

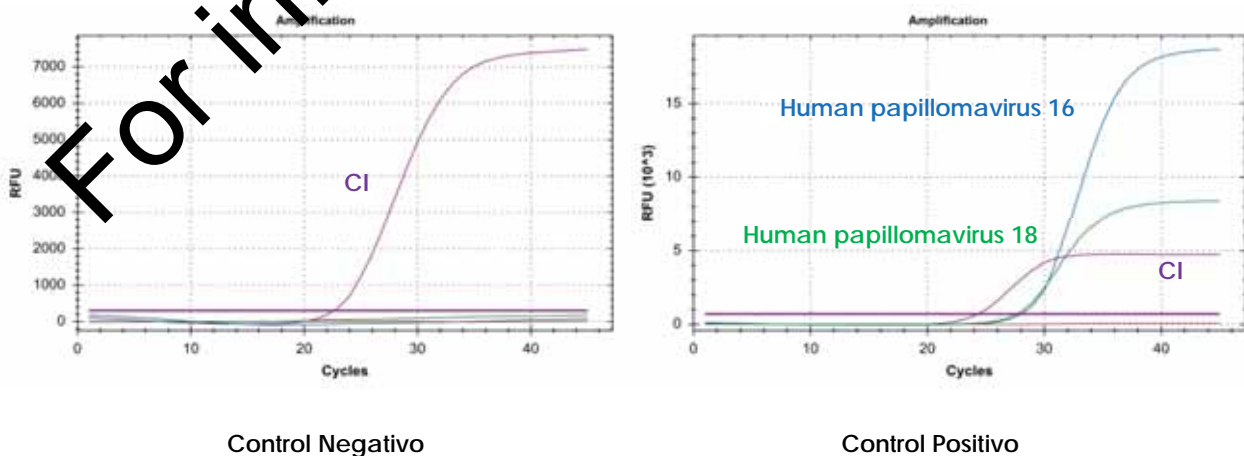
Virus del papiloma humano 16 (FAM)	Virus del papiloma humano 18 (HEX)	Control Interno (Cy5)	Control Negativo	Control Positivo	Interpretación
+	+	+/-	-	+	Virus del papiloma humano 16 y Virus del papiloma humano 18 Positivos
-	-	+	-	+	Virus del papiloma humano 16 y Virus del papiloma humano 18 Negativos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

Tabla 4. Interpretación
 +: curva de amplificación
 -: sin curva de amplificación

Una muestra se considera positiva, si el valor Ct obtenido es menor de 40 y el control interno muestra o no una gráfica de amplificación. En ocasiones, la detección del control interno no es necesaria, ya que la presencia de un alto número inicial de copias del ácido nucleico de una muestra puede causar una amplificación preferencial de esta última.

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

Figura 1. Ejemplo de gráficas de amplificación del control negativo y positivo. Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System.



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



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

10. Limitaciones del test

- El resultado de la prueba debe ser evaluado en el contexto del historial médico, los síntomas clínicos y otras pruebas de diagnóstico por un profesional de la salud.
- Aunque este ensayo puede usarse con otros tipos de muestras, se ha validado solo con DNA extraído de muestras en medio de transporte (por ejemplo, medio de transporte PreservCyt), citología en base líquida (células cervicales que se recogen y luego se suspenden en un medio conservante) y frotis endocervicales / vaginales.
- El correcto funcionamiento de la prueba depende de la calidad de la muestra; el ácido nucleico debe ser extraído de forma adecuada de las muestras clínicas. Una forma inadecuada de recolección, almacenaje y/o transporte de las muestras puede dar lugar a falsos negativos.
- Se puede detectar un bajo número de copias molde diana por debajo del límite de detección, pero los resultados pueden no ser reproducibles.
- Existe la posibilidad de falsos positivos debido a la contaminación cruzada con Virus del papiloma humano 16 y Virus del papiloma humano 18 ya sea por muestras que contienen altas concentraciones de DNA molde diana o por contaminación por arrastre a partir de productos de PCR de reacciones anteriores.

11. Control de calidad

VIASURE *Papilloma Virus 16 + 18* Real Time PCR Detection Kit contiene controles positivo y negativo que deben ser incluidos en cada ensayo para interpretar correctamente los resultados. Además, el control interno (CI) en cada pocillo confirma el correcto funcionamiento de la técnica.

12. Características del test

12.1. Sensibilidad y especificidad clínica

El test VIASURE *Papilloma Virus 16 + 18* Real Time PCR Detection Kit fue evaluado utilizando 102 muestras clínicas (citología líquida y frotis endocervicales/vaginales) de pacientes sintomáticos. Estos resultados se compararon con los obtenidos con un método de detección molecular ("CLART@HPV4" Genotipado de papilomavirus humano mediante identificación genómica para diagnóstico *in vitro* (Genómica) ó "Anyplex™ II HPV28 Detection" utilizando la tecnología DPO™ y el método de análisis de curva de *melting* de la tecnología TOCE™ (Seegene)).

Los resultados fueron los siguientes:



VIASURE <i>Papilloma Virus 16 + 18</i> Real Time PCR Detection Kit	"CLART®HPV4" (Genomica) + "Anyplex™ II HPV28 Detection" (Seegene)			
		+	-	Total
	+	47	0	47
	-	0	55	55
Total	47	55	102	

Tabla 5. Comparativa de resultados para Papilloma Virus 16.

VIASURE <i>Papilloma Virus 16 + 18</i> Real Time PCR Detection Kit	"CLART®HPV4" (Genomica) + "Anyplex™ II HPV28 Detection" (Seegene)			
		+	-	Total
	+	5	0	5
	-	0	97	97
Total	5	97	102	

Tabla 6. Comparativa de resultados para Papilloma Virus 18.

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

12.2. Sensibilidad analítica

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

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

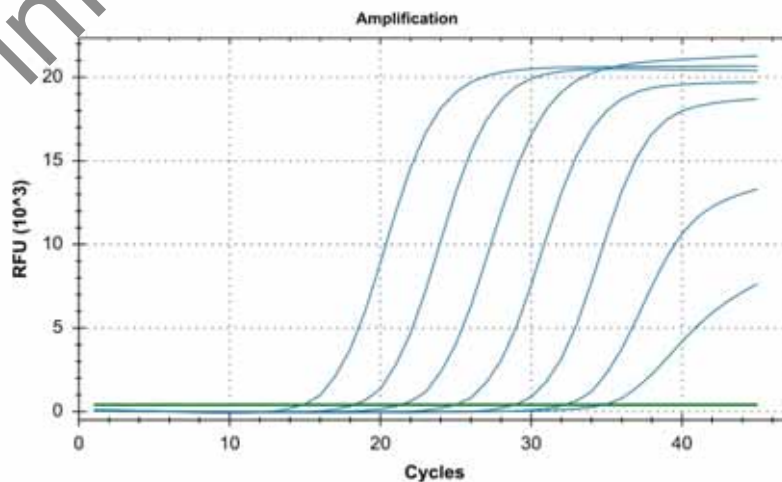
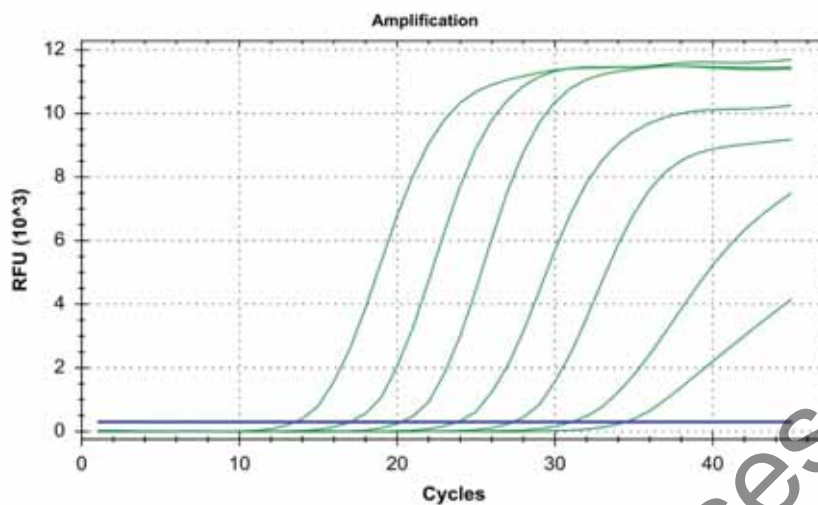


Figura 3. Diluciones seriadas de un estándar Virus del papiloma humano 18 (10^7 - 10^1 copias/reacción). Experimento realizado en el equipo Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (canal ROX).



12.3. Especificidad analítica

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



Prueba de reacción cruzada					
<i>Candida parapsilosis</i>	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	Human papillomavirus 18	-/+
<i>Candida tropicalis</i>	-	<i>Listeria innocua</i>	-	Human papillomavirus 6	-
<i>Candida glabrata</i>	-	<i>Mycoplasma genitalium</i>	-	Human papillomavirus 11	-
<i>Candida krusei</i>	-	<i>Mycoplasma hominis</i>	-	Human papillomavirus 31	-
<i>Candida dubliniensis</i>	-	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-	Human papillomavirus 33	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Neisseria meningitidis</i>	-	Human papillomavirus 39	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	<i>Proteus mirabilis</i>	-	Human papillomavirus 40	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Human papillomavirus 42	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	<i>Serratia marcescens</i>	-	Human papillomavirus 44	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> (LGV)	-	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	-	Human papillomavirus 45	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> (SW)	-	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	Human papillomavirus 51	-
<i>Chlamydia trachomatis</i> genovar F	-	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	Human papillomavirus 52	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	Human papillomavirus 53	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	<i>Treponema pallidum</i>	-	Human papillomavirus 54	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Trichomonas vaginalis</i>	-	Human papillomavirus 56	-
<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Ureaplasma parvum</i>	-	Human papillomavirus 58	-
<i>E. coli</i> O.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>	-				

Tabla 7. Patógenos de transmisión sexual y flora bacteriana utilizados en este estudio.

12.4. Reactividad analítica

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

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











13. Bibliography/Bibliografía

1. Y. Zhao *et al.* A novel multiplex real-time PCR assay for the detection and quantification of HPV16/18 and HSV1/2 in cervical cancer screening. *Molecular and Cellular Probes* 2012; 66-72.



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

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

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



ANEXO 1

COMPATIBILIDAD DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

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

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

Tabla A.2 TERMOCICLADORES CON BLOQUE DE PERFIL ALTO	
Fabricante	Modelo
Abbott	Abbottm2000 RealTime System
Applied Biosystems	7300 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7500 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	7900 HT Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7000 ⁽⁶⁾
Applied Biosystems	ABI PRISM 7700 ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 12K Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 6 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 7 Flex 96-well
Applied Biosystems	QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System ⁽⁵⁾
Applied Biosystems	QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System
Applied Biosystems	ViiATM™ 7 Real-Time PCR System
Analytik Jena Biometra	TOptical
Analytik Jena Biometra	qTOWER 2.0
BIONEER	Exicycler™ 96
Bio-Rad	CFX96 Touch™ Deep Well Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	iCycler iQ™5 Real-Time PCR Detection System
Bio-Rad	MyiQ™ Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Bio-Rad	MyiQ™2 Real-Time PCR Detection System ⁽⁶⁾
Cepheid	SmartCycler® ⁽³⁾
DNA-Technology	DTprime Real-time Detection Thermal Cycler ⁽²⁾
DNA-Technology	DTlite Real-Time PCR System ⁽²⁾
Eppendorf	Mastercycler™ep realplex
Qiagen	Rotor-Gene® Q ⁽³⁾
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3000P™ Real Time PCR System
Stratagene / Agilent Technologies	Mx3005P™ Real Time PCR System
VIASURE	VIASURE 48 Real Time PCR System ⁽²⁾
VIASURE	VIASURE 96 Real Time PCR System ⁽²⁾

(1) Seleccionar Ramp Speed "Standard".

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

(3) El producto se debe reconstituir siguiendo el procedimiento adecuado (ver Procedimiento del test, sección 8.3) y transvasar a los tubos específicos diseñados para emplearse con los instrumentos Rotor-Gene® Q o SmartCycler®.

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

(5) No lectura en canal Cy5.

(6) Lectura solo en canales FAM y HEX.

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



ANEXO 2

CANALES DE DETECCIÓN DE LOS EQUIPOS A TIEMPO REAL MÁS COMUNES

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

TERMOCICLADORES A TIEMPO REAL	CANAL VIASURE	CANAL DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Bio-Rad CFX96™	FAM	FAM	
	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	Durante la configuración de los canales (Channel Setup), presione el botón "Gain Optimisation" y después vaya a "Optimise Acquiring". La fluorescencia del apartado Target Sample Range tiene que estar entre 5 y 10 FI para cada canal. Además, marque la opción "Perform Optimisation Before 1st Acquisition".
	HEX	Yellow	
	ROX	Orange	
	Cy5	Red	
Exicycler™ 96 BIONEER	FAM	FAM	
	HEX	JOE	
	ROX	ROX	
	Cy5	Cy5	

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



ANEXO 3

CONFIGURACIÓN DE LOS VALORES DE EXPOSICIÓN

Los parámetros de exposición de algunos termocicladores deben ajustarse para su adecuación y correcto funcionamiento con los test "VIASURE Real Time PCR Detection Kits". Establecer los valores de exposición de la siguiente manera:

- DTprime Real-time Detection Thermal Cycler (DNA-Technology) y VIASURE 96 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -150, canal HEX - 3000, canal ROX - 2000 y canal Cy5 -1500.
- DTlite Real-Time PCR System (DNA-Technology) y VIASURE 48 Real Time PCR System (CerTest Biotec S.L.): canal FAM -150, canal HEX - 500, canal ROX - 500 y canal Cy5 - 100.

For information purposes only



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

For information purposes only



For information purposes only



CerTest Biotec, S.L.

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



VIASURE online

F-362 rev00

VIASURE



Real Time PCR Detection Kits

CerTest
BIOTEC