

Vitassay qPCR

HPV

PCR en tiempo real para la detección cualitativa y diferenciación del virus del papiloma humano 16 y del virus del papiloma humano 18 en muestras humanas

Real-time PCR kit for the qualitative detection and differentiation of human papilloma virus 16 and papilloma virus 18 in human samples



Uso previsto

Vitassay qPCR HPV, permite la detección y diferenciación del virus del papiloma humano 16 y/o del virus del papiloma humano 18 mediante PCR a tiempo real en muestras clínicas. El objetivo de este producto es facilitar el diagnóstico diferencial de infecciones producidas por los Virus del papiloma humano 16 y 18.

Referencias

Vitassay qPCR HPV 4x8-well strip, low profile	7041037
Vitassay qPCR HPV 4x8-well strip, high profile	7042037

Materiales/Reactivos suministrados

Código	Reactivo/Material	Color	Cantidad
7041S037/ 7042S037	HPV strips low/high profile	-	4 tiras de 8 pocillos
7C037	HPV 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	-	4 tiras de 8 tapones

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 alcuotas.
- Conservar los reactivos en oscuridad.

Material y equipamiento necesario, pero no proporcionado

- 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

Resumen

El virus del papiloma humano (VPH) es el responsable de la infección de transmisión sexual (ITS) más frecuente del tracto reproductivo. Este virus es tan común que casi todas las mujeres y todos los hombres sexualmente activos lo contraen en algún momento de su vida.

Se conocen más de 200 tipos de VPH y se han clasificado predominantemente en tres géneros: Alpha-papilomavirus, Beta-papilomavirus y Gamma-papilomavirus. Entre los 65 tipos de VPH pertenecientes a Alpha-HPV, hay 15 genotipos asociados con mayor frecuencia a los casos de cáncer de cuello uterino, se les denomina HPV de alto riesgo, (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82) siendo el tipo 16 responsable de más del 50% de los casos de carcinoma de células escamosas.

La transmisión se produce por contactos sexuales y los órganos más susceptibles de infección son el cuello uterino y la línea pectínea del canal anal. Las infecciones por HPV son frecuentemente en sábanas, en cuyos casos el DNA viral puede recuperarse del cuello uterino, vulva, vagina, canal anal, pene y escroto. 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.

Los tumores del tracto genital femenino representan una quinta parte de los tumores de la mujer según estimaciones mundiales. El tumor más frecuente es el de cáncer de cuello uterino (9,9%), seguido del cáncer de ovario (1%), endometrio (4%) y de los cánceres de vagina y de vulva (1%). Estos datos son de particular importancia en los países en desarrollo, debido a la falta de programas adecuados de detección del cáncer de cuello uterino. En particular, VPH 16 y 18 son los que con mayor frecuencia pueden conducir a lesiones precancerosas. Además, tanto hombres como mujeres pueden desarrollar cáncer de boca / garganta y ano / recto causado por infecciones de VPH. Los hombres también pueden desarrollar cáncer de pene. 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.

Principio del test

Vitassay qPCR HPV se basa en la amplificación a tiempo real de una región conservada del gen *L2* para el virus del papiloma humano 16 y del gen *L1* para el virus del papiloma humano 18. La presencia de DNA viral se detecta mediante el aumento de la fluorescencia observada durante la reacción, tras la hidrólisis de la sonda fluorescente.

Vitassay qPCR HPV, se trata de un test *listo 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. La amplificación de la secuencia diana se detecta en los canales FAM (HPV 16) y HEX, JOE o VIC (según el equipo utilizado) (HPV 18) mientras que el control interno (CI) se detecta en el canal Cy5.

Precauciones

- Diseñado para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
- 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.
- 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.
- Las muestras y todo material en contacto con ellas se deben tratar como potencialmente infecciosos y se deben gestionar 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.

Procedimiento

Toma de muestra, preparación y extracción de DNA

Realizar el pretratamiento y el aislamiento de los ácidos nucleicos utilizando un sistema manual o automático compatible con ensayos de PCR en tiempo real. Seguir las instrucciones de uso del fabricante. Los siguientes kits de extracción han sido validados:

Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega)

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec)

QIAamp Viral RNA Mini Kit, utilizando QIAcube instrument (Qiagen)

NucleoMag® Pathogen (Macherey Nagel)

NucleoSpin RNA Virus (Macherey Nagel)

MagDEA Dx SV kit con 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)

Preparación del control positivo

Reconstituir el contenido liofilizado del HPV Positive Control (tubo rojo) con 100 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).
- 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) y 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
Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	10 seg	45
Hibridación/Elongación (Recogida de datos*)	60°C	50 seg	

Los datos de fluorescencia deben recogerse durante la etapa de hibridación (*) a través de los canales FAM (virus del papiloma humano 16), HEX, JOE o VIC (virus del papiloma humano 18) y Cy5 (Control Interno). 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 esta desactivada (ver Adjunto II).

Análisis e interpretación de resultados

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.

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 en los canales de los virus del papiloma humano 16 (FAM) y virus del papiloma humano 18 (HEX, JOE o VIC).

Control negativo

El control negativo incluido en cada serie debe mostrar la ausencia de señal de FAM y HEX, JOE o VIC.

El experimento es inválido si hay señal de amplificación en el control negativo o ausencia de la señal en el control positivo. Se recomienda repetir el ensayo.

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

HPV 16 (FAM)	HPV 18 (HEX)	Control Interno	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

Positivo (+): Señal de amplificación

Negativo (-): No hay señal de amplificación

Si las muestras negativas para todos los patógenos no muestran un resultado positivo para el control interno, se debe repetir el ensayo diluyendo la muestra original 1:10 o repetir la extracción de los ácidos nucleicos debido a posibles problemas causados por inhibidores de PCR.

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

Un total de 94 muestras clínicas (32 citología líquida y 62 frotis endocervicales/vaginales) procedentes de pacientes sintomáticos fueron analizadas mediante Vitassay qPCR HPV y 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).

Ambos kits detectaron la presencia del virus del papiloma humano 16 en 43 muestras y del virus del papiloma humano 18 en 5 muestras. Por tanto, se obtuvo una concordancia del 100% entre los dos kits. Además, se observó que un 36% de las muestras eran coinfecciones de HPV16 /HPV18 (20/34).

Además, Vitassay qPCR HPV se evaluó con el programa “QCMD 2017 Human Papillomavirus DNA”. El panel consistió en 12 viales que contenían suspensiones celulares con diversas concentraciones y subtipos de virus del papiloma humano o muestras negativas para el patógeno buscado. Todas las muestras se detectaron correctamente confirmando la alta sensibilidad y especificidad del kit de diagnóstico molecular evaluado.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica fue determinada a partir de diluciones seriadas (1:10) del DNA molde de los diferentes patógenos (10^7 - 10^1 copias/reacción). Este ensayo tiene un límite de detección de ≥ 10 copias de DNA viral por reacción.

Especificidad analítica

La especificidad analítica para la detección de HPV 16 y HPV 18 fue confirmada probando un panel compuesto por los siguientes patógenos, no observándose reacciones cruzadas entre ninguna de las especies:

Cepas empleadas en las pruebas de reactividad 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 influenzae</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>		

Reactividad analítica

Vitassay qPCR HPV ha sido evaluado para el virus del papiloma humano 16 con la cepa HPV 16, obteniéndose un resultado positivo.

Vitassay qPCR HPV ha sido evaluado para el virus del papiloma humano 18 con la cepa HPV 18, obteniéndose un resultado positivo.

Termocicladores compatibles

Vitassay qPCR HPV, ha sido probado en los siguientes equipos:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96 TM Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPrime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)¹
- SmartCycler® (Cepheid)¹

I: Para los equipos Rotor-Gene® Q y SmartCycler® el producto debe ser reconstituido y trasvasado a los tubos específicos de cada uno de los equipos.

II: 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

- Este test proporciona un diagnóstico preliminar de infección por virus del papiloma humano 16 y virus del papiloma 18. 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 probado en muestras de citologías líquidas y frotis endocervicales y vaginales. El uso de otro tipo de 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 humanas. 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 del DNA 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 los diferentes patógenos, 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.

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

Los termocicladores más usuales se enumeran en la siguiente tabla separados por tipo de tubo. 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 RealTime System
Applied Biosystems	Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System	7300 Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System	7500 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	7900 HT Real-Time PCR System
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
StepOne Plus™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
StepOne™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
BIONEER	ViiA™ 7 Real-Time PCR
Exicycler™ 96	Analytik Jena Biometra
Bio-Rad	TOptical
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	qTOWER 2.0
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System	BIONEER
Cepheid	Exicycler™ 96
SmartCycler®	Bio-Rad
Qiagen	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
Rotor-Gene® Q	iCycler iQ™ Real-Time PCR
Roche	iCycler iQ™5 Real-Time PCR
LightCycler®480 Real-Time PCR System	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
LightCycler®96 Real-Time PCR System	MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
Cobas z480 Analyzer	Cepheid
	SmartCycler®
	DNA-Technology
	DTlite Real-Time PCR System*
	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler*
	Eppendorf
	Mastercycler™ep <i>realplex</i>
	Qiagen
	Rotor-Gene® Q
	Stratagene / Agilent Technologies
	Mx3000P™ Real Time PCR System
	Mx3005P™ Real Time PCR System

* Ver Adjunto III para configurar los valores de exposición

Adjunto II: Canales de detección de los equipos a tiempo real

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	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Opción del control pasivo ROX desactivada
	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	
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	Opción del control pasivo ROX desactivada
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
AriaMx Agilent	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Rotor-Gene®Q Qiagen	FAM	Green	Al configurar los canales, presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquaring". 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	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

Adjunto III: Configuración 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
DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cyclers (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

Intended use

Vitassay qPCR HPV allows the detection and differentiation of human papilloma virus 16 and 18 by real-time PCR in clinical samples. The product is intended for use in the diagnosis of human papillomavirus 16 and 18 infections alongside clinical data of the patient and other laboratory tests outcomes.

References

Vitassay qPCR HPV 4x8-well strip, low profile	7041037
Vitassay qPCR HPV 4x8-well strip, high profile	7042037

Materials/reagents provided

Reference	Reagent/Material	Colour	Amount
7041S037/ 7042S037	HPV strips low/high profile	-	4x8-well strip
7C037	HPV 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	-	4x8 cap strip

Transport and storage

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

Additional equipment and material required

- DNA extraction kit
- Real-time PCR instrument (thermocycler) (Attached I)
- Centrifuge for 1.5 ml tubes
- Vortexer
- Micropipettes (1-20 µl, 20-200 µl)
- Filter tips
- Powder-free disposal gloves

Summary

Human papilloma virus (HPV) is responsible for the most frequent sexually transmitted infection (STI) of the reproductive tract. This virus is so common that almost all sexually active women and men contract it at some point in their lives.

More than 200 types of HPV are known and have been classified predominantly in three genera: Alpha-papillomavirus, Beta-papillomavirus and Gamma-papillomavirus. Among the 65 HPV types belonging to Alpha-HPV, there are 15 genotypes most frequently associated with cervical cancer cases, called high-risk HPV (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 and 82), type 16 is the responsible for more than 50% of cases of squamous cell carcinoma.

The transmission is produced by sexual contacts and the organs most susceptible to the infection are the cervix and the pectinate line of the anal canal. HPV infections are frequently in sheet, in which cases the viral DNA can be recovered from the cervix, vulva, vagina, anal canal, penis and scrotum. Most HPV infections do not cause symptoms or diseases and resolve spontaneously. But when HPV does not go away, it can cause health problems such as genital warts, respiratory papillomatosis and cervical, anogenital and oropharyngeal cancers.

Tumors of female genital tract account for a fifth of women's tumors according to global estimates. The most frequent tumor is that of cervical cancer (9.9%), followed by cancer of the ovary (1%), endometrium (4%) and cancers of the vagina and vulva (1%). These data are of particular importance in developing countries, due to the lack of adequate screening programs for cervical cancer. In particular, HPV 16 and 18 are the ones that most often can lead to precancerous lesions. In addition, both men and women can develop mouth / throat and anus / rectum cancer caused by HPV infections. Men can also develop penile cancer. Currently, there are vaccines that could prevent infection with the types of HPV that most often cause cancer.

A variety of diagnostic methods of different 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 cultivated efficiently and the clinical performance of serological assays is poor, the diagnosis of HPV infection is based on molecular tools. Currently, real-time PCR offers high sensitivity and can be performed in different types of samples.

Principle of the test

Vitassay qPCR HPV test is based on the real-time amplification of specific conserved region of the *L2* gene for human papilloma virus 16 and *L1* gene for human papilloma virus 18. After DNA extraction, the presence of the HPV16 and HPV 18 viruses is detected by a fluorescence increment during the reaction upon hydrolysis of the fluorescent probe.

Vitassay qPCR HPV test 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 reaction inhibition. The amplification of the HPV 16 DNA target is detected through the FAM channel, HPV 18 DNA target in HEX, VIC or JOE channel (depending on the equipment used select the proper detection channel, see Annex II) whereas the internal control (IC) in Cy5 channel.

Precautions

- For *in vitro* diagnostic use.
- 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 broken or if the foil has been broken or damaged.
- 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.
- Specimens and reagents/materials that have been exposed to them must be treated as potentially infectious. 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.

Procedures

Specimen collection, processing and DNA extraction

For pre-treatment and DNA isolation, it is recommended to use your optimized manual or automatic system compatible with real-time PCR technology. The assay has been validated with the following extraction kits:

Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega)

Invisorb® Spin Universal Kit (Stratec)

QIAamp Viral RNA Mini Kit with QIAcube instrument (Qiagen)

NucleoMag® Pathogen (Macherey Nagel)

NucleoSpin RNA Virus (Macherey Nagel)

MagDEA Dx SV kit with magLEAD® 6gC instrument (Precision System Science Co.)

NX-48 Urine/Swab DNA Kit using Nextractor® NX-48 system, (Genolution)

ZP02004 MagPurix Tissue DNA Extraction Kit using MagPurix 12A instrument (Zinexts Life Science Corp.)

Positive control preparation

Reconstitute the lyophilized HPV Positive Control (red tube) with 100 µL of PCR grade water (white tube). To ensure a complete resuspension, vortex the tube thoroughly. After first use, dispense into aliquots in order 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.
- 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 and positive controls and add them into each well.
- 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
Initial denaturation	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 (human papilloma 16 virus), HEX, JOE or VIC channels (human papilloma virus 18) and Cy5 (Internal Control (IC)). If you use the Applied Biosystems 7500 Fast, the Applied Biosystems StepOne™ or the Stratagene Mx3029P™ check that passive reference option ROX is none (Attached II).

Analysis and interpretation of results

The analysis of the results is done by the software itself of the used real-time PCR system following manufacturer's instructions.

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

Positive control

The positive controls used in each run, must show an amplification curve for FAM (Herpes simplex virus 1), ROX (Herpes simplex virus 2) and Cy5 (*Treponema pallidum*), which validates the reaction.

Negative control

The negative controls included in each run, must show the absence of signal in FAM, ROX and Cy5 which validates the reaction.

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

The result interpretation is summarized in the following table:

HPV 16 (FAM)	HPV 18 (HEX)	Internal Control	Negative Control	Positive Control	Interpretation
+	+	+/-	-	+	HPV 16 and HPV 18 positives
-	-	+	-	+	HPV 16 and HPV 18 negatives
+	-	+/-	-	+	HPV 16 positive and HPV 18 negative
-	+	+/-	-	+	HPV 16 negative and HPV 18 positive
+	+	+	+	+	Experiment fail
-	-	-	-	-	Experiment fail

(+) **Positive:** Amplification signal

(-) **Negative:** No amplification signal

If the negative samples not show a positive result for the internal control, they should be retested from the diluted original sample 1:10 or the nucleic acid extraction has to be repeated due to possible problems caused by PCR inhibitors.

Quality Control

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

Performance evaluation

Clinical sensitivity and specificity

A total of 94 clinical samples (32 liquid cytology and 62 endocervical / vaginal swabs) from symptomatic patients were analyzed by Vitassay qPCR HPV and 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)).

Both kits detected the presence of human papilloma virus 16 in 43 samples and human papillomavirus 18 in 5 samples. In addition, it was observed that 36% of the samples were coinfections of HPV16 / HPV18 (20/34).

In addition to this, Vitassay qPCR HPV test was evaluated with QCMD 2017 Human Papillomavirus DNA EQA programme. The panel consisted on 12 vials containing cell suspensions with various concentrations and subtypes of humanpapillomavirus or samples negative for HPV. All samples were detected correctly confirming the sensitivity and specificity of the evaluated molecular diagnostic kit.

Analytical sensitivity

The analytical sensitivity was determined by analysis of 10-fold dilution series of human papilloma virus 16 and human papilloma virus 18 templates ranging from 10^7 to 10^1 copies/rxn. This assay has a detection limit of ≥ 10 viral DNA copies per reaction.

Analytical specificity

The analytical specificity for papilloma virus 16 and 18 was tested within the panel of following pathogens, where no cross-reactivity was seen between any of the species:

Cross-reactivity assay		
<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 influenzae</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>		

Analytical reactivity

The analytical reactivity of Vitassay qPCR HPV for human papillomavirus 16 was evaluated against Human papillomavirus 16 showing positive result.

The analytical reactivity of Vitassay qPCR HPV for human papillomavirus 18 was evaluated against Human papillomavirus 18 showing positive result.

Compatibles real-time PCR equipment

Vitassay qPCR HPV has been validated on the following equipments:

- Cobas Z480 (Roche)
- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) ^{II}
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies)
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology)
- DTPRime Real Time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)
- Rotor-Gene® Q (Qiagen)^I
- SmartCycler® (Cepheid)^I

I: For Rotor-Gene® Q and SmartCycler® thermocyclers the product should be reconstituted following the procedure and transferred into specific Rotor-Gene® Q and/or SmartCycler tubes.

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

Limitations

- This test provides a presumptive diagnosis of HPV16 and HPV18 infection. All results must be interpreted together with other clinical information and laboratory findings available to the physician.
- This assay was tried with liquid cytology and endocervical / vaginal swabs samples. The use of other samples has not been established.
- The quality of the test depends on the quality of the sample; proper DNA from clinical specimens 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 may be detected, but results may not be reproducible.
- There is a possibility of false positive results due to cross-contamination by the different pathogens, either samples containing high concentrations of target DNA or contamination due to PCR products from previous reactions.

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

The most common thermocyclers are listed in the following table separated by tube type. 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 RealTime System
Applied Biosystems	Applied Biosystems
7500 Fast Real-Time PCR System	7300 Real-Time PCR System
7500 Fast Dx Real-Time PCR System	7500 Real-Time PCR System
QuantStudio™ 12K Flex 96-well Fast	7900 HT Real-Time PCR System
QuantStudio™ 6 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7000
QuantStudio™ 7 Flex 96-well Fast	ABI PRISM 7700
QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
StepOne Plus™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
StepOne™ Real-Time PCR System	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR
ViiA™ 7 Fast Real-Time PCR System	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System
BIONEER	ViiA™ 7 Real-Time PCR
Exicycler™ 96	Analytik Jena Biometra
Bio-Rad	TOptical
CFX96™ Real-Time PCR Detection System	qTOWER 2.0
Mini Opticon™ Real-Time PCR Detection System	BIONEER
Cepheid	Exicycler™ 96
SmartCycler®	Bio-Rad
Qiagen	CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection
Rotor-Gene® Q	iCycler iQ™ Real-Time PCR
Roche	iCycler iQ™ 5 Real-Time PCR
LightCycler®480 Real-Time PCR System	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System
LightCycler®96 Real-Time PCR System	MyiQ™ 2Real-Time PCR Detection System
Cobas z480 Analyzer	Cepheid
	SmartCycler®
	DNA-Technology
	DTlite Real-Time PCR System
	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler
	Eppendorf
	Mastercycler™ ep <i>realplex</i>
	Qiagen
	Rotor-Gene® Q
	Stratagene / Agilent Technologies
	Mx3000P™ Real Time PCR System
	Mx3005P™ Real Time PCR System

* 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:

REAL-TIME PCR THERMOCYCLER	Vitassay CHANNEL	DETECTION CHANNEL	OBSERVATIONS
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	HEX	HEX	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
ABI 7500 Applied Biosystems	FAM	FAM	Passive reference option ROX is none
	HEX	VIC	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	
Roche Lightcycler®480II	FAM	465/510	Colour Compensation 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 ROX is 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	
Exicycler™ 96 BIONEER	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
DTIite Real-Time PCR System (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	500
	ROX	500
	Cy5	500
DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology)	FAM	500
	HEX	1000
	ROX	1000
	Cy5	1000

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>.

Trademarks

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™ and Mx3029™ 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.

Symbols for IVD components and reagents/ Símbolos utilizados para componentes y reactivos IVD

	Producto para diagnóstico <i>in vitro</i> For in vitro diagnostic use only		Almacenar en lugar seco Keep dry
	Consultar las instrucciones de uso Consult instructions for use		Limitación de temperatura Temperature limitation
	Fecha de caducidad Use by		Fabricante Manufacturer
	Número de lote Lot number		Contiene <n> test Contains sufficient for <n> test
DIL	Diluyente de muestra Buffer (sample diluent)		Número de referencia Catalogue number



Vitassay Healthcare S.L.U. Parque Tecnológico Walqa
Ctra. N-330 Km. 566 • 22197 Huesca (Spain)
www.vitassay.com