>96-well plate    | A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format | White       | 1 plate          |
| Rehydration Buffer                                 | Solution to reconstitute the stabilized product                                                        | Blue        | 1 vial x 1.8 mL  |
| <i>Papilloma Virus 16 + 18</i><br>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 plate during thermal cycling                                                  | Transparent | 12 X 8-cap strip |

Table 2. Reagents and materials provided in VIASURE *Papilloma Virus 16 + 18* Real Time PCR Detection Kit with Ref VS-HPV113L and VS-HPV113H.

| Reagent/Material                                   | Description                                                                                            | Colour      | Amount              |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|---------------------|
| <i>Papilloma Virus 16 + 18</i><br>4-well strips    | A mix of enzymes, primers probes, buffer, dNTPs, stabilizers and Internal control in stabilized format | Transparent | 9/18 x 4-well strip |
| Rehydration Buffer                                 | Solution to reconstitute the stabilized product                                                        | Blue        | 1 vial x 1.8 mL     |
| <i>Papilloma Virus 16 + 18</i><br>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                                       | Optical caps for sealing wells during thermal cycling                                                  | Transparent | 9/18 X 4-cap strip  |

Table 3. Reagents and materials provided in VIASURE *Papilloma Virus 16 + 18* Real Time PCR Detection Kit with Ref. VS-HPV136 and VS-HPV172. 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).

## 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 *Papilloma Virus 16 + 18* Real Time PCR Detection Kit.

- Real Time PCR instrument (thermocycler).
- DNA extraction kit.
- 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).

VIASURE *Papilloma Virus 16 + 18* Real Time PCR Detection Kit has been validated on the following equipments: Applied Biosystems 7500 Fast 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), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System and VIASURE 96 Real Time PCR System. 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, see Annex 1, to check most common detection channels see Annex 2 and to check optical measurement exposure setting see Annex 3.

## 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. We recommend 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 sunlight.

## 7. Precautions for users

- The product is indented for use by professional users only, such as laboratory or health professionals and technicians, trained in molecular biological techniques.
- Do not use past expiration date.
- 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 (if available, Ref. VS-HPV113L, VS-HPV113H, VS-HPV136 and VS-HPV172). Remove any excess air in the pouches prior to sealing.
- Do not use reagents if the foil has been broken or damaged.
- Do not mix reagents from different envelopes 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-ABR136 and VS-ABR172 (compatible 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.
- 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.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposable gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area. Once you finish the test wash your hands.
- Specimens must be treated as potentially infectious, 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, storage, treatment and disposal of samples.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.



- Consult safety data sheets, upon request.
- Consult each Real Time PCR instrument's reference manual for additional warnings, precautions and procedures.

## 8. Test procedure

### 8.1. 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 specimens you can use your manual or automatic routine optimized system. Also, you can use any commercially available DNA extraction kit and follow the manufacturer's instructions. We have validated the following extraction kits:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recommended.
- QIAamp Viral RNA Mini Kit, using QIAcube instrument (Qiagen).
- Invisorb® Spin Universal Kit (Strattec).
- NucleoMag® Pathogen (Macherey Nagel).
- NucleoSpin RNA Virus (Macherey Nagel).
- MagDEA Dx SV kit, using the magLEAD® 6gC instrument (Precision System Science Co.).
- NX-48 Urine/Swab DNA Kit using the Nextractor® NX-48 system, (Genolution).
- ZP02004 MagPurix Tissue DNA Extraction Kit, using the MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.).
- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, using the Maxwell® 16 instrument (Promega).

### 8.2. Lyophilized positive control

*Papilloma Virus 16 + 18* 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 *Papilloma Virus 16 + 18* Positive Control (red vial) by adding 100 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. We recommend to separate it in aliquots to minimize freeze and thaw cycles.

### 8.3. 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 plates or 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 extracted from each sample, reconstituted *Papilloma Virus 16 + 18* 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 96-well plate, 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® kits).

Load the plate or the strips in the thermocycler.

3) Set up the thermocycler (to check compatibility see Annex 1).

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

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

Table 4. PCR protocol

Fluorogenic data should be collected during the extension step (\*) through the FAM (Human papillomavirus 16), Cy5 (IC) and HEX, JOE or VIC channels (Human papillomavirus 18). Depending on the equipment used select the proper detection channel (see Annex 2). In the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System and Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that the passive reference option for 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.

## 9. Result interpretation

The use of positive and negative controls in each run, validate the reaction by checking the absence of signal in the negative control well and the presence of signal for *Papilloma Virus 16 + 18* in the positive control well. Check Internal Control signal to verify the correct functioning of the amplification mix. The analysis of the samples is done by the software of the used real time PCR equipment itself according to manufacturer's instructions.

Using the following table read and analyze the results:



| Human papillomavirus 16 (FAM) | Human papillomavirus 18 (HEX) | Internal control (Cy5) | Negative Control | Positive Control | Interpretation                                                     |
|-------------------------------|-------------------------------|------------------------|------------------|------------------|--------------------------------------------------------------------|
| +                             | +                             | +/-                    | -                | +                | Human papillomavirus 16 and Human papillomavirus 18 Positives      |
| -                             | -                             | +                      | -                | +                | Human papillomavirus 16 and Human papillomavirus 18 Negatives      |
| +                             | -                             | +/-                    | -                | +                | Human papillomavirus 16 Positive, Human papillomavirus 18 Negative |
| -                             | +                             | +/-                    | -                | +                | Human papillomavirus 18 Positive, Human papillomavirus 16 Negative |
| -                             | -                             | -                      | -                | +                | Experiment fail                                                    |
| +                             | +                             | +                      | +                | -                | Experiment fail                                                    |

Table 5. Sample interpretation

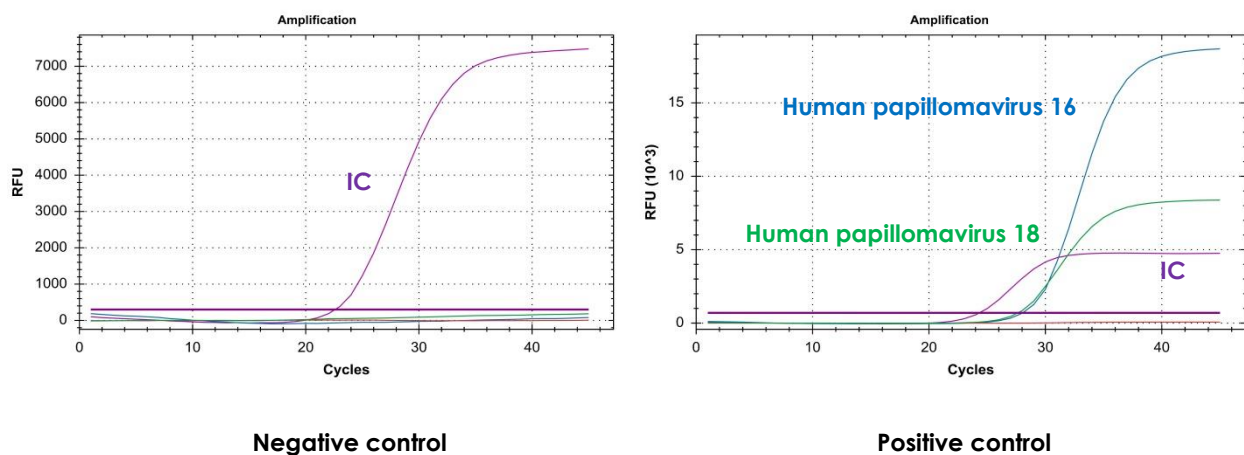
+: Amplification curve

-: No amplification curve

A sample is considered positive if the Ct value obtained is less than 40 and the internal control shows or not an amplification signal. Sometimes, the detection of internal control is not necessary because a high copy number of target can cause preferential amplification of target-specific nucleic acids

A sample is considered negative, if the sample shows no amplification signal in the detection system but the internal control is positive. An inhibition of the PCR reaction can be excluded by the amplification of internal control.

Figure 1. Correct run of negative and positive control run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.



The result is considered invalid if there is signal of amplification in negative control or absence of signal in the positive well. We recommend to repeat the assay again.



In case of absence of internal control signal in sample wells we recommend to repeat the assay diluting the sample 1:10 or to repeat the extraction to check for possible problems of inhibition.

In case of a doubtful interpretation result, it is recommended to verify the correct performance of each of the steps and review the parameters and the sigmoid shape of the curve. If the situation is not solved, it is recommended to repeat the assay, preferably in duplicate. 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.

## 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 samples in transport medium (i.e. PreservCyt transport medium), liquid based cytology (cervical cells which are collected and then are suspended in a preservative media) and endocervical/vaginal swabs.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper extracted nucleic acid from clinical samples must be extracted. Unsuitable collection, storage and/or transport of specimens may give false negative results.
- 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 Human papillomavirus 16 and Human papillomavirus 18, either by samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

## 11. Quality control

VIASURE *Papilloma Virus 16 + 18* 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) in each well confirms the correct performance of the technique.

## 12. Performance characteristics

### 12.1. Clinical sensitivity and specificity

The clinical performance of VIASURE *Papilloma Virus 16 + 18* Real Time PCR Detection Kit was tested using 94 clinical specimens (liquid based cytology and endocervical/vaginal swabs) from symptomatic patients. These results were compared with those obtained with a molecular detection method ("CLART@HPV4" Genotyping of human Papillomavirus via genomic identification for *in vitro* diagnosis (Genomica) or "Anyplex™ II HPV28 Detection" using DPO™ technology and melting curve analysis method of TOCE™ technology" (Seegene)).

The results were as follows:



| VIASURE <i>Papilloma Virus 16 + 18</i><br>Real Time PCR Detection Kit | “CLART®HPV4” (Genomica) +<br>“Anyplex™ II HPV28 Detection” (Seegene) |    |    |       |
|-----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----|----|-------|
|                                                                       |                                                                      | +  | -  | Total |
|                                                                       | +                                                                    | 43 | 0  | 43    |
|                                                                       | -                                                                    | 1* | 50 | 51    |
|                                                                       | Total                                                                | 44 | 50 | 94    |

Table 6. Comparative results for Papilloma Virus 16.

\*The low amount of template DNA in this sample is below the detection limit of the method used.

| VIASURE Papilloma Virus 16 + 18<br>Real Time PCR Detection Kit | “CLART®HPV4” (Genomica) +<br>“Anyplex™ II HPV28 Detection” (Seegene) |   |    |       |
|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|---|----|-------|
|                                                                |                                                                      | + | -  | Total |
|                                                                | +                                                                    | 5 | 0  | 5     |
|                                                                | -                                                                    | 0 | 89 | 89    |
|                                                                | Total                                                                | 5 | 89 | 94    |

Table 7. Comparative results for Papilloma Virus 18.

In conclusion, the results show a high sensitivity and specificity to detect Human papillomavirus 16 and Human papillomavirus 18 using VIASURE Papilloma Virus 16 + 18 Real Time PCR Detection Kit.

## 12.2. Analytical sensitivity

VIASURE Papilloma Virus 16 + 18 Real Time PCR Detection Kit has a detection limit of  $\geq 10$  DNA copies per reaction for Human papillomavirus 16 and Human papillomavirus 18 (Figure 2 and 3).

Figure 2. Dilution series of Human papillomavirus 16 ( $10^7$ - $10^1$  copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (channel FAM).

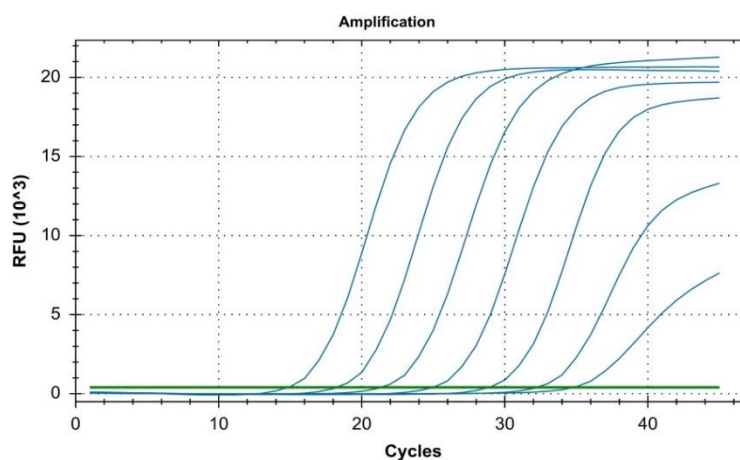
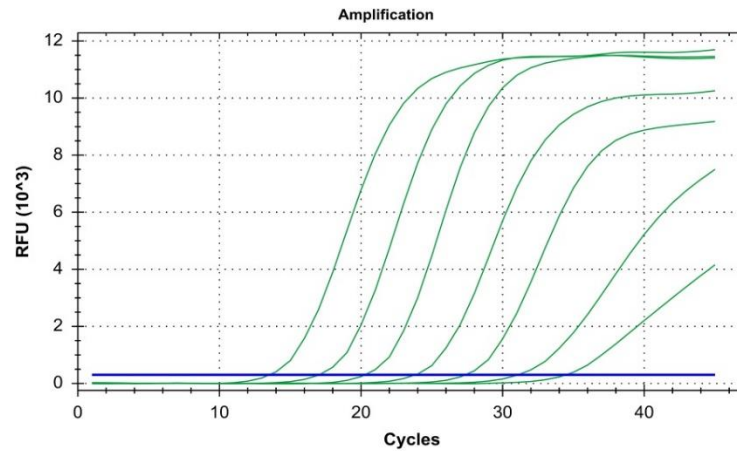


Figure 3. Dilution series of Human papillomavirus 18 ( $10^7$ - $10^1$  copies/rxn) template run on the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (channel HEX).



### 12.3. Analytical specificity

The specificity of the *Papilloma Virus 16 + 18* assay was confirmed by testing panel consisting of different microorganisms representing the most common enteric and genitourinary pathogens or flora present in the gastrointestinal tract or urogenital system. No cross-reactivity was detected between any of the following microorganisms tested.



| Cross-reactivity testing               |   |                                                   |     |                         |     |
|----------------------------------------|---|---------------------------------------------------|-----|-------------------------|-----|
| <i>Candida parapsilosis</i>            | - | <i>Listeria monocytogenes</i>                     | -   | Human papillomavirus 18 | -/+ |
| <i>Candida tropicalis</i>              | - | <i>Listeria innocua</i>                           | -   | Human papillomavirus 6  | -   |
| <i>Candida glabrata</i>                | - | <i>Mycoplasma genitalium</i>                      | -   | Human papillomavirus 11 | -   |
| <i>Candida krusei</i>                  | - | <i>Mycoplasma hominis</i>                         | -   | Human papillomavirus 31 | -   |
| <i>Candida dubliniensis</i>            | - | <i>Neisseria gonorrhoeae</i>                      | -   | Human papillomavirus 33 | -   |
| <i>Candida albicans</i>                | - | <i>Neisseria meningitidis</i>                     | -   | Human papillomavirus 39 | -   |
| <i>Aspergillus fumigatus</i>           | - | <i>Proteus mirabilis</i>                          | -   | Human papillomavirus 40 | -   |
| <i>Bacteroides fragilis</i>            | - | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                     | -   | Human papillomavirus 42 | -   |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>         | - | <i>Serratia marcescens</i>                        | -   | Human papillomavirus 44 | -   |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> (LGV)     | - | <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> | -   | Human papillomavirus 45 | -   |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> (SW)      | - | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>               | -   | Human papillomavirus 51 | -   |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> genovar F | - | <i>Streptococcus agalactiae</i>                   | -   | Human papillomavirus 52 | -   |
| <i>Enterobacter cloacae</i>            | - | <i>Streptococcus pneumoniae</i>                   | -   | Human papillomavirus 53 | -   |
| <i>Enterobacter aerogenes</i>          | - | <i>Treponema pallidum</i>                         | -   | Human papillomavirus 54 | -   |
| <i>Enterococcus faecalis</i>           | - | <i>Trichomonas vaginalis</i>                      | -   | Human papillomavirus 56 | -   |
| <i>Enterococcus faecium</i>            | - | <i>Ureaplasma parvum</i>                          | -   | Human papillomavirus 58 | -   |
| <i>E. coli</i> 0.1285;O18:H7:K1        | - | <i>Ureaplasma urealyticum</i>                     | -   | Human papillomavirus 59 | -   |
| <i>Gardnerella vaginalis</i>           | - | Cytomegalovirus AD-169                            | -   | Human papillomavirus 61 | -   |
| <i>Haemophilus influenza</i> MinnA     | - | Hepatitis A                                       | -   | Human papillomavirus 66 | -   |
| <i>Haemophilus ducreyi</i> class 1     | - | Herpes simplex virus 1                            | -   | Human papillomavirus 68 | -   |
| <i>Klebsiella oxytoca</i>              | - | Herpes simplex virus 2                            | -   | Human papillomavirus 70 | -   |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>           | - | Human papillomavirus 16                           | -/+ | Human papillomavirus 73 | -   |
| <i>Listeria ivanovii</i>               | - |                                                   |     |                         |     |

Table 8. Sexual transmitted pathogens and microbial flora used in this study.

#### 12.4. Analytical reactivity

The reactivity of VIASURE *Papilloma Virus 16 + 18* Real Time PCR Detection Kit for Human papillomavirus 16 was evaluated against Human papillomavirus 16 showing positive result.

The reactivity of VIASURE *Papilloma Virus 16 + 18* Real Time PCR Detection Kit for Human papillomavirus 18 was evaluated against Human papillomavirus 18 showing positive result.



## ANNEX 1

## COMPATIBILITY WITH THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

Low profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with a low profile block, like the systems listed in table A.1. High profile strips can be used in all PCR thermocyclers equipped with a high or regular profile block, like the systems listed in table A.2. If you do not find your thermocycler in the list below, please contact with your supplier.

| Table A.1 LOW PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS |                                                             |
|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Manufacturer                              | Model                                                       |
| Agilent Technologies                      | AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System                          |
| Applied Biosystems                        | 7500 Fast Real-Time PCR System <sup>(1)</sup>               |
| Applied Biosystems                        | 7500 Fast Dx Real-Time PCR System <sup>(1)</sup>            |
| Applied Biosystems                        | QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast                          |
| Applied Biosystems                        | QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast                            |
| Applied Biosystems                        | QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast                            |
| Applied Biosystems                        | QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System <sup>(5)</sup>     |
| Applied Biosystems                        | QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System                    |
| Applied Biosystems                        | StepOne Plus™ Real-Time PCR System <sup>(5)</sup>           |
| Applied Biosystems                        | StepOne™ Real-Time PCR System <sup>(5)</sup>                |
| Applied Biosystems                        | ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System                           |
| BIONEER                                   | Exicycler™ 96                                               |
| Bio-Rad                                   | CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System          |
| Bio-Rad                                   | Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System <sup>(6)</sup> |
| Cepheid                                   | SmartCycler® <sup>(3)</sup>                                 |
| Qiagen                                    | Rotor-Gene® Q <sup>(3)</sup>                                |
| Roche                                     | LightCycler® 480 Real-Time PCR System <sup>(4)</sup>        |
| Roche                                     | LightCycler® 96 Real-Time PCR System <sup>(4)</sup>         |
| Roche                                     | Cobas z480 Analyzer <sup>(4)</sup>                          |

| Table A.2 HIGH PROFILE BLOCK THERMOCYCLERS |                                                                        |
|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Manufacturer                               | Model                                                                  |
| Abbott                                     | Abbott m2000 RealTime System                                           |
| Applied Biosystems                         | 7300 Real-Time PCR System <sup>(5)</sup>                               |
| Applied Biosystems                         | 7500 Real-Time PCR System                                              |
| Applied Biosystems                         | 7900 HT Real-Time PCR System <sup>(5)</sup>                            |
| Applied Biosystems                         | ABI PRISM 7000 <sup>(6)</sup>                                          |
| Applied Biosystems                         | ABI PRISM 7700 <sup>(5)</sup>                                          |
| Applied Biosystems                         | QuantStudio™ 12K Flex 96-well                                          |
| Applied Biosystems                         | QuantStudio™ 6 Flex 96-well                                            |
| Applied Biosystems                         | QuantStudio™ 7 Flex 96-well                                            |
| Applied Biosystems                         | QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System <sup>(5)</sup>                     |
| Applied Biosystems                         | QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System                                    |
| Applied Biosystems                         | ViiA™ 7 Real-Time PCR System                                           |
| Analytik Jena Biometra                     | TOptical                                                               |
| Analytik Jena Biometra                     | qTOWER 2.0                                                             |
| BIONEER                                    | Exicycler™ 96                                                          |
| Bio-Rad                                    | CFX96™ Deep Well / CFX96™ Deep Well IVD Real-Time PCR Detection System |
| Bio-Rad                                    | iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System                             |
| Bio-Rad                                    | iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System                            |
| Bio-Rad                                    | MyiQ™ Real-Time PCR Detection System <sup>(6)</sup>                    |
| Bio-Rad                                    | MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System <sup>(6)</sup>                   |
| Cepheid                                    | SmartCycler® <sup>(3)</sup>                                            |
| DNA-Technology                             | DTprime Real-time Detection Thermal Cycler <sup>(2)</sup>              |
| DNA-Technology                             | DTlite Real-Time PCR System <sup>(2)</sup>                             |
| Eppendorf                                  | Mastercycler™ep realplex                                               |
| Qiagen                                     | Rotor-Gene® Q <sup>(3)</sup>                                           |
| Stratagene / Agilent Technologies          | Mx3000P™ Real Time PCR System                                          |
| Stratagene / Agilent Technologies          | Mx3005P™ Real Time PCR System                                          |
| VIASURE                                    | VIASURE 48 Real Time PCR System <sup>(2)</sup>                         |
| VIASURE                                    | VIASURE 96 Real Time PCR System <sup>(2)</sup>                         |

(1) Select Ramp Speed "Standard".

(2) See Annex 3 to check optical measurement exposure setting.

(3) The product should be reconstituted following the appropriate procedure (see Test Procedure) and transferred into the specific Rotor-Gene® Q or SmartCycler® tubes.

(4) Shell Frame grid plate which fits in these Roche qPCR System is necessary.

(5) No detection in Cy5 channel.

(6) Detection in FAM and HEX channels only.

Table A1/A2. Compatible low and high profile Real Time PCR systems.



## ANNEX 2

## DETECTION CHANNELS FOR THE MOST COMMON REAL TIME PCR EQUIPMENT

The fluorescence detection channels for some of most common Real Time PCR Thermocyclers are specified in Table A3.

| REAL-TIME PCR THERMOCYCLER    | VIASURE CHANNEL | DETECTION CHANNEL | OBSERVATIONS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-------------------------------|-----------------|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Bio-Rad CFX96™                | FAM             | FAM               | Some wells may have abnormally drifting RFU values during the initial few cycles of a run showing a non-sigmoidal ascendant line. If you see this effect, in the Settings menu, select the option Apply Fluorescence Drift Correction for Baseline Settings to correct it.                                                                                      |
|                               | HEX             | HEX               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                               | ROX             | ROX               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                               | Cy5             | Cy5               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| ABI 7500 Applied Biosystems   | FAM             | FAM               | Passive reference option for ROX must be none. Some wells may have abnormally drifting RFU values during the initial few cycles of a run showing a non-sigmoidal ascendant line. If you see this effect, please modify the baseline: Select the Start Cycle and End Cycle values so that the baseline ends before significant fluorescence is detected.         |
|                               | HEX             | VIC               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                               | ROX             | ROX               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                               | Cy5             | Cy5               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Roche Lightcycler®480II       | FAM             | 465/510           | Colour Compensation is required                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                               | HEX             | 533/580           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                               | ROX             | 533/610           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                               | Cy5             | 618/660           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Smartcycler® Cepheid          | FAM             | Channel 1         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                               | HEX             | Channel 2         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                               | ROX             | Channel 3         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                               | Cy5             | Channel 4         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Abbott m2000rt                | FAM             | FAM               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                               | HEX             | VIC               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                               | ROX             | ROX               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                               | Cy5             | Cy5               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Mx3000P™ Mx 3005P™ Stratagene | FAM             | FAM               | Passive reference option for ROX must be none                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|                               | HEX             | VIC               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                               | ROX             | ROX               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                               | Cy5             | Cy5               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| AriaMx Agilent                | FAM             | FAM               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                               | HEX             | HEX               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                               | ROX             | ROX               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                               | Cy5             | Cy5               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Rotor-Gene®Q Qiagen           | FAM             | Green             | In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range has to be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".                                                                                                   |
|                               | HEX             | Yellow            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                               | ROX             | Orange            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                               | Cy5             | Red               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Mic Real Time PCR Cycler bms  | FAM             | Green             | In the "Run Profile" menu, introduce the correct parameters for "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) and the appropriate thermal profile. In the "Cycling" window, select the "Acquire on" option for all the channels by clicking on them. Use the default "Gain" values for each channel (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10) |
|                               | HEX             | Yellow            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                               | ROX             | Orange            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                               | Cy5             | Red               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Exicycler™ 96 BIONEER         | FAM             | FAM               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                               | HEX             | JOE               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                               | ROX             | ROX               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|                               | Cy5             | Cy5               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

Table A3: Detection fluorescence channels of different Real Time PCR systems.



## ANNEX 3

**OPTICAL MEASUREMENT EXPOSURE SETTING**

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) and VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel -500\*, HEX channel – 1000, ROX channel – 1000 and Cy5 channel - 1000.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) and VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): FAM channel - 500, 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.



## ESPAÑOL

### 1. Uso previsto

VIASURE *Papilloma Virus 16 + 18* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para la identificación y diferenciación específica del Virus del papiloma humano 16 y/o Virus del papiloma humano 18 en muestras clínicas de pacientes con signos y síntomas de infección por el Virus del papiloma humano. El uso previsto del test es facilitar el diagnóstico de infección producida por Virus del papiloma humano 16 y/o Virus del papiloma humano 18 en combinación con factores de riesgos clínicos y epidemiológicos. El DNA es extraído a partir de las muestras, amplificado posteriormente mediante PCR a tiempo real y detectado utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con una molécula fluorescente y otra apantalladora (*quencher*) para detectar Virus del papiloma humano 16 y Virus del papiloma humano 18.

### 2. Introducción y explicación

El virus del papiloma humano (VPH) es la infección viral más común del tracto reproductivo. La mayoría de las mujeres y hombres sexualmente activos se infectarán en algún momento de sus vidas y algunos podrían infectarse repetidamente.

Los virus del papiloma humano (VPH) son pequeños virus de DNA bicatenarios clasificados en la familia *Papillomaviridae*. Estos virus infectan las células epiteliales de la piel o la mucosa, por lo tanto, el DNA viral puede detectarse a partir de muestras de piel, orales y anogenitales de todas las poblaciones humanas.

En la actualidad, se han caracterizado completamente más de 200 tipos de VPH y se han asignado predominantemente en tres géneros: Alpha-papilomavirus, Beta-papilomavirus y Gamma-papilomavirus. Entre los 65 tipos de VPH pertenecientes a Alpha-papilomavirus (tipos Alpha-HPV), un conjunto limitado de virus, los 15 genotipos de alto riesgo (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82), son considerados oncogénicos y están asociados con el desarrollo de cáncer de cuello uterino y sus lesiones precursoras.

El VPH se transmite a través del contacto íntimo piel con piel, diseminándose con mayor frecuencia durante el sexo vaginal, anal u oral con algún portador del virus. Casi todos los hombres y mujeres contraen este virus en algún momento de sus vidas debido a que, el mismo, puede transmitirse incluso cuando una persona infectada no presenta signos o síntomas. De hecho, puede desarrollar síntomas años después de la infección, por lo que es difícil saber cuándo se infectó por primera vez. La mayoría de las infecciones por VPH no causan síntomas o enfermedades y se resuelven espontáneamente. Pero cuando el VPH no desaparece, puede causar problemas de salud como verrugas genitales, papilomatosis respiratoria y cáncer cervical, anogenital y orofaríngeo.

El cáncer de cuello uterino es el cuarto cáncer más común entre las mujeres en todo el mundo y es de particular importancia en los países en desarrollo, debido a la falta de programas adecuados de detección del cáncer de cuello uterino. En particular, los específicamente los tipos de VPH 16 y 18 son los que con mayor frecuencia pueden conducir a lesiones precancerosas. Los hombres y las mujeres pueden desarrollar cáncer de boca / garganta y ano / recto causado por infecciones de VPH. Los hombres también pueden desarrollar cáncer de pene. En las mujeres, la infección por VPH podría causar cáncer cervical, vaginal y vulvar. En la actualidad,



existen vacunas que podrían prevenir la infección con los tipos de VPH que con mayor frecuencia causan cáncer.

Se han desarrollado una variedad de métodos de diagnóstico de diferente sensibilidad y especificidad para detectar el VPH en muestras de piel, orales y anogenitales (principalmente, raspados cervicales y biopsias). Como el VPH no se puede cultivar de manera eficiente y el rendimiento clínico de los análisis serológicos es deficiente, el diagnóstico de la infección por el VPH se basa casi por completo en herramientas moleculares. Actualmente, la PCR en tiempo real ofrece una alta sensibilidad y se puede realizar en diferentes tipos de muestras.

### 3. Procedimiento

VIASURE *Papilloma Virus 16 + 18* Real Time PCR Detection Kit está diseñado para el diagnóstico del Virus del papiloma humano 16 y/o Virus del papiloma humano 18 en muestras clínicas. Tras el aislamiento del DNA, la identificación de Virus del papiloma humano 16 y Virus del papiloma humano 18 se realiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando oligonucleótidos específicos y una sonda marcada con fluorescencia que hibridan en una región conservada del gen *L2* para Virus del papiloma humano 16 y el gen *L1* para Virus del papiloma humano 18.

VIASURE *Papilloma Virus 16 + 18* Real Time PCR Detection Kit aprovecha la actividad 5' exonucleasa 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. Esta fluorescencia se puede monitorizar en equipos de PCR a tiempo real.

VIASURE *Papilloma Virus 16 + 18* 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. Tras la reacción de amplificación Virus del papiloma humano 16 se detecta en el canal FAM, Virus del papiloma humano 18 se detecta en el canal HEX, VIC o JOE (Seleccionar el canal de detección apropiado según el equipo utilizado, ver Anexo 2) y el control interno (CI) se detecta en el canal Cy5.

### 4. Reactivos suministrados

VIASURE *Papilloma Virus 16 + 18* Real Time PCR Detection Kit incluye los siguientes materiales y reactivos detallados en las Tablas 1, 2 y 3. Basado en 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 1 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para tiras de 8 pocillos (Ver Anexo 1). La Tabla 2 incluye materiales y reactivos para usar con dispositivos compatibles para placas de 96 pocillos (Ver Anexo 1). La Tabla 3 incluye materiales y reactivos para usar con los instrumentos Qiagen / Corbett Rotor-Gene® para tiras de 4 pocillos.



| Reactivo/Material                                  | Descripción                                                                                                       | Color        | Cantidad                 |
|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------------------|
| <i>Papilloma Virus 16 + 18</i><br>8-well strips    | Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado | Blanco       | 6/12 tiras de 8 pocillos |
| Rehydration Buffer                                 | Solución para la reconstitución del producto estabilizado                                                         | Azul         | 1 vial x 1.8 mL          |
| <i>Papilloma Virus 16 + 18</i><br>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            |
| Tear-off 8-cap strips                              | Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico                                                 | Transparente | 6/12 tiras de 8 tapones  |

Tabla 1. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Papilloma Virus 16 + 18* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-HPV106L, VS-HPV106H, VS-HPV112L y VS-HPV112H.

| Reactivo/Material                                  | Descripción                                                                                                       | Color        | Cantidad              |
|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-----------------------|
| <i>Papilloma Virus 16 + 18</i><br>96-well plate    | Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado | Blanco       | 1 placa               |
| Rehydration Buffer                                 | Solución para la reconstitución del producto estabilizado                                                         | Azul         | 1 vial x 1.8 mL       |
| <i>Papilloma Virus 16 + 18</i><br>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         |
| Tear-off 8-cap strips                              | Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico                                                 | Transparente | 12 tiras de 8 tapones |

Tabla 2. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Papilloma Virus 16 + 18* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-HPV113L y VS-HPV113H.

| Reactivo/Material                                  | Descripción                                                                                                       | Color        | Cantidad                 |
|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------------------|
| <i>Papilloma Virus 16 + 18</i><br>4-well strips    | Una mezcla de enzimas, cebadores-sondas, tampón, dNTPs, estabilizadores y Control interno en formato estabilizado | Transparente | 9/18 tiras de 4 pocillos |
| Rehydration Buffer                                 | Solución para la reconstitución del producto estabilizado                                                         | Azul         | 1 vial x 1.8 mL          |
| <i>Papilloma Virus 16 + 18</i><br>Positive Control | cDNA 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            |
| 4-cap strips                                       | Tapones ópticos para sellar los pocillos durante el ciclo térmico                                                 | Transparente | 9/18 tiras de 4 tapones  |

Tabla 3. Reactivos y materiales proporcionados en VIASURE *Papilloma Virus 16 + 18* Real Time PCR Detection Kit con Ref. VS-HPV136 y VS-HPV172. 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).



## 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 *Papilloma Virus 16 + 18* Real Time PCR Detection Kit.

- Equipo de PCR a tiempo real (termociclador).
- Kit de extracción de DNA.
- 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®).

VIASURE *Papilloma Virus 16 + 18* Real Time PCR Detection Kit ha sido validado en los siguientes equipos: Applied Biosystems 7500 Fast 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), SmartCycler® (Cepheid), Roche Molecular Diagnostics Cobas z480 Analyzer, VIASURE 48 Real Time PCR System y VIASURE 96 Real Time PCR System. 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 verificar la compatibilidad de los termocicladores, consulte el Anexo 1, para verificar los canales de detección más comunes, consulte el Anexo 2 y para verificar la configuración de la exposición de medición óptica, ver Anexo 3.

## 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.

## 7. Precauciones para el usuario

- El producto está destinado para uso exclusivo de usuarios profesionales, como profesionales o técnicos de laboratorio y sanitarios, entrenados en técnicas de biología molecular.
- No se recomienda usar el kit después de la fecha de caducidad.
- 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 (si está disponible, Ref. VS-HPV113L, VS-HPV113H, VS-HPV136 y VS-HPV172). 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 referencias VS-HPV136 y VS-HPV172 (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.
- 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.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes de uso desechables, gafas y mascarilla. No comer, beber o fumar en el área de trabajo. Una vez terminada la prueba, lavarse las manos.
- Las muestras deben ser tratadas como potencialmente infecciosas, 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.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Consulte las hojas de seguridad, previa solicitud.
- Consulte el manual de cada equipo de PCR a tiempo real para advertencias adicionales, precauciones y procedimientos.

## 8. Procedimiento del test

### 8.1. 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 de muestras clínicas puede utilizar su sistema optimizado de rutina manual o automático. Además, se puede usar 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:

- Viasure RNA-DNA Extraction kit (VIASURE), recomendado.
- QIAamp Viral RNA Mini Kit, utilizando QIAcube instrument (Qiagen).



- Invisorb® Spin Universal Kit (Strattec).
- NucleoMag® Pathogen (Macherey Nagel).
- NucleoSpin RNA Virus (Macherey Nagel).
- MagDEA Dx SV kit, utilizando magLEAD® 6gC instrument (Precision System Science Co.).
- NX-48 Urine/Swab DNA Kit utilizando Nextractor® NX-48 system, (Genolution).
- ZP02004 MagPurix Tissue DNA Extraction Kit, utilizando MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.).
- Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, utilizando Maxwell® 16 instrument (Promega).

## 8.2. Control positivo liofilizado

El vial de *Papilloma Virus 16 + 18* 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 *Papilloma Virus 16 + 18* Positive Control liofilizado (vial rojo) añadiendo 100 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.

## 8.3. 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 Rehydration buffer (vial azul) en cada pocillo.

- 2) Añadir muestras y controles.

Añadir 5 µL de DNA extraído de cada muestra, de *Papilloma Virus 16 + 18* Positive Control reconstituido (vial rojo) o Negative Control (vial morado) en diferentes pocillos y cerrar los pocillos con los tapones suministrados.

Se recomienda centrifugar brevemente las tiras de 8 pocillos o las placas de 96 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 la placa o las tiras en el termociclador.

- 3) Configurar el termociclador (para verificar la compatibilidad, consulte el Anexo 1).

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



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

Tabla 4. Protocolo PCR

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de elongación (\*) a través de los canales FAM (Virus del papiloma humano 16), Cy5 (Control Interno) y HEX, JOE o VIC (Virus del papiloma humano 18). Dependiendo del equipo a utilizar seleccionar el canal de detección adecuado (ver Anexo 2). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast 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.

## 9. Interpretación de resultados

El uso de los controles positivo y negativo junto con cada serie de muestras a analizar, valida la reacción comprobando la ausencia de señal en el pocillo del control negativo y la presencia de una señal en el pocillo de control positivo de *Papilloma Virus 16 + 18*. Comprobar la emisión de la señal del control interno para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación. El análisis de las muestras se realiza con el software propio del equipo de PCR a tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante.

Con ayuda de la siguiente tabla, leer y analizar los resultados:

| Virus del papiloma humano 16 (FAM) | Virus del papiloma humano 18 (HEX) | Control Interno (Cy5) | Control Negativo | Control Positivo | Interpretación                                                               |
|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------|------------------|------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| +                                  | +                                  | +/-                   | -                | +                | Virus del papiloma humano 16 y Virus del papiloma humano 18 Positivos        |
| -                                  | -                                  | +                     | -                | +                | Virus del papiloma humano 16 y Virus del papiloma humano 18 Negativos        |
| +                                  | -                                  | +/-                   | -                | +                | Virus del papiloma humano 16 Positivo, Virus del papiloma humano 18 Negativo |
| -                                  | +                                  | +/-                   | -                | +                | Virus del papiloma humano 18 Positivo, Virus del papiloma humano 16 Negativo |
| -                                  | -                                  | -                     | -                | +                | Inválido                                                                     |
| +                                  | +                                  | +                     | +                | -                | Inválido                                                                     |

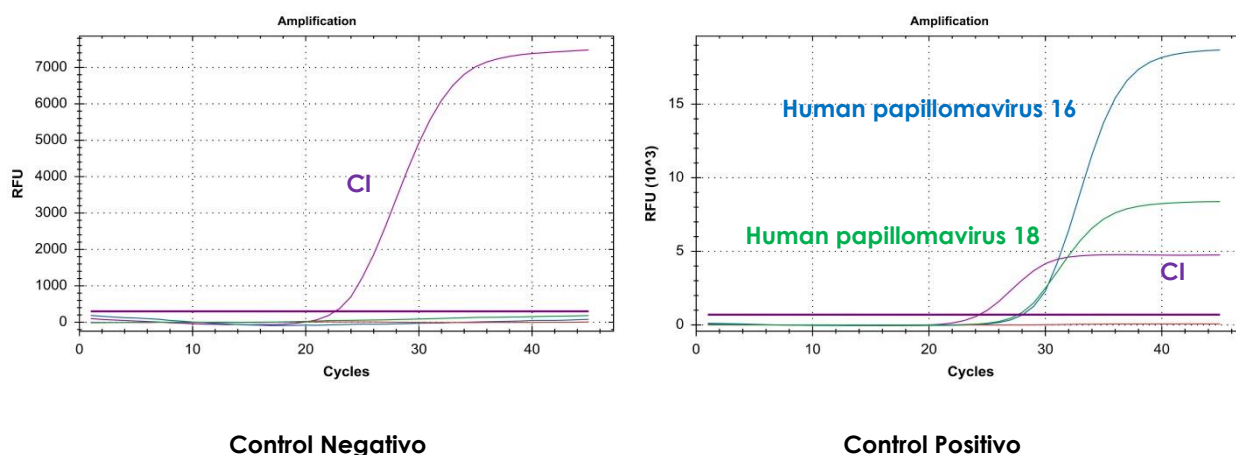
Tabla 5. Interpretación  
 +: curva de amplificación  
 -: sin curva de amplificación



Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no una gráfica de amplificación. 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.

Una muestra se considera negativa, si no se detecta una curva de amplificación por encima del valor umbral, y el control interno si la presenta. La inhibición de la reacción de PCR puede ser excluida por la amplificación del control interno.

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.



El resultado se considera inválido si se observa una gráfica de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el pocillo del control positivo. En ese caso, se recomienda repetir el ensayo.

En caso de ausencia de la señal de control interno en los pocillos de muestra, se recomienda repetir el ensayo diluyendo la muestra 1:10 o repetir la extracción para descartar posibles problemas de inhibición.

En el caso de obtener un resultado de dudosa interpretación, se recomienda verificar la correcta realización de cada uno de los pasos y revisar los parámetros y la forma sigmoidea de la curva. Si la situación no se resuelve, se recomienda repetir el ensayo, preferiblemente por duplicado. 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.

## 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.
- Aunque este ensayo puede usarse con otros tipos de muestras, se ha validado solo con DNA extraído de muestras en medio de transporte (por ejemplo, medio de transporte PreservCyt), citología en base líquida (células cervicales que se recogen y luego se suspenden en un medio conservante) y frotis endocervicales / vaginales.



- 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. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- 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 falsos positivos debido a la contaminación cruzada con Virus del papiloma humano 16 y Virus del papiloma humano 18 ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

## 11. Control de calidad

VIASURE *Papilloma Virus 16 + 18* 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) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

## 12. Características del test

### 12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

El test VIASURE *Papilloma Virus 16 + 18* Real Time PCR Detection Kit fue evaluado utilizando 94 muestras clínicas (citología líquida y frotis endocervicales/vaginales) de pacientes sintomáticos. Estos resultados se compararon con los obtenidos con un método de detección molecular ("CLART®HPV4" Genotipado de papilomavirus humano mediante identificación genómica para diagnóstico *in vitro* (Genómica) ó "Anyplex™ II HPV28 Detection" utilizando la tecnología DPO™ y el método de análisis de curva de *melting* de la tecnología TOCE™ (Seegene)).

Los resultados fueron los siguientes:

| VIASURE <i>Papilloma Virus 16 + 18</i><br>Real Time PCR Detection Kit | "CLART®HPV4" (Genómica) +<br>"Anyplex™ II HPV28 Detection" (Seegene) |    |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----|----|
|                                                                       |                                                                      | +  | -  |
|                                                                       | +                                                                    | 43 | 0  |
|                                                                       | -                                                                    | 1  | 50 |
|                                                                       | Total                                                                | 44 | 50 |

Tabla 6. Comparativa de resultados para Papilloma Virus 16.

\* La baja cantidad de DNA molde detectado en esta muestra está por debajo del límite de detección del método utilizado.



| VIASURE Papilloma Virus 16 + 18<br>Real Time PCR Detection Kit | “CLART®HPV4” (Genomica) +<br>“Anyplex™ II HPV28 Detection” (Seegene) |   |    |       |
|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|---|----|-------|
|                                                                |                                                                      | + | -  | Total |
|                                                                | +                                                                    | 5 | 0  | 5     |
|                                                                | -                                                                    | 0 | 89 | 89    |
|                                                                | Total                                                                | 5 | 89 | 94    |

Tabla 7. Comparativa de resultados para Papilloma Virus 18.

Los resultados muestran una alta sensibilidad y especificidad para detectar Virus del papiloma humano 16 y Virus del papiloma humano 18, utilizando VIASURE Papilloma Virus 16 + 18 Real Time PCR Detection Kit.

## 12.2. Sensibilidad analítica

VIASURE Papilloma Virus 16 + 18 Real Time PCR Detection Kit tiene un límite de detección de  $\geq 10$  copias de DNA por reacción para Virus del papiloma humano 16 y Virus del papiloma humano 18. (Figura 2 y 3).

Figura 2. Diluciones seriadas de un estándar Virus del papiloma humano 16 ( $10^7$ - $10^1$  copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal FAM).

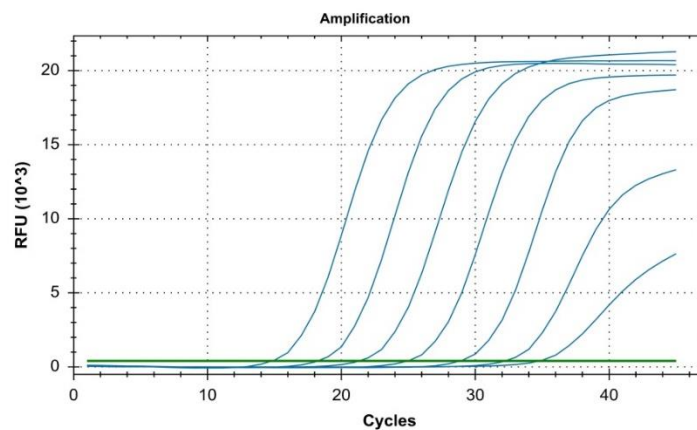
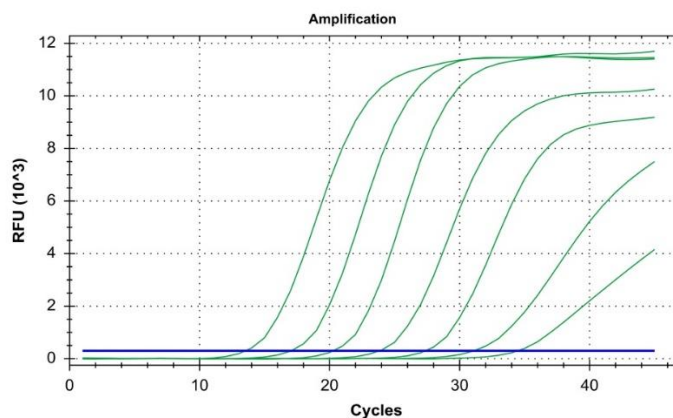


Figura 3. Diluciones seriadas de un estándar Virus del papiloma humano 18 ( $10^7$ - $10^1$  copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal ROX).



### 12.3. Especificidad analítica

La especificidad del ensayo de *Papilloma Virus 16 + 18* fue confirmada probando un panel compuesto patógenos entéricos y genitourinarios más comunes presentes en el tracto gastrointestinal o en el sistema urogenital. No se detectaron reacciones cruzadas con ninguno de los siguientes microorganismos testados.

| Prueba de reacción cruzada             |   |                                                   |     |                         |     |
|----------------------------------------|---|---------------------------------------------------|-----|-------------------------|-----|
| <i>Candida parapsilosis</i>            | - | <i>Listeria monocytogenes</i>                     | -   | Human papillomavirus 18 | -/+ |
| <i>Candida tropicalis</i>              | - | <i>Listeria innocua</i>                           | -   | Human papillomavirus 6  | -   |
| <i>Candida glabrata</i>                | - | <i>Mycoplasma genitalium</i>                      | -   | Human papillomavirus 11 | -   |
| <i>Candida krusei</i>                  | - | <i>Mycoplasma hominis</i>                         | -   | Human papillomavirus 31 | -   |
| <i>Candida dubliniensis</i>            | - | <i>Neisseria gonorrhoeae</i>                      | -   | Human papillomavirus 33 | -   |
| <i>Candida albicans</i>                | - | <i>Neisseria meningitidis</i>                     | -   | Human papillomavirus 39 | -   |
| <i>Aspergillus fumigatus</i>           | - | <i>Proteus mirabilis</i>                          | -   | Human papillomavirus 40 | -   |
| <i>Bacteroides fragilis</i>            | - | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                     | -   | Human papillomavirus 42 | -   |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>         | - | <i>Serratia marcescens</i>                        | -   | Human papillomavirus 44 | -   |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> (LGV)     | - | <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> | -   | Human papillomavirus 45 | -   |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> (SW)      | - | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>               | -   | Human papillomavirus 51 | -   |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> genovar F | - | <i>Streptococcus agalactiae</i>                   | -   | Human papillomavirus 52 | -   |
| <i>Enterobacter cloacae</i>            | - | <i>Streptococcus pneumoniae</i>                   | -   | Human papillomavirus 53 | -   |
| <i>Enterobacter aerogenes</i>          | - | <i>Treponema pallidum</i>                         | -   | Human papillomavirus 54 | -   |
| <i>Enterococcus faecalis</i>           | - | <i>Trichomonas vaginalis</i>                      | -   | Human papillomavirus 56 | -   |
| <i>Enterococcus faecium</i>            | - | <i>Ureaplasma parvum</i>                          | -   | Human papillomavirus 58 | -   |
| <i>E. coli</i> 0.1285;O18:H7:K1        | - | <i>Ureaplasma urealyticum</i>                     | -   | Human papillomavirus 59 | -   |
| <i>Gardnerella vaginalis</i>           | - | Cytomegalovirus AD-169                            | -   | Human papillomavirus 61 | -   |
| <i>Haemophilus influenza</i> MinnA     | - | Hepatitis A                                       | -   | Human papillomavirus 66 | -   |
| <i>Haemophilus ducreyi</i> class 1     | - | Herpes simplex virus 1                            | -   | Human papillomavirus 68 | -   |
| <i>Klebsiella oxytoca</i>              | - | Herpes simplex virus 2                            | -   | Human papillomavirus 70 | -   |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>           | - | Human papillomavirus 16                           | -/+ | Human papillomavirus 73 | -   |
| <i>Listeria ivanovii</i>               | - |                                                   |     |                         |     |

Tabla 8. Patógenos de transmisión sexual y flora bacteriana utilizados en este estudio.

### 12.4. Reactividad analítica

La reactividad de VIASURE *Papilloma Virus 16 + 18* Real Time PCR Detection Kit para Virus del papiloma humano 16 se evaluó frente a Virus del papiloma humano 16, mostrando un resultado positivo.

La reactividad de VIASURE *Papilloma Virus 16 + 18* Real Time PCR Detection Kit para Virus del papiloma humano 18 se evaluó frente a Virus del papiloma humano 18, mostrando un resultado positivo.



### 13. Bibliography/Bibliografía

1. Y. Zhao *et al.* A novel multiplex real-time PCR assay for the detection and quantification of HPV16/18 and HSV1/2 in cervical cancer screening. *Molecular and Cellular Probes* 2012; 66-72.
2. B.Biesaga *et al.* Comparison of the sensitivity and specificity of real-time PCR and *in situ* hybridization in HPV16 and 18 detection in archival cervical cancer specimens. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 2012; 239-247.
3. S. Szostek *et al.* Physical state of human papillomavirus type 16 in cervical intraepithelial lesions and cancers determined by two different quantitative real-time PCR methods. *Acta Biochimica Polonica* 2015; 923-928.
4. Z. Chen *et al.* Classification and evolution of human papillomavirus genome variants: Alpha-5 (HPV26, 51, 69, 82), Alpha-6 (HPV30, 53, 56, 66), Alpha-11 (HPV34, 73), Alpha-13 (HPV54) and Alpha-3 (HPV61). *Virology* 2018; 86-101.
5. L. Zhang *et al.* Comparison of the performance in detection of HPV infections between the High-risk HPV Genotyping Real Time PCR and the PCR-Reverse Dot Blot assays. *Journal of Medical Virology*. DOI 10.1002/jmv.24931.
6. World Health Organization. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>
7. Centers for Disease Control and Prevention. HPV. <https://www.cdc.gov/hpv/parents/whatishpv.html>.

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

|                                                                                     |                                                                                |                                                                                     |                                                     |                                                                                     |                                                       |                                                                                     |                                        |                                                                                       |                                          |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
|  | <i>In vitro</i> diagnostic device<br>Producto para diagnóstico <i>in vitro</i> |  | Keep dry<br>Almacenar en lugar seco                 |  | Use by<br>Fecha de caducidad                          |  | Manufacturer<br>Fabricante             |  | Batch code<br>Número de lote             |
|  | Consult instructions for use<br>Consultar las instrucciones de uso             |  | Temperature limitation<br>Limitación de temperatura |  | Contains sufficient for <n> test<br>Contiene <n> test |  | Sample diluent<br>Diluyente de muestra |  | Catalogue number<br>Número de referencia |



## ANEXO 1

## COMPATIBILIDAD DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Las tiras de bajo perfil pueden usarse en todos los termocicladores equipados con un bloque de perfil bajo, como los sistemas listados en la tabla A.1. Las tiras de perfil alto pueden usarse en todos los termocicladores PCR equipados con bloque de perfil alto o normal (high profile), como los sistemas listados en la tabla A.2. Si no encuentra su termociclador en la siguiente lista, por favor póngase en contacto con su proveedor.

| Tabla A.1 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE BAJO PERFIL |                                                             |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Fabricante                                          | Modelo                                                      |
| Agilent Technologies                                | AriaMx/AriaDx Real-Time PCR System                          |
| Applied Biosystems                                  | 7500 Fast Real-Time PCR System <sup>(1)</sup>               |
| Applied Biosystems                                  | 7500 Fast Dx Real-Time PCR System <sup>(1)</sup>            |
| Applied Biosystems                                  | QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast                          |
| Applied Biosystems                                  | QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast                            |
| Applied Biosystems                                  | QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast                            |
| Applied Biosystems                                  | QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System <sup>(5)</sup>     |
| Applied Biosystems                                  | QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System                    |
| Applied Biosystems                                  | StepOne Plus™ Real-Time PCR System <sup>(5)</sup>           |
| Applied Biosystems                                  | StepOne™ Real-Time PCR System <sup>(5)</sup>                |
| Applied Biosystems                                  | ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System                           |
| BIONEER                                             | Exicycler™ 96                                               |
| Bio-Rad                                             | CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System          |
| Bio-Rad                                             | Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System <sup>(6)</sup> |
| Cepheid                                             | SmartCycler® <sup>(3)</sup>                                 |
| Qiagen                                              | Rotor-Gene® Q <sup>(3)</sup>                                |
| Roche                                               | LightCycler® 480 Real-Time PCR System <sup>(4)</sup>        |
| Roche                                               | LightCycler® 96 Real-Time PCR System <sup>(4)</sup>         |
| Roche                                               | Cobas z480 Analyzer <sup>(4)</sup>                          |

| Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO |                                                           |
|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Fabricante                                          | Modelo                                                    |
| Abbott                                              | Abbott m2000 RealTime System                              |
| Applied Biosystems                                  | 7300 Real-Time PCR System <sup>(5)</sup>                  |
| Applied Biosystems                                  | 7500 Real-Time PCR System                                 |
| Applied Biosystems                                  | 7900 HT Real-Time PCR System <sup>(5)</sup>               |
| Applied Biosystems                                  | ABI PRISM 7000 <sup>(6)</sup>                             |
| Applied Biosystems                                  | ABI PRISM 7700 <sup>(5)</sup>                             |
| Applied Biosystems                                  | QuantStudio™ 12K Flex 96-well                             |
| Applied Biosystems                                  | QuantStudio™ 6 Flex 96-well                               |
| Applied Biosystems                                  | QuantStudio™ 7 Flex 96-well                               |
| Applied Biosystems                                  | QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System <sup>(5)</sup>        |
| Applied Biosystems                                  | QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System                       |
| Applied Biosystems                                  | ViiA™ 7 Real-Time PCR System                              |
| Analytik Jena Biometra                              | TOptical                                                  |
| Analytik Jena Biometra                              | qTOWER 2.0                                                |
| BIONEER                                             | Exicycler™ 96                                             |
| Bio-Rad                                             | CFX96™ / CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System        |
| Bio-Rad                                             | iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System                |
| Bio-Rad                                             | iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System               |
| Bio-Rad                                             | MyiQ™ Real-Time PCR Detection System <sup>(6)</sup>       |
| Bio-Rad                                             | MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System <sup>(6)</sup>      |
| Cepheid                                             | SmartCycler® <sup>(3)</sup>                               |
| DNA-Technology                                      | DTprime Real-time Detection Thermal Cycler <sup>(2)</sup> |
| DNA-Technology                                      | DTlite Real-Time PCR System <sup>(2)</sup>                |
| Eppendorf                                           | Mastercycler™ep realplex                                  |
| Qiagen                                              | Rotor-Gene® Q <sup>(3)</sup>                              |
| Stratagene / Agilent Technologies                   | Mx3000P™ Real Time PCR System                             |
| Stratagene / Agilent Technologies                   | Mx3005P™ Real Time PCR System                             |
| VIASURE                                             | VIASURE 48 Real Time PCR System <sup>(2)</sup>            |
| VIASURE                                             | VIASURE 96 Real Time PCR System <sup>(2)</sup>            |

(1) Seleccionar Ramp Speed "Standard".

(2) Ver Anexo 3 para la configuración de los valores de exposición.

(3) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test) y transvasar a los tubos específicos Rotor-Gene® Q o SmartCycler®.

(4) Se necesita un soporte especial que ajuste con estos equipos Roche de PCR a tiempo real.

(5) No lectura en canal Cy5.

(6) Lectura solo en canales FAM y HEX.

Tabla A1/A2. Equipos compatibles de PCR a tiempo real más comunes.



## ANEXO 2

## CANALES DE DETECCIÓN DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

Los canales de fluorescencia de algunos de los termocicladores a tiempo real más comunes se especifican en la Tabla A3.

| TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL       | CANAL VIASURE | CANAL DE DETECCIÓN | OBSERVACIONES                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-------------------------------------|---------------|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Bio-Rad CFX96™                      | FAM           | FAM                | Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, en el menú Setting, seleccione la opción Apply Fluorescence Drift Correction dentro de Baseline Settings para corregirlo.                                                                                                                                          |
|                                     | HEX           | HEX                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                     | ROX           | ROX                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                     | Cy5           | Cy5                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| ABI 7500<br>Applied Biosystems      | FAM           | FAM                | Opción del control pasivo ROX desactivada. Algunos pocillos pueden tener una deriva anormal de la fluorescencia durante los ciclos iniciales de la carrera, dando lugar a una línea ascendente no sigmoidea. Si ve este efecto, por favor modifique la línea base (Baseline): Seleccione los valores para Start Cycle y End Cycle de forma que la línea base termine antes de comienzo de la detección de un aumento significativo de la fluorescencia. |
|                                     | HEX           | VIC                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                     | ROX           | ROX                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                     | Cy5           | Cy5                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Roche<br>Lightcycler®480II          | FAM           | 465/510            | Se requiere compensación de color                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|                                     | HEX           | 533/580            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                     | ROX           | 533/610            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                     | Cy5           | 618/660            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Smartcycler®<br>Cepheid             | FAM           | Channel 1          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                     | HEX           | Channel 2          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                     | ROX           | Channel 3          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                     | Cy5           | Channel 4          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Abbott m2000rt                      | FAM           | FAM                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                     | HEX           | VIC                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                     | ROX           | ROX                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                     | Cy5           | Cy5                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Mx3000P™<br>Mx 3005P™<br>Stratagene | FAM           | FAM                | Opción del control pasivo ROX desactivada                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|                                     | HEX           | VIC                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                     | ROX           | ROX                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                     | Cy5           | Cy5                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| AriaMx<br>Agilent                   | FAM           | FAM                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                     | HEX           | HEX                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                     | ROX           | ROX                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                     | Cy5           | Cy5                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Rotor-Gene®Q<br>Qiagen              | FAM           | Green              | Durante la configuración de los canales (Channel Setup), presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".                                                                                                                                        |
|                                     | HEX           | Yellow             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                     | ROX           | Orange             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                     | Cy5           | Red                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Mic Real Time PCR<br>Cycler<br>bms  | FAM           | Green              | En el menú "Run Profile", introduzca los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) y el protocolo térmico apropiado. En la ventana "Cycling", seleccione la opción "Acquire on" para todos los canales haciendo click sobre ellos. Utilice los valores de "Gain" que aparecen por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).                                                    |
|                                     | HEX           | Yellow             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                     | ROX           | Orange             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                     | Cy5           | Red                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Exicycler™ 96<br>BIONEER            | FAM           | FAM                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                     | HEX           | JOE                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                     | ROX           | ROX                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                     | Cy5           | Cy5                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

Tabla A3: Canales de detección de fluorescencia de diferentes equipos de PCR a Tiempo Real



## ANEXO 3

**CONFIGURACIÓN DE LOS VALORES DE EXPOSICIÓN**

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) y VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500\*, canal HEX - 1000, canal ROX - 1000 y canal Cy5 -1000.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) y VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -500, 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.



- CFX™ and IQ5™ are registered trademarks of Bio-Rad Laboratories.
- ABI®, QuantStudio™ and ViiA™ are registered trademarks of Thermo Fisher Scientific Inc.
- LightCycler® is a registered trademark of Roche.
- Mx3000P™, Mx3005™ and AriaMx are registered trademarks of Agilent Technologies.
- Mastercycler™ is a registered trademark of Eppendorf.
- Rotor-Gene®Q is a registered trademark of Qiagen.
- SmartCycler® is a registered trademark of Cepheid.

Revision: April 2019





**CerTest Biotec, S.L.**

Pol. Industrial Río Gállego II · Calle J, Nº1  
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (Spain)  
[www.cerTEST.es](http://www.cerTEST.es)



VIASURE online

F-362 rev01

**VIASURE**



Real Time PCR Detection Kits

**CerTest**  
BIOTEC