

VA Vitassay

Real-Time PCR Kits

Vitassay qPCR High-Risk HPVs

PCR en tiempo real para la detección cualitativa simultánea de 14 virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo en muestras clínicas.

Real-time PCR kit for the simultaneous qualitative detection of 14 high risk Human papillomavirus (HPV) in clinical samples.

CE IVD

ES EN



Uso previsto

Vitassay qPCR High-Risk HPVs permite la detección cualitativa simultánea de DNA genómico específico para 14 virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68), y la identificación de los dos genotipos principales, VPH 16 y VPH 18, en muestras cervicales (en solución de base líquida para citología), procedentes de pacientes con sospecha de infección por VPH de alto riesgo. Este producto está destinado para facilitar el diagnóstico de infecciones causadas por VPH de alto riesgo, así como la identificación de los VPH tipo 16 y 18, junto con los datos clínicos del paciente y los resultados de otras pruebas de laboratorio.

Referencias

Vitassay qPCR High-Risk HPVs 8x8-well strip, low profile	7041063
Vitassay qPCR High-Risk HPVs 8x8-well strip, high profile	7042063

Reactivos suministrados

Para las referencias 7041063 y 7042063:

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S063A/ 7042S063A	High-Risk HPVs 1 strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7041S063B/ 7042S063B	High-Risk HPVs 2 strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C063	High-Risk HPVs Positive Control	rojo	1 vial
7001A	PCR grade water	blanco	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension buffer	verde	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	amarillo	1 vial x 1 mL
7004O	Tapas ópticas	-	8 tiras de 8 tapones

Material y equipamiento necesario, no proporcionado

- Sistema de recolección y transporte.
- Congeladores de laboratorio (-30°C a -10°C y/o ≤ -70°C).
- Kit de extracción de DNA
- Equipo de PCR a tiempo real (ver Adjunto I)
- Centrífuga para tubos de 1,5 mL
- Vórtex
- Micropipetas (1-20 µL, 20-200 µL)
- Puntas con filtro
- Guantes desechables sin polvo

Condiciones de Transporte y conservación

- El transporte y almacenaje de los kits puede realizarse de 2-40°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- El control positivo resuspendido debe ser almacenado a -20°C. Para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación, se recomienda distribuir en alícuotas.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

Resumen

El Virus del Papiloma Humano (VPH) es un virus de DNA de doble cadena que pertenece a la familia *Papovaviridae*. Se han identificado casi 200 VPH, con más de 40 tipos que colonizan el tracto genital. Todos los tipos de infección por VPH se dividen en

dos grupos en función de sus propiedades carcinógenas: de alto riesgo y de bajo riesgo. Los tipos de alto riesgo son el 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 68 y 59. Otros se clasifican como de alto riesgo potencial (que son el 53, 66, 70, 73 y 82). En la actualidad, los genotipos de alto riesgo más virulentos son el VPH16 y el VPH18 y causan alrededor del 70% de todos los cánceres cervicales invasivos del mundo.

Los 200 genotipos del VPH se han agrupado en diferentes géneros (Alfa-, Nu-/Mu-, Beta- y Gamma-papilomavirus) según la estructura del genoma viral y el tropismo hacia los tejidos epiteliales humanos. El género Alfa incluye genotipos que se han descrito como causantes de cáncer, mientras que la infección por los papilomavirus Beta y Gamma es generalmente asintomática, pero los estados de inmunosupresión pueden desencadenar que estos tipos produzcan papilomas cutáneos o aumenten la predisposición al cáncer de piel.

La mayoría de las infecciones anogenitales por VPH se adquieren por contacto sexual, y su adquisición está fuertemente determinada por tener varias parejas sexuales y su respectivo comportamiento sexual.

El VPH ha sido identificado como la causa de aproximadamente el 5% de todos los cánceres del mundo. El VPH es el segundo cáncer más frecuente en las mujeres, siendo muy común en las de alrededor de 20-25 años. La infección por VPH está asociada a prácticamente todos los cánceres de cuello uterino y a una proporción significativa de cánceres anogenitales (vulvar, vaginal, de pene y anal) y orofaríngeos. La infección por VPH también se asocia a otras lesiones de la piel y las mucosas, como las verrugas y los papilomas benignos.

Para prevenir las enfermedades relacionadas con el VPH, se han desarrollado vacunas. La vacunación antes de la exposición al VPH (antes del primer contacto sexual) permite una protección superior al 90%, mientras que la vacunación después de la exposición al VPH sólo protege alrededor del 50-60%; por lo tanto, el momento ideal para conseguir una mayor protección contra dichas enfermedades es una vacunación temprana. Hay algunos estudios donde sugieren que la vacunación de las niñas de 12 años es la mejor solución contra el cáncer de cuello de útero.

En la clasificación de los serotipos del papiloma viral más oncogénicos, en el primer y segundo lugar se encuentran el 16 y el 18, respectivamente, y son responsables del cáncer de cuello uterino, vulva, vagina, pene, ano y orofaringe. En el tercer lugar están los serotipos 6 y 11, que se asocian a un menor riesgo oncológico de la vagina y el pene, pero son los cuartos en el cáncer de vulva y los quintos en el cáncer de ano. Actualmente se utilizan varias vacunas contra los diferentes serotipos del VPH: Una vacuna bivalente que contiene los serotipos 16 y 18, una vacuna tetravalente que contiene los serotipos 16, 18, 6 y 11 y una vacuna 9-valente que contiene 16, 18, 6, 11, 31, 33, 45, 52 y 58.

Principio de la prueba

Vitassay qPCR High-Risk HPVs se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada del gen *L2* (VPH16), *L1* (VPH18), *E6* (VPH 35, 56 y 58) y *E7* (VPH 31, 33, 39, 45, 51, 52, 59, 66 and 68). Tras la extracción de los ácidos nucleicos, la presencia de los patógenos se detecta mediante un aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

El ensayo está basado en la actividad 5' exonucleasa que utiliza dos *primers* y una sonda de hidrólisis fluorogénica para detectar la acumulación de la secuencia diana amplificada durante la reacción de PCR. Cuando la polimerasa comienza a extender los primers, la sonda es hidrolizada mediante su actividad exonucleasa 5'- 3' produciendo la separación espacial del fluoróforo y el *quencher*. El aumento de la señal fluorescente resultante es proporcional a la cantidad de producto amplificado en la muestra y es detectado mediante un equipo de PCR en tiempo real.

Vitassay qPCR High-Risk HPVs, se trata de una prueba lista para usar que contiene en cada pocillo todos los reactivos necesarios en formato estabilizado para llevar a cabo la PCR a tiempo real. Además, un control interno permite la detección de una posible reacción de inhibición. Cada kit incluye dos tipos de tiras y cada una de ellas corresponde a un ensayo diferente. La primera tira contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de VPH16, VPH18 y/o VPH 35, 58 y 66, así como el Control Interno (CI). La segunda tira contiene la mezcla de reacción multiplex para la detección de VPH 31, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 59 y/o 68.

Los canales de detección de las secuencias diana se describen a continuación:

Tira	Diana	Canal detección
High-Risk HPVs 1	VPH 16	FAM
	VPH 35, 58 y/o 66	Cy5
	VPH 18	HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado)
	Control Interno (CI)	ROX

Tira	Diana	Canal detección
High-Risk HPVs 2	VPH 52, 59 y/o 68	HEX, VIC o JOE (según el equipo utilizado)
	VPH 31, 39 y/o 56	ROX
	VPH 33, 45 y/o 51	FAM

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro* (uso por personal de laboratorio clínico cualificado y capacitado).
- No utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de otros kits y/o diferentes lotes.
- No utilizar si el kit tiene signos de haber sido abierto o manipulado.
- No utilizar el kit si el material desecante de los diferentes sobres de aluminio está dañado o no está o si el aluminio protector está roto o dañado.
- No retirar el material desecante de los sobres de aluminio una vez abiertos.
- Se recomienda proteger los tubos de la humedad ya que una exposición prolongada puede afectar al rendimiento del producto.
- Trabajar siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio. Use ropa protectora, guantes desechables, gafas y mascarilla.
- No comer, beber o fumar en la zona de trabajo.
- Es importante seguir un flujo de trabajo en el laboratorio unidireccional: Área de Extracción, Área de Amplificación y Detección. No retornar muestras, equipos ni reactivos a un área anterior. Utilice áreas separadas para la preparación de muestras de pacientes y controles.
- Evite la contaminación con ribonucleasas (RNasa)/ desoxirribonucleasas (DNasa) o microbiológica de los reactivos. Se recomienda el uso de puntas de pipeta estériles desechables resistentes a los aerosoles o de desplazamiento positivo de RNasa/DNasa.
- Un aspecto de la mezcla de reacción en formato estabilizado, que normalmente se encuentra en el fondo del tubo, diferente al habitual (sin forma cónica, no homogénea, de menor/mayor tamaño y/o color diferente al blanquecino) no altera la funcionalidad de la prueba.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar según la legislación nacional sobre residuos sanitarios y la legislación nacional de seguridad. Tome las precauciones necesarias durante la recogida, transporte, almacenamiento, tratamiento y eliminación de muestras.
- Use equipos de protección individual (EPI) y cabina de seguridad biológica para el manejo de muestras potencialmente infecciosas y reactivos según recomendaciones actuales.
- Se recomienda la descontaminación periódica de los equipos usados habitualmente, especialmente micropipetas, y de las superficies de trabajo.
- Asegurarse de utilizar un pocillo para la determinación de VPH 16, 18, 35, 58 y 66, y otro pocillo para la determinación de VPH 31, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 59 and 68. Preste atención para no mezclarlos durante todo el proceso.

Procedimiento

Toma, transporte y conservación de muestras

Para la recogida, la conservación y el transporte de los especímenes deben seguirse las condiciones validadas por el usuario. Vitassay qPCR High-Risk HPVs ha sido testado en muestras cervicales (exocervicales y endocervicales) recogidas con hisopos endocervicales en solución PreseryCyt®, empleando el sistema y los viales ThinPrep® (HOLOGIC®). Otros tipos de muestras deben ser validados por el usuario.

En general, las muestras se deben recoger y etiquetar adecuadamente en contenedores limpios, y ser procesadas a la mayor brevedad posible para garantizar la calidad de la prueba. Se recomienda utilizar muestras frescas para el ensayo. El transporte debe realizarse siempre conforme a la normativa local y nacional para el transporte de muestras biológicas. Las muestras recogidas en solución PreseryCyt® deben transportarse a 15-30°C durante un máximo de 6 semanas. Para un transporte de tiempo prolongado (más de 6 semanas), se recomienda el envío a 2-8°C, o a -20°C o menos si el medio de conservación lo permite. Las muestras pueden conservarse a 2-8°C o pueden congelarse a -20°C o a -80°C si el medio de conservación lo permite. Los ciclos de congelación-descongelación deben ser evitados para prevenir la degradación de la muestra y los ácidos nucleicos.

Las muestras clínicas deben recolectarse, transportarse y almacenarse de acuerdo con pautas de laboratorio adecuadas. Para más información puede consultar las siguientes guías:

- Miller JM, et al. (2018). A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. Clin Infect Dis. Aug 31;67(6):e1-e94.

- García-Lechuz Moya JM, et al. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

Extracción de DNA

Para el aislamiento de los ácidos nucleicos se puede utilizar un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Realizar el pretratamiento de la muestra siguiendo las instrucciones del kit de extracción utilizado. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

MagDEA Dx SV Kit, utilizando el instrumento magLEAD® 12gC (Precision System Science Co.).

MagMAX™ Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit, utilizando el equipo KingFisher™ Flex (Thermo Fisher Scientific).

Maxwell® RSC 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, utilizando el instrumento Maxwell® 16 (Promega).

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del High-Risk HPVs Positive Control (tubo rojo) con 200 µL de agua ultrapura (PCR grade water, tubo blanco). Mezclar hasta conseguir una suspensión homogénea con ayuda del vórtex. Después del primer uso, dispensar en alícuotas para evitar repetidos ciclos de congelación-descongelación y almacenarlo a -20°C.

El control positivo contiene una gran cantidad de copias molde y el riesgo de contaminación es elevado. Por lo tanto, se recomienda abrir y manipular en un área del laboratorio separada de los otros componentes del kit y de las muestras a analizar.

Preparación de la reacción

- Preparar el número de pocillos necesarios incluyendo muestras y controles (un control positivo y uno negativo para cada uno de los ensayos).
- Retirar el sello de aluminio que protege las tiras.
- Pipetear 15 µL de la solución de resuspensión (tubo verde) y añadirlos en cada pocillo.
- Pipetear 5 µL de DNA extraído, Control Negativo (tubo amarillo) o Control positivo (tubo rojo) y añadirlos en los pocillos correspondientes.
- Cerrar los pocillos con los tapones suministrados. Centrifugar brevemente (opcional).
- Colocar las tiras en el equipo de PCR a tiempo real.

Programación del termociclador

Configurar el termociclador siguiendo las siguientes instrucciones:

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

Los datos de fluorescencia se deben recoger durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (VPH 16 y otros (VPH 33, 45 y/o 51)), ROX (Control Interno (CI) y otros (VPH 31, 39 y/o 56)), HEX, JOE o VIC (VPH 18 y otros (VPH 52, 59 y/o 68)), y Cy5 (otros (VPH 35, 58 y/o 66)). En los termocicladores Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System y Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System comprobar que la opción del control pasivo ROX está desactivada (ver Adjunto II).

Análisis e interpretación de resultados

El análisis de los resultados se realiza con el software propio del equipo de PCR en tiempo real de acuerdo con las instrucciones de uso del fabricante. Para verificar el correcto funcionamiento de la mezcla de amplificación compruebe la emisión de señal de control interno (CI).

Antes de analizar el resultado de las muestras clínicas debe validarse el resultado de los controles:

Control positivo

El control positivo utilizado en cada serie debe mostrar una curva de amplificación (Ct ≤40) en los canales FAM, ROX, HEX y Cy5.

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal (Ct \geq 40 o no señal) de FAM, ROX, HEX y Cy5.

El experimento es inválido si hay señal de amplificación en el control negativo o ausencia de señal en el control positivo para cualquier canal. El ensayo se debe de repetir.

El Control Interno (CI) debería mostrar una señal de amplificación (Ct \leq 40) en los pocillos del control positivo y control negativo.

Una vez validado el resultado de los controles, con la ayuda de la siguiente tabla analizar los resultados de las muestras:

High-Risk HPVs 1			High-Risk HPVs 2				Interpretación
VPH 16 (FAM)	VPH 18 (HEX)	Control Interno (ROX)	Otros (VPH 35/58/66) (Cy5)	Otros (VPH 33/45/51) (FAM)	Otros (VPH 52/59/68) (HEX)	Otros (VPH 31/39/56) (ROX)	
+	-	+/- ¹	-	-	-	-	DNA VPH 16 detectado
-	+	+/- ¹	-	-	-	-	DNA VPH 18 detectado
-	-	+/- ¹	Señal de amplificación en uno o más canales: +				Detección DNA de otros VPH AR diferentes de VPH 16 y VPH 18
+	+	+/- ¹	-	-	-	-	DNA VPH 16 y VPH 18 detectados
+	-	+/- ¹	Señal de amplificación en uno o más canales: +				Detección DNA VPH 16 y otros VPH AR
-	+	+/- ¹	Señal de amplificación en uno o más canales: +				Detección DNA VPH 18 y otros VPH AR
+	+	+/- ¹	Señal de amplificación en uno o más canales: +				Detección DNA VPH 16, VPH 18 y otros VPH AR
-	-	+ ²	-	-	-	-	DNA molde diana no Detectado ²
-	-	- ²	-	-	-	-	Test fallido ²

Positivo (+): Señal de amplificación (Ct \leq 40)

Negativo (-): No hay señal de amplificación (Ct \geq 40 o no señal)

¹ 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. El control interno (CI) muestra o no una señal de amplificación (Ct \leq 40 o no señal).

² En el caso de que la detección de las regiones diana de VPH resulte negativa, el CI debe mostrar una señal de amplificación con Ct menor de 35. En el caso de ausencia de señal o valor de Ct \geq 35 del control interno, el resultado se considera "inválido" y se requiere repetir el ensayo. Se recomienda repetir la qPCR diluyendo la muestra de DNA 1:10 y/o 1:100, o repetir la extracción y el ensayo para verificar si hay un posible fallo en el procedimiento de extracción y/o problemas de inhibición.

Si el resultado obtenido resulta confuso o dudoso, es necesario comprobar que se han realizado correctamente todos los pasos, verificar el correcto rendimiento de cada etapa de la qPCR, revisar todos los parámetros, la forma sigmoidea de la curva y la intensidad de fluorescencia.

Los resultados de la prueba deben ser evaluados por un profesional de la salud, juntamente con el historial médico, los síntomas clínicos y/o los resultados obtenidos en otras pruebas de diagnóstico.

Control de Calidad

Con el fin de confirmar el correcto funcionamiento de la técnica de diagnóstico molecular, se incluye un Control Interno (CI) en cada reacción. Además, un control positivo y uno negativo se debe de incluir en cada ensayo para una correcta interpretación de los resultados.

Características técnicas

Sensibilidad y especificidad clínica

En un estudio se analizaron 626 muestras exocervicales y endocervicales recogidas con hisopos endocervicales en solución PreservCyt®, utilizando los viales ThinPrep® para el sistema ThinPrep® (HOLOGIC®), con Vitassay qPCR High-Risk HPVs kit.

La extracción se realizó con MagMAX™ Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit empleando el equipo de extracción automática KingFisher Flex (Thermo Fisher Scientific) y también con el Maxwell® RSC 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit empleando el equipo Maxwell® RSC 16 Instrument (Promega), CFX96™ Real-Time PCR instrument (Bio-Rad), 7500 Fast y 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Los resultados obtenidos con Vitassay qPCR High-Risk HPVs fueron comparados con los obtenidos con otros dos kits, el Cobas® HPV Test (Roche) y el Anyplex™ II HPV HR (Seegene), y se muestran en las siguientes tablas.

Diana	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV
VPH 16	64	562	0	0	1 (0.94 – 1)	1 (0.99 – 1)	1 (0.94 – 1)	1 (0.99 – 1)
VPH 18 y VPH 45	35	591	0	0	1 (0.90 – 1)	1 (0.99 – 1)	1 (0.90 – 1)	1 (0.99 – 1)
Otros VPH alto riesgo	190	435	0	1	0.99 (0.97 – 1)	1 (0.99 – 1)	0.99 (0.97-0.99)	1 (0.99-1)

Cobas® HPV Test (Roche) se utilizó como kit comparador. TP = Verdaderos Positivos, TN = Verdaderos Negativos, FP = Falsos Positivos, FN = Falsos Negativos, SE = Sensibilidad, SP = Especificidad, PPV = Valor Predictivo Positivo, NPV = Valor Predictivo Negativo.

Diana	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV
VPH 16	64	561	0	1	0.98 (0.91 – 1)	1 (0.99 – 1)	0.98 (0.91 – 0.99)	1 (0.99 – 1)
VPH 18	18	608	0	0	1 (0.81 – 1)	1 (0.99 – 1)	1 (0.82-1)	1 (0.99 – 1)
VPH 45	18	608	0	0	1 (0.81 – 1)	1 (0.99 – 1)	1 (0.82-1)	1 (0.99 – 1)
VPH 35	25	598	2	1	0.96 (0.80 – 0.99)	0.99 (0.98 – 1)	0.96 (0.81 – 0.99)	0.99 (0.98 – 0.99)
VPH 58	31	593	2	0	1 (0.88 – 1)	0.99 (0.98 – 1)	1 (0.89 – 1)	0.99 (0.98 – 0.99)
VPH 66	15	609	2	0	1 (0.78 – 1)	0.99 (0.98 – 1)	1 (0.79 – 1)	0.99 (0.98 – 0.99)
VPH 33	20	605	1	0	1 (0.83 – 1)	0.99 (0.99 – 1)	1 (0.83 – 1)	0.99 (0.99 – 1)
VPH 51	18	607	1	0	1 (0.81 – 1)	0.99 (0.99 – 1)	1 (0.82 – 1)	0.99 (0.99 – 1)
VPH 52	26	599	1	0	1 (0.86 – 1)	0.99 (0.99 – 1)	1 (0.87 – 1)	0.99 (0.99 – 1)
VPH 59	25	600	1	0	1 (0.86 – 1)	0.99 (0.99 – 1)	1 (0.86 – 1)	0.99 (0.99-1)
VPH 68	12	612	1	1	0.92 (0.64 – 0.99)	0.99 (0.99 – 1)	0.92 (0.66 – 0.98)	0.99 (0.99 – 1)
VPH 31	35	586	4	1	0.97 (0.85 – 0.99)	0.99 (0.98 – 0.99)	0.97 (0.85 – 0.99)	0.99 (0.98 – 0.99)
VPH 39	21	601	4	0	1 (0.83 – 1)	0.99 (0.98 – 0.99)	1 (0.84 – 1)	0.99 (0.98 – 0.99)
VPH 56	21	600	4	1	0.95 (0.77 – 0.99)	0.99 (0.98 – 0.99)	0.95 (0.78 – 0.99)	0.99 (0.98 – 0.99)

Anyplex™ II HPV HR (Seegene) se utilizó como kit comparador. TP = Verdaderos Positivos, TN = Verdaderos Negativos, FP = Falsos Positivos, FN = Falsos Negativos, SE = Sensibilidad, SP = Especificidad, PPV = Valor Predictivo Positivo, NPV = Valor Predictivo Negativo.

En conclusión, los resultados muestran una alta concordancia para detectar estos patógenos utilizando Vitassay qPCR High-Risk HPVs.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) de estándares de los diferentes patógenos (107-101 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de 10 copias de DNA por reacción para VPH 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 59 y 68; y de 50 copias de DNA por reacción para VPH 16, 18, 58 y 66.

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de papilomavirus de alto riesgo fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes microorganismos, no observándose reacciones cruzadas entre ninguna de las especies:

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

Reactividad analítica

La reactividad de Vitassay qPCR High-Risk HPVs se evaluó frente a DNA sintético y específico, y frente a DNA extraído de muestras clínicas y muestras clínicas simuladas procedentes de paneles EQAs, positivas para VPH de alto riesgo (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68), mostrando resultados positivos.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR High-Risk HPVs ha sido validado en los siguientes equipos:

- Cobas z480 Analyzer (Roche)
- 7500 Fast and 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ¹
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)

¹: En el caso de utilizar el equipo Applied Biosystems 7500 Fast con tiras, se recomienda colocar el soporte adecuado para los tubos (Ref. PN 4388506).

Limitaciones

- Todos los resultados obtenidos deben ser interpretados por un especialista junto con la información clínica y los hallazgos de laboratorio disponibles.
- Este ensayo ha sido validado con DNA extraído de muestras cervicales (exocervicales y endocervicales) recogidas con hisopos endocervicales en solución PreservCyt®, utilizando los viales ThinPrep® para el sistema ThinPrep® (HOLOGIC®). El uso de otras muestras no se ha establecido.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el DNA deber ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas.
- Esta prueba no proporciona valores cuantitativos ni indica el número de organismos presentes. Esta prueba es un ensayo cualitativo.
- Se puede detectar un bajo número de copias del DNA molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de resultados falsos positivos debido a la contaminación cruzada, ya sea por el High-Risk HPVs positive control durante su reconstitución, por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.
- La detección puede verse afectada por varios factores y sus combinaciones que pueden conducir a resultados falsos negativos, que incluyen: a) inadecuado muestreo, envío, almacenamiento y manipulación de las muestras; b) errores de procedimiento (incluido la extracción de DNA); c) Degradación del DNA durante el envío, almacenamiento y/o preparación de muestras; d) la carga de este patógeno esté por debajo del límite de detección del ensayo; e) presencia de inhibidores de la amplificación en tiempo real u otros tipos de interferencia (no se realizó un estudio de interferencia que evaluara el efecto de vacunas, terapias antivirales, antibióticos, cremas antifúngicas, quimioterapéuticos o fármacos inmunosupresores utilizados para prevenir la infección o durante el tratamiento de la misma); f) incumplimiento de las instrucciones y procedimientos sugeridos por el fabricante.
- La detección del DNA viral puede no indicar la presencia de virus viables y/o infecciosos o que el VPH sea el agente causante de los síntomas clínicos.
- Los resultados negativos no impiden la infección por VPH de alto riesgo y no deben ser la única base de una decisión de tratamiento/manejo del paciente. Aún no se han establecido los tipos de muestras óptimos y/o la etapa de infección más adecuados para su recolección. Considere la recolección de múltiples muestras del mismo paciente en diferentes momentos, lo que puede aumentar la probabilidad de detectar el virus.
- Si los datos clínicos del paciente, las pruebas de laboratorio y los estudios epidemiológicos sugieren una posible infección con VPH de alto riesgo, y se han descartado otras enfermedades de transmisión sexual, la posibilidad de un resultado falso negativo no se debería descartar y se deberían realizar pruebas adicionales.
- Los valores de fluorescencia pueden variar debido a múltiples factores como el equipo de PCR, el sistema de extracción, el tipo de muestra y su tratamiento previo, entre otros.
- El análisis bioinformático mostró que los *primers* y sondas seleccionadas son específicos para sus dianas establecidas (VPH tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 59, 56, 58, 66 y 68) y que los *primers* y la sonda que detectan VPH 39 podrían detectar el VPH 68 debido a sus similitudes genéticas.
- El uso previsto de Vitassay qPCR High-Risk HPVs es la detección de VPH de alto riesgo en muestras clínicas, llevándose a cabo dicha detección en grupos de tres genotipos por canal. Además, para VPH 16 y VPH 18 es posible su identificación. Este kit no está indicado para la evaluación de un posible abuso sexual.
- La prevalencia de la infección por VPH en una población puede afectar al procedimiento. Los valores predictivos positivos disminuyen cuando se evalúa una población con prevalencia baja, o a individuos sin riesgo de infección.
- La infección por VPH de alto riesgo no es un indicador definitivo de la presencia de enfermedad de cuello uterino de alto grado, ni tampoco implica que en todos los casos vaya a desarrollarse ni dicha enfermedad, ni cáncer de cuello de útero.
- Vitassay qPCR High-Risk HPVs detecta VPH de alto riesgo, en consecuencia, otros VPH de bajo riesgo no detectados mediante este ensayo pueden estar presentes en la muestra.

Adjunto I. Compatibilidad de los termocicladores a tiempo real más usuales

Los termocicladores más usuales se enumeran en la siguiente tabla orientativa separados por tipo de tubo. Consulte la tabla, pero se recomienda que verifique el equipo y sus especificaciones antes de ejecutar el ensayo. Si no encuentra su termociclador, póngase en contacto con su proveedor:

Termocicladores con bloque de bajo perfil	Termocicladores con bloque de alto perfil
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 ⁽¹⁾
AriaDx Real-Time PCR System	Agilent Technologies
Applied Biosystems	Mx3000P™ Real Time PCR System
7500 Fast Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	Mx3005P™ Real Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	Applied Biosystems
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	7300 Real-Time PCR System ^{(1) (4)}
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	7500 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	7900 HT Real-Time PCR System ⁽³⁾
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	ABI PRISM 7000 ⁽³⁾
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System	ABI PRISM 7700 ⁽³⁾
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
StepOne™ Real-Time PCR System ^{(3) (4)}	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Azure Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Azure Cielo 3 ⁽⁵⁾	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
Azure Cielo 6	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
BIONEER	Analytik Jena
Exicycler™ 96 Fast	qTOWER ⁽⁶⁾
Bio-Rad	BIONEER
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	Exicycler™ 96
CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System	BIOER
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾	QuantGene 9600
CFX Opus 96	Bio-Rad
Roche	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR System
LightCycler®480 Real-Time PCR System ^{(1) (6)}	CFX96™ Deep Well IDV Real-Time PCR System
LightCycler®96 Real-Time PCR System	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Cobas z480 Analyzer ^{(1) (6)}	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
	My iQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
	My iQ™ 2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
Formatos especiales ⁽⁷⁾	DNA-Technology
Bio Molecular Systems	DTlite Real-Time PCR System ⁽⁸⁾
Mic Real Time PCR Cyclor	DTprime Real-time Detection Thermal Cyclor ⁽⁸⁾
Cepheid	Eppendorf
SmartCycler®	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Qiagen	Qiagen
Rotor-Gene® Q	QIAquant 96 ⁽⁶⁾

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

(2) Seleccionar Ramp Speed "Standard" en el menu Select New Experiment/Advanced Setup/Experiment Properties.

(3) No lectura en canal Cy5.

(4) No lectura en canal ROX.

(5) Lectura solo en canales FAM y HEX.

(6) Se requiere compensación de color específica.

(7) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento de la prueba) y transvasar a los tubos específicos Mic, SmartCycler®, o Rotor-Gene® Q.

(8) Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición.

Adjunto II. 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 siguiente tabla:

Termociclador	Canal Vitassay	Canal de Detección	Observaciones
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	Durante los primeros ciclos de un análisis algunos pocillos pueden presentar valores de RFU anormales y mostrar una línea ascendente no sigmoidea. Para corregir este efecto, seleccione la opción Apply Fluorescence Drift Correction en el menú Configuración para la configuración de la línea base.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Applied Biosystems ABI 7500	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada. Durante los primeros ciclos de un análisis algunos pocillos pueden presentar valores de RFU anormales y mostrar una línea ascendente no sigmoidea. Para corregir este efecto, seleccione los valores de ciclo Inicio y ciclo Final para que la línea de base finalice antes de la detección de una fluorescencia significativa.
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Se requiere compensación de color.
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Se requiere compensación de color.
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
Cepheid Smartcycler®	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Agilent Technologies Mx3000P™ Mx3005P™	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Bio Molecular Systems Mic Real Time PCR Cycler	FAM	Green	Introducir los parámetros correctos para "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volumen (20 ul) y el protocolo térmico (Menú "Run Profile"). Seleccionar "Acquire on" para todos los canales (haciendo click sobre ellos en ventana "Cycling"). Utilice los valores del "Gain" por defecto para cada canal (Green = 3, Yellow = 10, Orange = 10, Red = 10).
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Agilent Technologies AriaMx	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene® Q	FAM	Green	Al configurar los canales, presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". El rango de muestra objetivo de fluorescencia 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	
BIONEER Exicycler™ 96	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Adjunto III. Configuración de los valores de exposición

Los valores de exposición de algunos termocicladores se deben ajustar para su correcto funcionamiento. Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

Termociclador	Canal Vitassay	Valor de exposición
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	200
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500*
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500

* En el caso de un resultado no esperado, sin amplificaciones o con un elevado ruido de fondo en el canal FAM, por favor, reduzca los valores de exposición indicados anteriormente hasta 150.



Intended use

Vitassay qPCR High-Risk HPVs allows the simultaneous qualitative detection of genomic DNA specific for 14 high risk Human papillomavirus (HPV types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, and 68) and the two main HPVs identification, HPV 16, and HPV 18, in cervical samples (liquid base solution for cytology) of patients suspected of high-risk HPV infection. This product is intended to aid in the diagnosis of high-risk HPV infections, as well as the HPV types 16 and 18 identification, alongside the patient's clinical data and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR High-Risk HPVs 8x8-well strip, low profile	7041063
Vitassay qPCR High-Risk HPVs 8x8-well strip, high profile	7042063

Reagents provided

In references 7041063 and 7042063:

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S063A/ 7042S063A	High-Risk HPVs 1 strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7041S063B/ 7042S063B	High-Risk HPVs 2 strips low/high profile	-	4 x 8-well strip
7C063	High-Risk HPVs Positive Control	red	1 vial
7001A	PCR grade water	white	1 vial x 1 mL
7002B	Resuspension Buffer	green	1 vial x 1,8 mL
7003N	Negative control	yellow	1 vial x 1 mL
7004O	Optical caps	-	8 x 8-cap strip

Material and equipment required, not provided

- Collection and transport system.
- Laboratory freezers (- 30°C to - 10°C and/or ≤ -70°C).
- DNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 mL tubes
- Vortex
- Micropipettes (1-20 µL, 20-200 µL)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

Transport and storage

- The reagents and the test can be shipped and stored at 2-40°C until expiration date stated on the label.
- The resuspended positive control should be stored at -20°C. To avoid repeated freeze/thaw cycles, it is recommended to distribute the content in different aliquots.
- Keep all reagents in the darkness.

Summary

HPV is a double-stranded DNA virus belonging to the *Papovaviridae* family. Almost 200 HPV have been identified with more than 40 types colonizing the genital tract. All HPV infection types are divided into two groups based on their carcinogenic properties these are high risk and low risk. High-risk types include 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 68 and 59. Others are classified as potential

high-risk (which are 53, 66, 70, 73 and 82). Currently, HPV16 and HPV18 are the most virulent high-risk genotypes, causing about 70 % of all invasive cervical cancer in the world.

The 200 HPV genotypes have been grouped in different genera (Alpha-, Nu-/Mu-, Beta- and Gamma-papillomavirus) according to the viral genome structure and tropism to human epithelial tissues. The Alpha genus includes genotypes that have been described to cause cancer, while Beta- and Gamma-papillomavirus infection courses are generally asymptomatic, but immunosuppression states can trigger these types to produce cutaneous papilloma or increase the predisposition to skin cancer.

The majority of anogenital HPV infections are acquired through sexual contact, and acquisition is strongly determined by the accumulation of sexual partners and their respective sexual behavior.

Human papillomavirus (HPV) has been identified as the cause of approximately 5% of all cancers worldwide. HPV is the second most frequently occurring cancer in women worldwide, being very common in women around 20-25 years of age. HPV infection is associated with virtually all cervical cancers and a significant proportion of anogenital (vulvar, vagina, penile, and anal) and oropharyngeal cancers. HPV infection is also associated with other skin and mucosal lesions such as warts and benign papilloma.

To prevent HPV-related diseases, some vaccines has been developed. The ideal time for the best protection against them is prior to HPV exposure (before first sexual contact), because the protection is more than 90%, while vaccination after HPV exposure only protects about 50-60% infections. Other studies suggested that vaccination of 12-year-old girls provides the best and most cost-effective solution against cervical cancer.

In the classification of most oncogenic viral papilloma serotypes, at the first and second places are 16 and 18, respectively, and responsible for cancer of the cervix, vulva, vagina, penis, anus, and oropharynx. In the third place of frequency are serotypes 6 and 11, which are associated with a minor oncogenic risk of the vagina and penis but are fourth in vulvar cancer and fifth in anus cancer. There are several vaccines in use nowadays against the different HPV serotypes: A bivalent vaccine containing serotypes 16 and 18, a quadrivalent vaccine containing serotypes 16, 18, 6 and 11 and a 9-valent vaccine containing 16, 18, 6, 11, 31, 33, 45, 52 and 58.

Test principle

Vitassay qPCR High-Risk HPVs is based on the real-time amplification of a conserved region of *L2* gene (HPV16), *L1* gene (HPV18), *E6* gene (HPV 35, 56 y 58) and *E7* gene (HPV 31, 33, 39, 45, 51, 52, 59, 66 and 68). After DNA isolation, the pathogens presence is detected by an increase in observed fluorescence during the reaction, after hydrolysis of the fluorescent probe.

The assay is based on 5' exonuclease activity using two primers and a fluorogenic hydrolysis probe to detect accumulation of the amplified target sequence during the PCR reaction. When the polymerase begins to spread the primers, the probe is hydrolyzed by its exonuclease 5'-3' activity causing the spatial separation of the fluorophore and the quencher. The increase in the resulting fluorescent signal is proportional to the amount of amplified product in the sample and is detected by means of real-time PCR equipment.

Vitassay qPCR High-Risk HPVs is a ready-to-use test which contains in each well all the necessary reagents for real-time PCR assay in a stabilized format. In addition, an internal control allows the detection of a possible inhibition reaction. Each kit includes two kind of strips and each one corresponds to one different assay. The first strip contains the multiplex reaction mix for the detection of HPV16, HPV18 and/or HPVs 35, 58 and 66, as well as an Internal Control (IC). The second strip contains the multiplex reaction mix for the detection of HPVs 31, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 59 and/or 68. The detection channels of the target sequences are described below:

Strip	Target	Detection Channel
High-Risk HPVs 1	HPV 16	FAM
	HPV 35, 58 and/or 66	Cy5
	HPV 18	HEX, VIC, or JOE (depending on the equipment used)
	Internal Control (IC)	ROX

Strip	Target	Detection Channel
High-Risk HPVs 2	HPV 52, 59 and/or 68	HEX, VIC, or JOE (depending on the equipment used)
	HPV 31, 39 and/or 56	ROX
	HPV 33, 45 and/or 51	FAM

Precautions

- For professional *in vitro* diagnostic use (use by qualified and trained clinical laboratory personnel).
- Do not use after expiration date.
- Do not mix components from different kits and/or lots.
- Do not use if package is open or damaged.
- Do not use the kit if the desiccant from the different reagents is not present or is broken or if the foil has been broken or damaged.
- Do not remove desiccant from reagent pouches once is open.
- Protect the kit against humidity. Prolonged exposure to humidity may affect product performance.
- Follow Good Laboratory Practices. Wear protective clothing, use disposal gloves, goggles, and mask.
- Do not eat, drink, or smoke in the working area.
- The laboratory process must be one-directional, it should begin in the Extraction Area and then move to the Amplification and Detection Areas. Do not return samples, equipment, and reagents to the area in which the previous step was performed. Use separate areas for the patient samples and controls preparation.
- Avoid microbial and ribonuclease (RNase)/deoxyribonuclease (DNase) contamination of reagents. The use of sterile disposable aerosol resistant pipette tips or RNase/DNase positive displacement pipette tips is recommended.
- An appearance of the reaction mixture in stabilized format, normally found at the tube bottom, different from the usual one (without conical shape, inhomogeneous, smaller/larger in size and/or color different from whitish) does not alter the test functionality.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious and they must be managed according to the national safety legislation and national health waste legislation. Take necessary precautions during the collection, transport, storage, treatment, and disposal of samples.
- Use personal protective equipment (PPE) and biological safety cabinet for handling of potentially infectious samples and reagents according to current recommendations.
- Regular decontamination of commonly used equipment is recommended, especially micropipettes and work surfaces.
- Make sure to use a well for determining HPV 16, 18, 35, 58, and 66, and another well for determining HPVs 31, 33, 39, 45, 51, 52, 56, 59 and 68. Be careful not to mix them throughout the process.

Procedures

Specimen collection, transport, and conservation

Specimen collection, conservation, and transport should be maintained per the conditions validated by the user. The Vitassay qPCR High-Risk HSVs has been tested on cervical (exocervical and endocervical) samples collected with endocervical swabs resuspended in PreservCyt® solution using ThinPrep® (HOLOGIC®) vials and system. Other types of samples must be validated by the user.

Overall, samples should be collected and labelled appropriately in clean containers and be processed as soon as possible to guarantee the test quality. It is recommended to use fresh specimens for the test. Transport must always be carried out in accordance with local and national regulations for the transport of biological samples. The specimens collected in PreservCyt® solution should be transported at 15-30°C for up to 6 weeks. For long term transport (more than 6 weeks), we recommend shipping at 2-8°C, or at -20°C or lower if preservation medium permits. The samples can be stored at 2°C to 8°C or frozen at -20°C or at -80°C if preservation medium permits. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided to prevent sample and nucleic acids degradation.

The clinical specimens must be collected, transported, and stored according to appropriate laboratory guidelines. For more information, refer to the following guidelines:

- Miller JM, et al. (2018). A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. Clin Infect Dis. Aug 31;67(6):e1-e94.
- García-Lechuz Moya JM, et al. (2017). Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

DNA extraction

For nucleic acid isolation, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. For the sample's pretreatment follow the instructions for use of the extraction kit used. The assay has been validated with the following extraction kits:

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

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized High-Risk HPVs Positive Control (red tube) with 200 µL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots to avoid multiple freeze-thaw cycles, and store them at -20°C.

This component contains high copies number template and is a very significant contamination risk. Therefore, we recommend open and manipulate it in a separate laboratory area away from the other components and samples.

Reaction setup

- Separate the number of required reactions including samples and controls. Remember that one positive and one negative control must be included in each run for each assay.
- Peel off protective aluminium seal from the strips.
- Pipette 15 µL of Resuspension buffer (green tube) and add them into each well.
- Pipette 5 µL of DNA sample, negative (yellow tube) or positive (red tube) controls and add them into the corresponding wells.
- Cover the wells with the caps provided. Spin down briefly (optional).
- Place the strips in the Real-time PCR instrument.

Programme your thermocycler

Set your thermocycler following the conditions below:

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

Set the fluorescence data collection during the extension step (*) through the FAM (HPV 16 and other (HPVs 33, 45 and/or 51)), ROX (Internal Control (IC) and other (HPVs 31, 39 and/or 56)), HEX, JOE, or VIC (HPV 18 and other (HPVs 52, 59 and/or 68)), and Cy5 (others (HPVs 35, 58 and/or 66)). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System or Stratagene Mx3005P™ Real Time PCR System check that passive reference option ROX is none (See Attached II).

Analysis and interpretation of results

The results analysis is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions. To verify the correct operation of the amplification mix, check the internal control (IC) signal emission.

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

Positive control

The positive control used in each run must show an amplification curve (Ct ≤40) in FAM, ROX, HEX, and Cy5 channels, which validates the reaction.

Negative control

The negative control included in each run must show signal' absence (Ct ≥40 or no signal) in FAM, ROX, HEX, and Cy5, which validates the reaction.

The experiment seems to be failed if there is amplification signal in negative control or signal absence in the positive control for any channel. The assay should be repeated.

The Internal Control (IC) should show an amplification signal (Ct ≤40) in positive control and negative control wells.

The clinical samples test results assessment should be performed once controls' results have been validated. The result interpretation is summarized in the following table:

High-Risk HPV 1				High-Risk HPV 2				Interpretation
HPV 16 (FAM)	HPV 18 (HEX)	Internal Control (ROX)	Other (HPV 35/58/66) (Cy5)	Other (HPV 33/45/51) (FAM)	Other (HPV 52/59/68) (HEX)	Other (HPV 31/39/56) (ROX)		
+	-	+/- ¹	-	-	-	-	HPV 16 DNA detected	
-	+	+/- ¹	-	-	-	-	HPV 18 DNA detected	
-	-	+/- ¹	An amplification signal in one or more channels: +				Other HR HPV 16 and HPV 18 DNA detection	
+	+	+/- ¹	-	-	-	-	HPV 16 and HPV 18 DNA detected	
+	-	+/- ¹	An amplification signal in one or more channels: +				HPV 16 and other HR HPV 18 DNA detection	
-	+	+/- ¹	An amplification signal in one or more channels: +				HPV 18 and other HR HPV 16 DNA detection	
+	+	+/- ¹	An amplification signal in one or more channels: +				HPV 16, HPV 18, and other HR HPV 16 DNA detection	
-	-	+ ²	-	-	-	-	Targets not Detected ²	
-	-	- ²	-	-	-	-	Test failure ²	

(+) **Positive:** Amplification signal (Ct ≤40)

(-) **Negative:** No amplification signal (Ct ≥40 or no signal)

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

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

If the obtained result is confusing or doubtful, it is necessary to check that all the steps have been carried out correctly, to verify the correct performance of each qPCR steps and to review all the parameters, the sigmoid shape of the curve and the fluorescence intensity.

The test results must be evaluated by a health professional, together with the medical history, clinical symptoms and/or the results obtained in other diagnostic tests.

Quality Control

To confirm the appropriate performance of the molecular diagnostic technique, an Internal Control (IC) is included in each reaction. Moreover, a positive and a negative control must be included in each assay to interpret the results correctly.

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

In one study, 626 exocervical and endocervical samples collected with endocervical swabs resuspended in PreservCyt® solution using ThinPrep® vials for the ThinPrep® system (HOLOGIC®) were analyzed with Vitassay qPCR High-Risk HPV kit.

The extraction was performed with the MagMAX™ Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit using the KingFisher Flex system (Thermo Fisher Scientific) and with the Maxwell® RSC 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit using the Maxwell® RSC 16 Instrument (Promega), CFX96™ Real-Time PCR instrument (Bio-Rad), 7500 Fast and 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

The Vitassay qPCR High-Risk HPV kit's results were compared with those of two other kits, the Cobas® HPV Test (Roche Diagnostics) and the Anyplex™ II HPV HR (Seegene), and the obtained results are shown in the following tables.

Target	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV
HPV 16	64	562	0	0	1 (0.94 – 1)	1 (0.99 – 1)	1 (0.94 – 1)	1 (0.99 – 1)
HPV 18 and HPV 45	35	591	0	0	1 (0.90 – 1)	1 (0.99 – 1)	1 (0.90 – 1)	1 (0.99 – 1)
Other HR HPVs	190	435	0	1	0.99 (0.97 – 1)	1 (0.99 – 1)	0.99 (0.97-0.99)	1 (0.99-1)

Cobas® HPV Test (Roche) was used as a comparator kit. TP = True Positive, TN = True Negative, FP = False Positive, FN = False Negative, SE = Sensibility, SP = Specificity, PPV = Positive Predictive Value, NPV = Negative Predictive Value.

Target	TP	TN	FP	FN	SE	SP	PPV	NPV
HPV 16	64	561	0	1	0.98 (0.91 – 1)	1 (0.99 – 1)	0.98 (0.91 – 0.99)	1 (0.99 – 1)
HPV 18	18	608	0	0	1 (0.81 – 1)	1 (0.99 – 1)	1 (0.82-1)	1 (0.99 – 1)
HPV 45	18	608	0	0	1 (0.81 – 1)	1 (0.99 – 1)	1 (0.82-1)	1 (0.99 – 1)
HPV 35	25	598	2	1	0.96 (0.80 – 0.99)	0.99 (0.98 – 1)	0.96 (0.81 – 0.99)	0.99 (0.98 – 0.99)
HPV 58	31	593	2	0	1 (0.88 – 1)	0.99 (0.98 – 1)	1 (0.89 – 1)	0.99 (0.98 – 0.99)
HPV 66	15	609	2	0	1 (0.78 – 1)	0.99 (0.98 – 1)	1 (0.79 – 1)	0.99 (0.98 – 0.99)
HPV 33	20	605	1	0	1 (0.83 – 1)	0.99 (0.99 – 1)	1 (0.83 – 1)	0.99 (0.99 – 1)
HPV 51	18	607	1	0	1 (0.81 – 1)	0.99 (0.99 – 1)	1 (0.82 – 1)	0.99 (0.99 – 1)
HPV 52	26	599	1	0	1 (0.86 – 1)	0.99 (0.99 – 1)	1 (0.87 – 1)	0.99 (0.99 – 1)
HPV 59	25	600	1	0	1 (0.86 – 1)	0.99 (0.99 – 1)	1 (0.86 – 1)	0.99 (0.99-1)
HPV 68	12	612	1	1	0.92 (0.64 – 0.99)	0.99 (0.99 – 1)	0.92 (0.66 – 0.98)	0.99 (0.99 – 1)
HPV 31	35	586	4	1	0.97 (0.85 – 0.99)	0.99 (0.98 – 0.99)	0.97 (0.85 – 0.99)	0.99 (0.98 – 0.99)
HPV 39	21	601	4	0	1 (0.83 – 1)	0.99 (0.98 – 0.99)	1 (0.84 – 1)	0.99 (0.98 – 0.99)
HPV 56	21	600	4	1	0.95 (0.77 – 0.99)	0.99 (0.98 – 0.99)	0.95 (0.78 – 0.99)	0.99 (0.98 – 0.99)

Anyplex™ II HPV HR (Seegene) was used as a comparator kit. TP = True Positive, TN = True Negative, FP = False Positive, FN = False Negative, SE = Sensibility, SP = Specificity, PPV = Positive Predictive Value, NPV = Negative Predictive Value.

In conclusion, the results show a high concordance to detect those pathogens using Vitassay qPCR High-Risk HPVs.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of standards from the pathogens ranging from 107 to 101 copies/reaction. This assay has a detection limit of 10 DNA copies per reaction for HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 59, and 68, and 50 DNA copies per reaction for HPV 16, 18, 58, and 66.

Analytical specificity

The analytical specificity for the high-risk papillomavirus detection was tested within the panel of following microorganisms, where no cross-reactivity was observed between any of the species:

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

Analytical reactivity

The Vitassay qPCR High-Risk HPVs kit's reactivity was evaluated against specific and synthetic DNA, and against DNA extracted from clinical samples and simulated clinical samples from EQA panels positive for high-risk HPVs (types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, and 68) as templates, showing positive results.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR High-Risk HPVs has been validated on the following equipment:

- Cobas z480 Analyzer (Roche)
- 7500 Fast and 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ¹
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTPPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)

¹: When using the Applied Biosystems 7500 Fast with strips it is recommend placing a plate holder for the tubes (Ref. PN 4388506).

Limitations

- All obtained results must be interpreted by a specialist together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay has been validated with DNA extracted from cervical (exocervical and endocervical) samples collected with endocervical swabs resuspended in PreservCyt® solution using ThinPrep® vials for the ThinPrep® system (HOLOGIC®). The use of other samples has not been established.
- The test quality depends on the sample's quality; proper DNA from clinical specimens must be extracted.
- This test does not provide quantitative values nor indicate the number of organisms present. This is a qualitative test.
- 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 either by High-Risk HPVs Positive Control during its reconstitution, by samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.
- Detection may be affected by several factors and their combinations which may lead to false negative results, including a) inadequate specimen sampling, shipping, storage, handling; b) procedural errors (including DNA extraction); c) DNA degradation

during specimen shipping, storage, and/or preparation; d) pathogen load below the limit of detection for the assay; e) the presence of Real-Time amplification inhibitors or other types of interference (an interference study evaluating the effect of vaccines, antiviral therapeutics, antibiotics, antifungal creams, chemotherapeutics or immunosuppressant drugs used to prevent the infection or used during the treatment of the infection was not performed); f) failure to follow the manufacturer's instructions and procedures.

- Viral DNA detection may not indicate the presence of viable and/or infectious virus or that HPV is the causative agent for clinical symptoms.
- The negative results do not preclude high-risk HPV infection and should not be the sole basis of a patient treatment/management decision. Optimum specimen types for HPV identification and/or stage of infection most suitable for its collection have not been established yet. Consider the collection of multiple specimens from the same patient at different time points, which may increase the probability of detecting the virus.
- If the patient clinical data, laboratory tests and epidemiological studies suggest possible high-risk HPV infection, and other Sexually Transmitted Diseases have been discarded, a false negative result might not be discarded, and additional tests should be performed.
- Fluorescence values may vary due to multiple factors such as PCR equipment, extraction system, sample type, and its previous treatment, among others.
- A bioinformatic analysis showed that the selected primers and probes detect their targets (HPV types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 59, 56, 58, 66 and 68) and that the primers and probe for the HPV 39 detection could detect HPV 68 due to their genetic similarities.
- The intended use of Vitassay qPCR High-Risk HPVs is the detection of high-risk HPV in clinical samples, which is performed in clusters of three genotypes per channel. In addition, for HPV 16 and HPV 18, the identification is also possible. This kit is not recommended for evaluation of suspected sexual abuse.
- HPV infection prevalence in a population may affect performance. Positive predictive values decrease when testing populations with low prevalence or individuals with no risk infection.
- High-Risk HPV infection is not a definitive indicator of the presence of high-grade cervical disease, nor does it imply in all cases that high-grade cervical disease or cancer will develop.
- Vitassay qPCR High-Risk HPVs detects High-Risk HPV types. Thus, other Low-Risk HPV types not detected by this assay may be present in the specimen.

Attached I. Compatibility of the most common real-time PCR equipment

The most common thermocyclers are listed in the following guidance table separated by tube type. Please refer to the table, but it is recommended that you check the equipment and its specifications before running the assay. If you do not find your thermocycler, please contact with your supplier.

Low profile Block Thermocyclers	High profile Block Thermocyclers
Agilent Technologies	Abbott
AriaMx Real-Time PCR System	Abbott m2000 ⁽¹⁾
AriaDx Real-Time PCR System	Agilent Technologies
Applied Biosystems	Mx3000P™ Real Time PCR System
7500 Fast Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	Mx3005P™ Real Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System ^{(1) (2)}	Applied Biosystems
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	7300 Real-Time PCR System ^{(1) (4)}
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	7500 Real-Time PCR System ⁽¹⁾
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	7900 HT Real-Time PCR System ⁽³⁾
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	ABI PRISM 7000 ⁽³⁾
QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System	ABI PRISM 7700 ⁽³⁾
QuantStudio™ 3 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
StepOne Plus™ Real-Time PCR System ⁽³⁾	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
StepOne™ Real-Time PCR System ^{(3) (4)}	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 5 Fast Real-Time PCR System
Azure Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Azure Cielo 3 ⁽⁵⁾	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
Azure Cielo 6	ViiA™ 7 Real-Time PCR System
BIONEER	Analytik Jena
Exicycler™ 96 Fast	qTOWER ⁽⁶⁾
Bio-Rad	BIONEER
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	Exicycler™ 96
CFX96™ IVD Real-Time PCR Detection System	BIOER
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾	QuantGene 9600
CFX Opus 96	Bio-Rad
Roche	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR System
LightCycler® 480 Real-Time PCR System ^{(1) (6)}	CFX96™ Deep Well IDV Real-Time PCR System
LightCycler® 96 Real-Time PCR System	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Cobas z480 Analyzer ^{(1) (6)}	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR Detection System
	My iQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
Special Formats ⁽⁷⁾	My iQ™ 2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁵⁾
Bio Molecular Systems	DNA-Technology
Mic Real Time PCR Cyclor	DTlite Real-Time PCR System ⁽⁸⁾
Cepheid	DTprime Real-time Detection Thermal Cyclor ⁽⁸⁾
SmartCycler®	Eppendorf
Qiagen	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
Rotor-Gene® Q	Qiagen
	QIAquant 96 ⁽⁶⁾

(1) A special grid is needed to fit these real-time PCR kits.

(2) Select Ramp Speed "Standard" in New Experiment/Advanced Set-up/Experiment Properties.

(3) No Cy5 caption.

(4) No ROX caption.

(5) Only FAM and HEX caption.

(6) Specific compensation color is required.

(7) The product must be reconstituted following the appropriate procedure (see Test procedure) and transferred to the specific tubes for Mic, SmartCycler®, or Rotor-Gene® Q.

(8) See Attached III to configure exposure settings.

Attached II. Detection channels of most common real time PCR equipment

The fluorescence detection channels of some of most common Real-Time PCR thermocyclers are specified in the following table:

Thermocycler	Vitassay Channel	Detection Channel	Observations
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	During the first few cycles of an analysis, some wells may exhibit abnormal RFU values and show a non-sigmoid rising line. To correct this effect, select the Apply Fluorescence Drift Correction option in the Settings menu for the baseline configuration.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Applied Biosystems ABI 7500	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none. During the first few cycles of an assay, some wells may exhibit abnormal RFU values and show a non-sigmoidal rising line. To correct for this effect, select the Start cycle and End cycle values so that the baseline ends before the detection of significant fluorescence.
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Color Compensation required.
	HEX	533/580	
	ROX	533/610	
	Cy5	618/660	
Roche Cobas z 480	FAM	465/510	Color Compensation required.
	HEX	540/580	
	ROX	540/610	
	Cy5	610/670	
Cepheid Smartcycler®	FAM	Channel 1	
	HEX	Channel 2	
	ROX	Channel 3	
	Cy5	Channel 4	
Abbott m2000rt	FAM	FAM	
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Agilent Technologies Mx3000P™ Mx3005P™	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none.
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Bio Molecular Systems Mic Real Time PCR Cycler	FAM	Green	In the "Run Profile" menu, introduce the correct parameters for "Temperature Control" (Standard TAQ (v3)), Volume (20 ul) and the 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	
Agilent Technologies AriaMx	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene® Q	FAM	Green	In the Channel Setup, click on the "Gain Optimisation" button and then go to "Optimise Acquiring". The fluorescence Target Sample Range must be between 5 and 10 FI for each channel. Also select the option "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
BIONEER Exicycler™ 96	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Attached III. Optical measurement exposure setting

The exposure values of some thermocyclers must be adjusted for proper operation. Set exposure values as follows:

Thermocycler	Vitassay channel	Exposure values
DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	200
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500*
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500

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












Bibliography/Bibliografía

- Baseman JG and Koutsky LA. (2005). The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of Clinical Virology*. 32(Supple 1):S16-S24.
- Chan CK, Aimagambetova G, Ukybassova T, Kongrtay K and Azizan A. (2019). Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer: Epidemiology, Screening, and Vaccination – Review of Current Perspectives. *Journal of Oncology*. 2019:3257939.
- Cheng L, Wang Y and Du J. (2020). Human Papillomavirus Vaccines: An Updated Review. *Vaccines*. 8(3):391.
- Manini I and Montomoli E. (2018). Epidemiology and prevention of Human Papillomavirus. *Annali di igiene : medicina preventiva e di comunita*. 30(4 Supple 1), 28–32.
- de Sanjosé S, Brotons M and Pavón MA. (2018). The natural history of human papillomavirus infection. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 47:2-13.

Trademarks

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

Symbols for components and reagents / Símbolos para reactivos y productos

	<i>In vitro</i> diagnostic device <i>Producto para diagnóstico in vitro</i>		Contains sufficient for <n> test <i>Contiene <n> test</i>		Catalogue number <i>Número de referencia</i>		Keep dry <i>Almacenar en lugar seco</i>		Manufacturer <i>Fabricante</i>
	Consult instructions for use <i>Consultar las instrucciones de uso</i>		Batch code (yyyy-xxx) <i>Número de lote (yyyy-xxx)</i>		Use by (yyyy-mm-dd: year-month-day) <i>Fecha de caducidad (yyyy-mm-dd: año-mes-día)</i>		Temperature limitation <i>Limitación de temperatura</i>		Volume <i>Volumen</i>
	CE marking <i>Marcado CE</i>								

Change Control / Control de cambios		
Version Nº / Versión Nº	Changes / Cambios	Date / Fecha
00	Original version	31/01/2023

Real-Time PCR Kits



VA Vitassay

identifying pathogens worldwide

Vitassay Healthcare, S.L.U

Parque Tecnológico Walqa

Ctra. N-330 Km. 566

22197 Huesca (Spain)

Ph. (+34) 974 001 193

info@vitassay.com

www.vitassay.com

F09-81 Rev.00