



HPV Alto Risco PCR

Instrução de uso
Instrucciones de uso
Usage instructions

REF K169

Revisão: Julho/2017

ÍNDICE

Finalidade	3
Princípio de Ação	3
Apresentação	3
Reagentes	4
Equipamentos e Insumos Operacionais.....	4
Condições de Armazenamento e Transporte	4
Cuidados Especiais	5
Amostras	6
Procedimento	6
A. Extração do DNA	6
B . Preparo dos Reagentes	6
C . Diluição do Padrão Quantitativo	7
D . Preparo da PCR	7
E . Definições do Termociclador para a PCR em Tempo Real	8
F . Validação do Resultado	9
G . Interpretação do Resultado	10
Limitações do Processo	11
Desempenho do Produto / Controle de Qualidade	11
Comparação de Métodos e Especificidade Metodológica	11
Repetibilidade	12
Reprodutibilidade	12
Sensibilidade Clínica	12
Sensibilidade Analítica	12
Significado Diagnóstico	13
Referências Bibliográficas	13
Atendimento ao Consumidor	13
Simbologia Universal	14

FINALIDADE

Teste para detecção quantitativa do DNA do *Papilomavírus humano*, genótipo 16 (HPV16) através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

O kit **Bio Gene HPV Alto Risco PCR** é um ensaio *in vitro* baseado na detecção quantitativa do DNA do HPV16 através da PCR em tempo real. O método de PCR em Tempo Real é usado para amplificar o DNA patógeno. Um termociclador de PCR em Tempo Real é usado para amplificar e detectar a sonda fluorescente. O software do aparelho calcula a concentração do HPV16, expressa em cópias/ μ L, utilizando a curva padrão gerada a partir do padrão quantitativo contido no kit.

Reagente	Apresentação	
	50 Testes	150 Testes
R1	1 x 55 μ L *	1 x 165 μ L *
R2	1 x 525 μ L *	3 x 525 μ L *
R3	1 x 525 μ L	3 x 525 μ L
R4	1 x 55 μ L *	1 x 165 μ L *
R5	1 x 600 μ L *	1 x 600 μ L *
R6	1 x 50 μ L	1 x 150 μ L
R7	1 x 500 μ L *	1 x 500 μ L *
R8	2 x 1,5 mL	2 x 1,5 mL
R9	1 x 1 mL	1 x 2 mL

*Reagentes liofilizados. Os volumes descritos acima correspondem ao volume final após a ressuspensão dos reagentes, conforme descrito no item PROCEDIMENTO, subitem B. (Preparo dos Reagentes).

REAGENTES

- R1. Solução PCR:** Primer, Sonda, TRIS-HCl.
R2. Mix Taq: Polimerase, dNTPs, $MgCl_2$.
R3. Tampão Mix: TRIS-HCl.
R4. Solução PCR Cl: Primer, Sonda, TRIS-HCl.
R5. Controle Interno: Plasmídeo, TRIS-HCl.
R6. Controle Negativo: TRIS-HCl.
R7. Padrão A (2×10^5 cópias/ μL): Plasmídeo, TRIS-HCl, EDTA.
R8. Diluente: TRIS-HCl, EDTA.
R9. Água: Água livre de DNase/RNase.

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS**Materiais contidos no kit:**

- Reagentes descritos no quadro anterior.
- Instrução de uso (manual).

Materiais necessários, mas não contidos no kit:

- 1- Sistema ótico programável de detecção de fluorescência (Termociclador de PCR em Tempo Real).
- 2- Capela de fluxo laminar.
- 3- Tubos de centrifuga de 1,5 mL.
- 4- Tubos ou placas para reação de PCR.
- 5- Luvas de látex descartáveis livres de pó ou material similar.
- 6- Microcentrifuga (3.000 - 12.000 rpm).
- 7- Vórtex.
- 8- Micropipetas e ponteiros estéreis com filtro (0,5-10 μL , 10-100 μL , 100-1000 μL).
- 9- Kit para extração de ácidos nucléicos.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento é de -20°C (-10 a -30°C).

Após a ressuspensão dos reagentes liofilizados, o produto é estável por 6 meses a partir da data de ressuspensão. Deve-se evitar o congelamento e descongelamento.

O transporte pode ser feito em temperaturas entre 2 e 30°C por 7 dias. Manter ao abrigo da luz e evitar umidade.

CUIDADOS ESPECIAIS

1- Somente para uso diagnóstico *in vitro* profissional.

2- Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos.

3- Manusear e descartar todas as amostras biológicas, reagentes e materiais utilizados para realização do ensaio como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Evitar contato direto com as amostras biológicas e os reagentes. Evitar derrames ou aerossol. Os resíduos devem ser manuseados e descartados de acordo com as medidas de segurança adequadas.

4- Procedimentos de biologia molecular, tais como a extração de ácidos nucleicos, transcrição reversa, amplificação e detecção requerem pessoal qualificado para evitar o risco de resultados errados, especialmente devido à degradação de ácidos nucleicos contidos nas amostras ou contaminação da amostra por produtos de amplificação.

5- É necessário dispor de áreas separadas para a extração/preparação de reações e para a amplificação/detecção de produtos. Nunca introduzir um produto de amplificação na área destinada para a extração ou preparação de produtos de amplificação.

6- Todas as amostras e reagentes devem ser manipulados sob uma capela de fluxo laminar. As pipetas devem ser usadas com ponteiros com filtro. As ponteiros empregadas devem ser estéreis, livres de DNases e RNases.

7- Evitar o congelamento e descongelamento repetido dos reagentes.

8- Armazenar as amostras de DNA a -20°C, caso não forem utilizadas imediatamente.

9- Não usar o kit após a data de validade.

10- Recomendamos aplicar as normas locais, estaduais e federais de proteção ambiental para que o descarte dos reagentes e do material biológico seja feito de acordo com a legislação vigente.

11- Para obtenção de informações relacionadas à biossegurança ou em caso de acidentes com o produto, consultar as FISPQ (Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos) disponibilizadas no site www.bioclin.com.br ou através de solicitação pelo SAC (Serviço de Assessoria ao Cliente) da Quibasa.

12- Não utilizar o produto em caso de danos na embalagem.

13- É imprescindível que os instrumentos e equipamentos utilizados estejam devidamente calibrados e submetidos às manutenções periódicas.

AMOSTRAS

Este kit deve ser utilizado com amostras de DNA extraídas de swab cervical ou uretral. Outros tipos de amostras podem ser utilizados de acordo com recomendações médicas ou do próprio laboratório.

As amostras devem ser coletadas de acordo com as recomendações do laboratório para testes moleculares. Devem ser transportadas e armazenadas conforme entre 2 e 8°C por 3 dias¹.

Utilizar amostras de DNA adequadas à amplificação por PCR com pureza e concentração adequadas. Deve-se evitar o congelamento e descongelamento repetido.

PROCEDIMENTO

A. Extração do DNA

Os ácidos nucleicos (DNA) das amostras devem ser extraídos seguindo as instruções de uso do kit escolhido. Para o controle do processo de extração, o **Controle Interno (R5)** deve ser preparado (vide item B,3) e adicionado às amostras durante a extração, conforme descrito abaixo:

- 1- Adicionar 4µL do **Controle Interno (R5)** a cada tubo contendo as amostras já ressuspendidas em tampão de extração / lise.
- 2- Completar o processo de extração de acordo com as instruções de uso do kit de extração.

OBS: Nunca adicionar o Controle Interno diretamente à amostra biológica pura, pois pode resultar em degradação do mesmo.

B. Preparo dos Reagentes

1- Centrifugar (pulso *spin*) os reagentes: **Solução PCR (R1)**, **Solução PCR CI (R4)**, **Controle Interno (R5)** e **Padrão A (R7)** antes da abertura dos microtubos.

2- Ressuspender cada frasco do reagente **Mix Taq (R2)*** com 525µL do reagente **Tampão Mix (R3)**.

*Para a apresentação de 150 testes ressuspender os frascos de **Mix Taq (R2)** conforme necessidade de uso.

*O **Mix Taq (R2)** não contém fluoróforo de referência passiva (ROX).

3- Ressuspender os reagentes, **Solução PCR (R1)**, **Solução PCR CI (R4)** e **Controle Interno (R5)** com o reagente **Água (R9)** de acordo com a tabela abaixo:

Reagentes	Apresentação	
	50 Testes	150 Testes
Solução PCR (R1)	55 µL	165 µL
Solução PCR CI (R4)	55 µL	165 µL
*Controle Interno (R5)	600 µL	600 µL

*Os reagentes R5 e R7 contêm molde de RNA/DNA. Eles devem ser manipulados (ressuspendidos) em área apropriada para evitar a contaminação dos demais reagentes.

C. Diluição do Padrão Quantitativo

- 1- Ressuspender o **Padrão A (R7)** com 500µL do **Diluyente (R8)**.
- 2- Separar 3 microtubos (não fornecido no kit) adequados para a diluição seriada do **Padrão A (R7)**.
- 3- Pipetar 90µL do **Diluyente (R8)** em cada microtubo e nomeá-los como B, C e D respectivamente.
- 4- Em seguida, pipetar 10µL do **Padrão A (R7)** no microtubo B e homogeneizar.
- 5- Trocar a ponteira e pipetar 10µL do microtubo B no microtubo C e homogeneizar.
- 6- Trocar a ponteira e pipetar 10µL do microtubo C no microtubo D e homogeneizar.
- 7- No final da diluição temos padrão A, B, C e D com as seguintes concentrações:

Padrão A - 2×10^5 cópias/µL

Padrão B - 2×10^4 cópias/µL

Padrão C - 2×10^3 cópias/µL

Padrão D - 2×10^2 cópias/µL

D. Preparo da PCR

- 1- Separar previamente os microtubos/poços a serem utilizados, de acordo com o número de amostras, controles e padrões quantitativos a serem analisados.
- 2- Preparar o volume da solução de PCR final de acordo com o número de reações a ser realizadas.

Reagentes	1 Reação	25 Reações	50 Reações	100 Reações
Mix Taq (R2)	10 µL	250 µL	500 µL	1 mL
Solução PCR (R1)	1 µL	25 µL	50 µL	100 µL
Solução PCR CI (R4)	1 µL	25 µL	50 µL	100 µL
Água (R9)	3 µL	75 µL	150 µL	300 µL

Para o preparo de número de reação diferente deve se multiplicar o volume dos reagentes para 1 reação pelo número de reações necessárias.

3- Pipetar 15µL da solução de PCR final nos tubos ou poços determinados para as reações.

4- Adicionar 5µL do DNA extraído das amostras ou 5µL dos Padrões Quantitativos ou 5µL do **Controle Negativo (R6)** nos tubos previamente determinados.

5- Homogeneizar bem.

6- Observar que o volume total da reação é de 20µL, e cada corrida de PCR deve incluir os controles relevantes (Controle Negativo, Controle Interno e Padrões Quantitativos).

7- Transportar os tubos/placa para o termociclador e seguir o descrito na seção E (Definições do Termociclador para a PCR em Tempo Real).

E. Definições do Termociclador para a PCR em Tempo Real

Verificar o manual de operação do equipamento de PCR em tempo real para a programação do experimento.

1- Defina o tipo de experimento:

Teste Quantitativo com Curva Padrão.

2- Defina os detectores (sondas) fluorescentes como:

	Detector	Quencher
HPV16	FAM	NFQ-MGB
Controle Interno	VIC	

Obs: O Controle Negativo e os Padrões Quantitativos não apresentam o Controle Interno, pois o mesmo é utilizado para o controle da extração e da amplificação das amostras.

3- Defina os Padrões Quantitativos (Standards) como:

Padrão A – 2×10^5 cópias/ μ L

Padrão B – 2×10^4 cópias/ μ L

Padrão C – 2×10^3 cópias/ μ L

Padrão D – 2×10^2 cópias/ μ L

4- Defina as condições dos ciclos:

	Temperatura	Tempo	Ciclos
1	95°C	2 minutos	1
2	95°C	10 segundos	50
	60°C	60 segundos	

Defina “Data Collection” como “stage 2, step 2 (60@0:60)”.

F. Validação do Resultado

1- Curva Padrão

Curva Padrão	Faixa Permitida	Amplificação / Detecção
Coeficiente de correlação (R^2)	$0,99 \leq R^2 \leq 1,00$	Válida

Se o valor de R^2 não ficar entre os limites da faixa permitida, o resultado é considerado inválido e o teste deve ser repetido.

2- Controle Negativo

CT Controle Negativo		Resultado	Amplificação/ Detecção
FAM	VIC		
Indeterminado	Indeterminado	Negativo	Válida

3- Amostras

HPV16		Resultado	Detecção
FAM	VIC		
Concentração determinada	$25 \leq CT \leq 31$	Positivo	Válida
	$CT < 25$ ou $CT > 31$	Positivo	Inválido*
Concentração indeterminada	$25 \leq CT \leq 31$	Negativo	Válida
	$CT < 25$ ou $CT > 31$	Negativo	Inválido*

*Os valores de CT do Controle Interno variam de acordo com as condições do processo, como a eficiência da extração do DNA/RNA, a concentração das amostras e as configurações do termociclador. Logo, estas condições devem ser avaliadas quando os valores de CT não forem adequados e, se pertinente, os resultados podem ser validados.

Exemplo: Amostras com alto número de cópias de DNA/RNA podem, em alguns casos, inibir a amplificação do Controle Interno resultando em valor de CT fora da faixa ideal, este resultado não invalida o teste.

Se os requisitos acima não forem cumpridos, o ensaio é considerado inválido e o teste deve ser repetido.

G. Interpretação do Resultado

O kit é capaz de detectar de 10 a 1.000.000 de cópias por reação. O software do termociclador calcula automaticamente a concentração das amostras.

Exemplo: Se o programa mostrar uma concentração como 2.00E+005, então a concentração da amostra será 2.0×10^5 cópias/ μ L.

Resultado da Amostra em Cópias/ μ L (FAM)	Cópias por Reação
$\geq 1 \times 10^6$	> 1.000.000
$2 \leq \text{Quantidade} \leq 9 \times 10^5$	Quantidade obtida
< 2	< 10

A não detecção do DNA do patógeno não exclui a presença de infecção quando o título do patógeno estiver abaixo do limite de detecção deste kit. Os resultados fornecidos por este kit devem ser interpretados pelo profissional médico responsável, não sendo o único critério para a determinação do diagnóstico e/ou tratamento do paciente.

Os resultados obtidos devem ser avaliados considerando os dados clínicos e os exames laboratoriais do paciente.

LIMITAÇÕES DO PROCESSO

Contaminações cruzadas que ocorrem durante a coleta da amostra, processamento, transporte e armazenamento poderão ocasionar resultados falsos.

DESEMPENHO DO PRODUTO CONTROLE DE QUALIDADE

Exatidão

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS E ESPECIFICIDADE METODOLÓGICA

O kit **Bio Gene HPV Alto Risco PCR** foi comparado com outro kit para a quantificação do DNA do HPV16. Foram realizadas 25 análises e os resultados foram avaliados. Os resultados obtidos, entre os kits avaliados, apresentaram variações inferiores a 0,5 Log. Com estes resultados pode-se concluir que o kit apresenta boa especificidade metodológica.

Precisão**REPETIBILIDADE**

Foram realizadas 10 dosagens sucessivas de 2 amostras positivas com concentrações distintas, os resultados estão mostrados na tabela abaixo:

	Amostra 1	Amostra 2
Concentração Média (Log)	2,063	4,292
Desvio Padrão (Log)	0,079	0,070
Coeficiente de Variação (%)	3,849	1,642

REPRODUTIBILIDADE

Foram realizadas 10 dosagens durante 3 dias consecutivos com 1 amostra, obtendo-se os seguintes resultados:

	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Concentração Média (Log)	4,292	4,346	4,367
Desvio Padrão (Log)	0,070	0,106	0,118
Coeficiente de Variação (%)	1,642	2,449	2,704

Sensibilidade Clínica

O kit **Bio Gene HPV Alto Risco PCR** apresentou sensibilidade clínica de 99,9% e especificidade clínica de 99,9%.

Método		Dados Clínicos		Total
Bio Gene HPV Alto Risco PCR	Resultado	Positivo	Negativo	
	Positivo	25	0	25
	Negativo	0	25	25
RESULTADO TOTAL		25	25	50

Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica encontrada nos estudos de performance foi 0,23 log, ou seja, a técnica foi capaz de detectar aproximadamente 8 moléculas alvo em 5µL do produto de extração do DNA adicionado a reação de amplificação.

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

O *Papilomavírus humano*, pertencente à família *Papillomaviridae*, infecta células do tecido de revestimento (pele e mucosa) causando lesões, as quais são consequência do crescimento irregular das células. Existem mais de 150 subtipos diferentes de HPV, dentre os quais, 35 aproximadamente infectam a região anogenital feminina e masculina podendo causar desde verrugas até lesões displásicas de baixo e alto grau. A transmissão do HPV ocorre por contato direto da área infectada, no caso de HPVs genitais pelo contato sexual. Os tipos de HPV podem ser classificados em vírus de baixo, intermediário ou alto risco, de acordo com o tipo de lesão causada. Os HPVs genótipos 16, 18, 31, 33, 45, 52, 56, 58 são classificados como vírus de alto risco, já que podem estar relacionados a tumores. Portanto, a detecção precoce destes vírus é importante para prevenir o desenvolvimento de lesões malignas associadas ao HPV 16. Logo, a detecção quantitativa dos HPVs por PCR em tempo real tem grande importância por ser um método sensível, preciso e ágil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Collection, transport, preparation and storage of specimens for molecular methods; approved guideline. CLSI document MM13-A. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
2. Schmitz, M; Scheungraber, C; Herrmann, J. et al. Quantitative multiplex PCR assay for the detection of the seven clinically most relevant highrisk HPV types. J Clin Virol. 2009 Apr;44(4):302-7. Epub 2009 Feb 14. PubMed PMID: 19223232.
3. Seaman, W.T; Andrews, E; Couch, M. Detection and quantitation of HPV in genital and oral tissues and fluids by real time PCR. Virol J. 2010 Aug 19; 7:194.
4. Seth, R; Rippin, J; Guo, L; Jenkins, D. Detection and quantitation of HPV gene expression using real-time PCR. Methods Mol Med. 2005; 119:61-72.

ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Serviço de Assessoria ao Cliente

Tel.: 0800 031 5454

E-mail: sac@bioclin.com.br

Número de registro do kit Bio Gene HPV Alto Risco PCR na ANVISA: 10269360244

SIMBOLOGIA UNIVERSAL



NÚMERO DE CATÁLOGO



NÚMERO DO LOTE



DATA DE FABRICAÇÃO

DATA DE VALIDADE
(último dia do mês)LIMITE DE TEMPERATURA
(conservar a)O CONTEÚDO É SUFICIENTE
PARA <N> TESTESCONSULTAR INSTRUÇÕES
DE USOPRODUTO PARA
DIAGNOSTICO IN VITROREPRESENTANTE
EUROPEU AUTORIZADOPROTEGER DA
LUZ E CALOR

FABRICADO POR



CONTROLE



CONTROLE POSITIVO



CONTROLE NEGATIVO



RISCO BIOLÓGICO



INFLÁMVEL



CORROSIVO



TÓXICO



MARCA CE

NÃO UTILIZAR SE A
EMBALAGEM ESTIVER
DANIFICADA



HPV Alto Risco PCR

Español . *Instrucciones de uso*

REF K169

Revisión: Julio/2017

ÍNDICE

Finalidad	3
Principio de Acción	3
Presentación	3
Reactivos	4
Equipamientos e Insumos Operacionales	4
Condiciones de Almacenamiento y Transporte	4
Cuidados Especiales	4
Muestras	6
Procedimiento	6
A . Extracción de DNA	6
B . Preparo de los Reactivos	6
C . Dilución de lo Patrón Cuantitativo	7
D . Preparo de la PCR	8
E . Definciones del Termociclador para la PCR en Tiempo Real	8
F . Validación de lo Resultado	9
G . Interpretación de lo Resultado	10
Limitaciones de Proceso	11
Desempeño del Producto / Control de Calidad	11
Comparación de Métodos y Especificidad Metodológica	11
Repetibilidad	12
Reproductibilidad	12
Sensibilidad Clínica	12
Sensibilidad Analítica	13
Significado Diagnóstico	13
Referencias Bibliográficas	13
Asistencia al Consumidor	13
Simbología Universal	14

FINALIDAD

Test para detección cuantitativa del DNA de *Papilomavirus humano*, genotipo 16 (HPV16) a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. Solamente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCIPIO DE ACCIÓN

El kit **Bio Gene HPV Alto Risco PCR** es un ensayo *in vitro* basado en la detección cuantitativa del DNA de HPV16 a través de la PCR en tiempo real.

El método de PCR en Tiempo Real es usado para amplificar el DNA del patógeno.

Un termociclador de PCR en Tiempo Real es usado para amplificar y detectar la sonda fluorescente. El software del aparato calcula la concentración del DNA de HPV16, expresa en copias/μL, utilizando la curva patrón generada a partir de lo patrón cuantitativo contenido en el kit.

Reactivo	Presentación	
	50 Pruebas	150 Pruebas
R1	1 x 55 μL*	1 x 165 μL*
R2	1 x 525 μL*	3 x 525 μL*
R3	1 x 525 μL	3 x 525 μL
R4	1 x 55 μL*	1 x 165 μL*
R5	1 x 600 μL*	1 x 600 μL*
R6	1 x 50 μL	1 x 150 μL
R7	1 x 500 μL*	1 x 500 μL*
R8	2 x 1,5 mL	2 x 1,5 mL
R9	1 x 1 mL	1 x 2 mL

*Reactivos liofilizados. Los volúmenes arriba descritos corresponden el volumen final después de la resuspensión de los reactivos como se describe en el ítem PROCEDIMIENTO, subítem B (Preparación de los Reactivos).

REACTIVOS

R1. Solución PCR: Primer, Sonda, TRIS-HCl.

R2. Mix Taq: Polimerasa, dNTPs, $MgCl_2$.

R3. Tapón Mix: TRIS-HCl.

R4. Solución PCR Cl: Primer, Sonda, TRIS-HCl.

R5. Control Interno: Plásmido, TRIS-HCl.

R6. Control Negativo: TRIS-HCl.

R7. Patrón A (2×10^5 copias/ μL): Plásmido, TRIS-HCl, EDTA.

R8. Diluyente: TRIS-HCl, EDTA.

R9. Agua: Agua libre de DNase/RNase.

EQUIPAMIENTOS E INSUMOS OPERACIONALES**Materiales contenidos en el kit:**

- Reactivos descritos en el cuadro anterior.
- Instrucción de uso (manual).

Materiales necesarios, pero no contenidos en el kit:

- 1- Sistema óptico programable de detección de fluorescencia (Termociclador de PCR en Tiempo Real).
- 2- Cámara del flujo laminar.
- 3- Tubos de microcentrífuga 1,5mL.
- 4- Tubos o placa para reacción de PCR.
- 5- Guantes de látex desechables libres de polvo o material similar.
- 6- Microcentrífuga (3.000 - 12.000 rpm).
- 7- Vórtice.
- 8- Micropipetas y punteras esterilizadas con filtro (0,5-10 μL , 10- 100 μL , 100-1000 μL).
- 9- Kit para extracción de ácidos nucleicos.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

La temperatura de almacenamiento es de -20°C (-10 a -30°C).

Después de resuspensión de los reactivos liofilizados, el producto es estable por 6 meses a partir de la fecha de resuspensión. Se debe evitar el congelamiento y descongelamiento.

El transporte puede realizarse a temperaturas entre 2 y 30°C por 7 días. Mantener al abrigo de la luz y evitar humedad.

CUIDADOS ESPECIALES

- 1- Solamente para el uso diagnóstico *in vitro* profesional.

- 2-** Seguir con rigor la metodología propuesta para la obtención de resultados exactos.
- 3-** Manipular y desechar todas las muestras biológicas, reactivos y materiales utilizados para la realización del ensayo como si fueran capaces de transmitir agentes infecciosos. Evitar contacto directo con las muestras biológicas y los reactivos. Evitar derrames o aerosol. Los residuos deben ser manipulados y desechados de acuerdo con las medidas de seguridad adecuadas.
- 4-** Procedimientos de biología molecular, tales como la extracción de ácidos nucleicos, transcripción inversa, amplificación y detección requieren personal calificado para evitar el riesgo de resultados errados, especialmente debido a la degradación de ácidos nucleicos contenidos en las muestras o contaminación de la muestra por productos de amplificación.
- 5-** Es necesario disponer de áreas separadas para la extracción/preparación de reacciones y para la amplificación/detección de productos. Nunca introducir un producto de amplificación en el área destinada para la extracción o preparación de productos de amplificación.
- 6-** Todas las muestras y reactivos deben ser manipulados debajo de una Cámara de flujo laminar. Las pipetas deben ser usadas con punteras con filtro. Las punteras empleados deben ser estériles, libres de DNases y RNases.
- 7-** Evitar el congelamiento y descongelamiento repetido de los reactivos.
- 8-** Almacenar las muestras de DNA a -20°C, caso no fueran utilizadas inmediatamente.
- 9-** No usar el kit después de la fecha de vencimiento.
- 10-** Se recomienda la aplicación de la ley local, estatal y federal de protección ambiental para la eliminación de reactivos y material biológico se hace de acuerdo con la legislación vigente.
- 11-** Para obtener información relacionada con la seguridad biológica o en caso de accidentes con el producto, consultar la FISPQ (Ficha de Informaciones de la Seguridad de Productos Químicos) disponibles en el site www.bioclin.com.br o solicitando a través del SAC (Servicio de Asesoría al Cliente) de Quibasa.
- 12-** No utilice el producto en caso de daños en su embalaje.
- 13-** Es esencial que los instrumentos y equipos utilizados estén adecuadamente calibrados y sometidos a mantenimientos periódicos.

MUESTRAS

Este kit puede ser utilizado con muestras de DNA extraídas de hisopos cervicales y uretrales. Otros tipos de muestras pueden ser utilizadas de acuerdo con las recomendaciones de médico del laboratorio.

Las muestras deben ser colectadas de acuerdo con las recomendaciones del laboratorio para pruebas moleculares. Deben ser transportados y almacenados entre 2 y 8 ° C durante 3 días¹.

Utilizar muestras de DNA adecuadas a la amplificación por PCR con pureza y concentración adecuadas. Se debe evitar el congelamiento y descongelamiento repetido.

PROCEDIMIENTO

A. Extracción de DNA

Los ácidos nucleicos (DNA) de las muestras deben ser extraídos siguiendo las instrucciones de uso del kit escogido. Para controlar el proceso de extracción, el **Control Interno (R5)** debe ser preparado (ver punto B,3) y añadido a las muestras durante la extracción, como se describe a abajo:

- 1- Adicionar 4µL del **Control Interno (R5)** a cada tubo conteniendo las muestras ya resuspendidas en tapón de extracción/lisis.
- 2- Completar el proceso de extracción de acuerdo con las instrucciones de uso del kit de extracción.

Obs: Nunca adicionar el Control Interno directamente a la muestra biológica pura, pues puede resultar en degradación del mismo.

B. Preparación de los Reactivos

- 1- Centrifugar (pulso *spin*) los reactivos: **Solución PCR (R1)**, **Solución PCR CI (R4)**, **Control Interno (R5)** y **Patrón A (R7)** antes de la abertura de los microtubos.
- 2- Resuspender cada botella de lo reactivo **Mix Taq (R2)*** con 525µL del reactivo **Tapón Mix (R3)**.

*Para La presentación con 150 pruebas resuspender las botellas de lo reactivo **Mix Taq (R2)** cuando sea necesario utilizar.

*El reactivo **Mix Taq (R2)** no contiene fluoróforo de referencia pasiva (ROX).

3- Resuspender los reactivos, **Solución PCR (R1)**, **Solución PCR CI (R4)** y **Control Interno (R5)** con el reactivo **Agua (R9)** de acuerdo con la tabla abajo:

Reactivos	Presentación	
	50 Pruebas	150 Pruebas
Solución PCR (R1)	55 µL	165 µL
Solución PCR CI (R4)	55 µL	165 µL
*Control Interno (R5)	600 µL	600 µL

*Los reactivos R5 y R7 contienen molde de RNA/DNA. Ellos deben ser manipulados (resuspender) en área apropiada para evitar la contaminación de los demás reactivos.

C. Dilución de lo Patrón Cuantitativo

- 1- Resuspender el **Patrón A (R7)** con 500µL del **Diluyente (R8)**.
- 2- Separar 3 microtubos (no fornecido en el kit) adecuados para la dilución seriada del **Patrón A (R7)**.
- 3- Pipetear 90µL del **Diluyente (R8)** en cada microtubo y nombrarlos como B, C y D respectivamente.
- 4- En seguida, pipetear 10µL del **Patrón A (R7)** en el microtubo B y homogenizar.
- 5- Cambiar la puntera y pipetear 10µL del microtubo B en el microtubo C y homogenizar.
- 6- Cambiar la puntera y pipetear 10µL del microtubo C en el microtubo D y homogenizar.
- 7- Al final de la dilución tenemos patrones A, B, C y D con las siguientes concentraciones:

Patrón A – 2×10^5 copias/µL
Patrón B – 2×10^4 copias/µL
Patrón C – 2×10^3 copias/µL
Patrón D – 2×10^2 copias/µL

D. Preparación de la PCR

- 1- Separar previamente los microtubos/pozos a ser utilizados, de acuerdo con el número de muestras, controles y patrones cuantitativos a ser analizados.
- 2- Preparar el volumen de la solución de PCR final de acuerdo con el número de reacciones que se debe realizar.

Reactivos	1 Reacción	25 Reacciones	50 Reacciones	100 Reacciones
Mix Taq (R2)	10 µL	250 µL	500 µL	1 mL
Solución PCR (R1)	1 µL	25 µL	50 µL	100 µL
Solución PCR CI (R4)	1 µL	25 µL	50 µL	100 µL
Agua (R9)	3 µL	75 µL	150 µL	300 µL

Para la preparación de un número diferente de reacción se debe multiplicar el volumen de cada reactivo para una reacción por el número de reacciones requeridas.

- 3- Pipetear 15µL de la solución de PCR final en los microtubos/pozos a ser utilizados.
- 4- Adicionar 5µL del DNA extraído de la muestra o 5µL de los Patrones Cuantitativos o 5µL de lo **Control Negativo (R6)** en los tubos predeterminados.
- 5- Homogenizar bien.
- 6- Observar que el volumen total de la reacción es de 20µL, y cada corrida de PCR debe incluir los controles relevantes (Control Negativo, Control Interno y Patrones Cuantitativos).
- 7- Transportar los tubos/placa para el termociclador y seguir lo descrito en la sección E (Definiciones del Termociclador para la PCR en Tiempo Real).

E. Definiciones del Termociclador para la PCR en Tiempo Real

Verificar el manual de operaciones del equipamiento de PCR en tiempo real para la programación de lo experimento.

1- Defina el tipo del experimento:

Pruebas Cuantitativas con Curva Patrón.

2- Defina los detectores (sondas) fluorescentes como:

	Detector	Quencher
HPV16	FAM	NFQ-MGB
Control Interno	VIC	

Obs: El Control Negativo y los Patrones Cuantitativos no presentan el Control Interno, pues el mismo es utilizado para control de extracción y amplificación de las muestras.

3- Defina los Patrones Cuantitativos (Standards) como:

Patrón A – 2×10^5 copias/ μ L

Patrón B – 2×10^4 copias/ μ L

Patrón C – 2×10^3 copias/ μ L

Patrón D – 2×10^2 copias/ μ L

4- Defina las condiciones de los ciclos:

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	95°C	2 minutos	1
2	95°C	10 segundos	50
	60°C	60 segundos	

Defina “Data Collection” como “stage 2, step 2 (60@0:60)”.

F. Validación de lo Resultado**1- Curva Patrón**

Curva Patrón	Rango Permitido	Amplificación / Detección
Coeficiente de correlación (R^2)	$0,99 \leq R^2 \leq 1,00$	Válida

Si el valor de R^2 no queda entre los límites del rango permitido, el resultado es considerado inválido y la prueba debe ser repetida.

2- Control Negativo

CT Control Negativo		Resultado	Amplificación/ Detección
FAM	VIC		
Indeterminado	Indeterminado	Negativo	Válida

3- Muestras

HPV16		Resultado	Detección
FAM	VIC		
Concentración determinada	$25 \leq CT \leq 31$	Positivo	Válida
	$CT < 25$ ou $CT > 31$	Positivo	Inválido*
Concentración indeterminada	$25 \leq CT \leq 31$	Negativo	Válida
	$CT < 25$ ou $CT > 31$	Negativo	Inválido*

*El valor de CT de Control Interno varía con las condiciones del proceso, tales como la eficiencia de la extracción de DNA/RNA, la concentración de las muestras y los ajustes del termociclador. Por lo tanto, estas condiciones deben ser evaluadas cuando los valores de CT no son apropiados y los resultados relevantes se pueden validar.

Ejemplo: Las muestras con un alto número de copias de DNA/RNA pueden, en algunos casos, inhibir la amplificación del Control Interno resultante en el valor de CT fuera del rango óptimo, este resultado no invalida el test.

Si los requisitos mencionados no fueran cumplidos, el ensayo es considerado inválido y el test debe ser repetido.

G. Interpretación de lo Resultado

El kit es capaz de detectar 10 a 1.000.000 copias por reacción.

El software del aparato calcula automáticamente la concentración de las muestras.

Ejemplo: Si el programa muestra una concentración como 2.00E+005, entonces la concentración de la muestra será 2.0×10^5 copias/ μ L.

Resultado de la Muestra en Copias/ μ L (FAM)	Copias por Reacción
$\geq 1 \times 10^6$	> 1.000.000
$2 \leq \text{Cantidad} \leq 9 \times 10^5$	Cantidad obtenida
< 2	< 10

Si el DNA del patógeno no es detectado, esto no excluye la presencia de infección cuando el título del patógeno está por debajo de lo límite de detección de este kit.

Los resultados proporcionados por este kit deben ser interpretados por el profesional médico responsable, no siendo el único criterio para determinar el diagnóstico y/o tratamiento del paciente.

Los resultados deben ser evaluados teniendo en cuenta los datos clínicos y las pruebas de laboratorio del paciente.

LIMITACIONES DEL PROCESO

Contaminaciones cruzadas que ocurren durante la colecta de la muestra, procesamiento, transporte y almacenamiento podrán ocasionar resultados falsos.

DESEMPEÑO DEL PRODUCTO

CONTROL DE CALIDAD

Exactitud

COMPARACIÓN DE MÉTODOS Y ESPECIFICIDAD METODOLÓGICA

El kit **Bio Gene HPV Alto Risco PCR** fue comparado con otro protocolo para la cuantificación del DNA de HPV16. Fueron realizadas 25 análisis y los resultados fueron evaluados. La diferencia entre los valores de las muestras, obtenidos en los dos productos fue $\leq 0,5$ log. Con estos resultados se puede concluir que el kit presenta buena especificidad metodológica.

Precisión**REPETIBILIDAD**

Fueron realizadas 10 dosificaciones sucesivas de 2 muestras positivas con concentraciones distintas, los resultados están mostrados en la tabla abajo:

	Muestra 1	Muestra 2
Concentración Promedio (Log)	2,063	4,292
Desvio Patrón (Log)	0,079	0,070
Coeficiente de Variación (%)	3,849	1,642

REPRODUCTIBILIDAD

Fueron realizadas 10 dosificaciones durante 3 días consecutivos con 1 muestra, obteniéndose los siguientes resultados:

	Día 1	Día 2	Día 3
Concentración Promedio (Log)	4,292	4,346	4,367
Desvio Patrón (Log)	0,070	0,106	0,118
Coeficiente de Variación (%)	1,642	2,449	2,704

Sensibilidad Clínica

El kit **Bio Gene HPV Alto Risco PCR** presentó sensibilidad clínica de 99,9% y especificidad clínica de 99,9%.

Método		Datos Clínicos		Total
Bio Gene HPV Alto Risco PCR	Resultado	Positivo	Negativo	
	Positivo	25	0	25
	Negativo	0	25	25
RESULTADO TOTAL		25	25	50

Sensibilidad Analítica

La sensibilidad analítica encontrada en los estudios de desempeño fue 0,23 log, o sea, la técnica fue capaz de detectar aproximadamente 8 moléculas alvo en 5µL del producto de extracción del DNA adicionado a reacción de amplificación.

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

El *Papillomavirus humano*, perteneciente a la familia *Papillomaviridae*, infecta células del tejido de revestimiento (piel y mucosa) causando lesiones, las cuales son consecuencia del crecimiento irregular de las células. Existen más de 150 subtipos diferentes de HPV, dentro de los cuales, 35 aproximadamente infectan la región anogenital femenina y masculina pudiendo causar desde verrugas hasta lesiones displásicas de bajo y alto grado. La transmisión del HPV ocurre por contacto directo del área infectada, en el caso de HPVs genitales por el contacto sexual. Los tipos de HPV pueden ser clasificados en virus de bajo, intermedio o alto riesgo, de acuerdo con el tipo de lesión causada. Los HPVs genotipos 16, 18, 31, 33, 45, 52, 56, 58 son clasificados como virus de alto riesgo, ya que pueden estar relacionados a tumores. Por lo tanto, la detección precoz de estos virus es importante para prevenir el desenvolvimiento de lesiones malignas asociadas al HPV. Luego, la detección cuantitativa de los HPVs por PCR tiempo real tiene gran importancia por ser un método sensible, preciso y ágil.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Collection, transport, preparation and storage of specimens for molecular methods; approved guideline. CLSI document MM13-A. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
2. Schmitz, M; Scheungraber, C; Herrmann, J. et al. Quantitative multiplex PCR assay for the detection of the seven clinically most relevant highrisk HPV types. J Clin Virol. 2009 Apr;44(4):302-7. Epub 2009 Feb 14. PubMed PMID: 19223232.
3. Seaman, W.T; Andrews, E; Couch, M. Detection and quantitation of HPV in genital and oral tissues and fluids by real time PCR. Virol J. 2010 Aug 19; 7:194.
4. Seth, R; Rippin, J; Guo, L; Jenkins, D. Detection and quantitation of HPV gene expression using real-time PCR. Methods Mol Med. 2005; 119:61-72.

ASISTENCIA AL CONSUMIDOR

Servicio de Asesoría al Cliente
Tel.: 0800 031 5454
E-mail: sac@bioclin.com.br

Número de registro do kit Bio Gene HPV Alto Risco PCR na ANVISA: 10269360244

SIMBOLOGÍA UNIVERSAL



NÚMERO DEL CATÁLOGO



NÚMERO DE LOTE



FECHA DE FABRICACIÓN

ESTABLE HASTA
(último día del mes)TEMPERATURA LÍMITE
(conservar a)CONTENIDO SUFICIENTE
PARA <N> TESTESCONSULTAR INSTRUCCIONES
DE USODISPOSITIVO DE
DIAGNÓSTICO IN VITROEUROPEA REPRESENTANTE
AUTORIZADOPROTEGER DEL
LUZ Y CALOR

ELABORADO POR



CONTROL



CONTROL POSITIVO



CONTROL NEGATIVO



RIESGO BIOLÓGICO



INFLAMABLE



CORROSIVO



TÓXICO



MARCADO CE

NO UTILICE SI EL
EMBALAJE ESTÁ
DAÑADA



HPV Alto Risco PCR

English . Usage instructions

REF K169

Review: July/2017

INDEX

Function	3
Principle of Action	3
Presentation	3
Reagents	4
Equipaments and Operational Inputs	4
Transportation and storage Conditions	4
Special Care	4
Samples	5
Process Description	6
A . DNAExtraction	6
B . Preparation of the reagents	6
C . Dilution of Quantitative Standard	7
D . PCR Preparation	7
E . Thermocycler settings for Real-Time PCR	8
F . Result Validation	9
G. Result Interpretation	10
Process Limitations	11
Product Performance / Quality Control	11
Comparison of Methods and Methodology Specificity	11
Repeatability	12
Reproducibility	12
Clinical Sensitivity	12
Analytical Sensitivity	13
Diagnostic Significance	13
Bibliographic References	13
Customer Service	13
Universal Symbology	14

FUNCTION

Quantitative detection of *Papillomavirus humano*, genotype 16 (HPV16) using real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) technology. Designed for *in vitro* diagnostic use only.

PRINCIPLE OF ACTION

The **Bio Gene HPV Alto Risco PCR** test is a *in vitro* assay based on the quantitative detection of HPV16 DNA by real-time PCR.

The Real Time PCR method is used to amplify the pathogen DNA.

A thermocycler for Real Time PCR is used to amplify and detect the fluorescent probe. Software calculates the HPV16 DNA concentration, expressed in copies/ μ L, using the standard curve generated from the quantitative standard, contained in the kit.

Reagent	Presentation	
	50 Tests	150 Tests
R1	1 x 55 μ L*	1 x 165 μ L*
R2	1 x 525 μ L*	3 x 525 μ L*
R3	1 x 525 μ L	3 x 525 μ L
R4	1 x 55 μ L*	1 x 165 μ L*
R5	1 x 600 μ L*	1 x 600 μ L*
R6	1 x 50 μ L	1 x 150 μ L
R7	1 x 500 μ L*	1 x 500 μ L*
R8	2 x 1,5 mL	2 x 1,5 mL
R9	1 x 1 mL	1 x 2 mL

*Lyophilized reagents. The volumes described above refer to the final volume after the reagents resuspension, as described in the item PROCESS DESCRIPTION, subitem B (Preparation of the Reagents).

REAGENTS

R1. PCR Solution: Primer, probe, TRIS-HCl.

R2. Mix Taq: Polymerase, dNTPs, $MgCl_2$.

R3. Mix Buffer: TRIS-HCl.

R4. IC PCR Solution: Primer, probe, TRIS-HCl.

R5. Internal Control: Plasmid, TRIS-HCl.

R6. Negative Control: TRIS-HCl.

R7. Standard A (2×10^5 copies/ μL): Plasmid, TRIS-HCl, EDTA.

R8. Diluent: TRIS-HCl, EDTA.

R9. Water: DNase/RNase free water.

EQUIPMENTS AND OPERATIONAL INPUTS**Materials in the kit:**

- Reagents described in the previous item.
- Usage instructions (manual).

Materials needed but not contained in the kit:

- 1- Real-time PCR thermocycler.
- 2- Laminar flow hood.
- 3- 1.5 ml microcentrifuge tubes.
- 4- PCR reaction tubes or plate.
- 5- Powder free latex gloves or similar material.
- 6- Microcentrifuge (3,000 - 12,000 rpm).
- 7- Vortex.
- 8- Micropipettes and sterile filter pipette tips (0.5-10 μL , 10-100 μL , 100-1000 μL).
- 9- Nucleic acid extraction kit.

TRANSPORTATION AND STORAGE CONDITIONS

The required storage temperature is -20°C (-10 to -30°C). **After resuspension of lyophilized reagents, the product is stable for 6 months from the date of resuspension.** Avoid freezing and thawing.

The kit may be transported between 2-30°C for 7 days. Protect from light and avoid moisture.

SPECIAL CARE

- 1- For professional *in vitro* diagnostic use only.

- 2- Strictly follow the methodology proposed to obtain accurate results.
- 3- Handle and dispose of all biological samples, reagents and materials as it contain infectious agents. Avoid direct contact with biological samples and reagents. Avoid spills and aerosol. Handle and dispose of wastes in accordance with appropriate security procedures.
- 4- It is require skilled personnel for the molecular biology procedures in order to minimize the risk of erroneous results, degradation of nucleic acids contained in the samples or even sample contamination by amplicons.
- 5- It is necessary to have separate areas for the extraction / preparation of reactions and for the amplification / detection of products. Never introduce an amplification product in the area intended for the extraction or preparation of amplification products.
- 6- All samples and reagents should be handled inside a laminar flow hood. It is necessary to use sterile and DNase/RNase free filter pipettes tips.
- 7- Avoid repeated thawing and freezing of the reagents.
- 8- Store the DNA samples at -20°C in case they will not be used immediately.
- 9- Do not use reagents after expiration date.
- 10- We recommend applying the local, state and federal rules for environmental protection, so that disposal of reagents and biological material can be made in accordance with current legislation.
- 11- To obtain information related to biosafety or in case of accidents with the product, consult the MSDS (Material Safety Data Sheet) available on the website www.bioclin.com.br or upon request by the SAC (Customer Advisory Service) of Quibasa.
- 12- Do not use the product in case of damaged packaging.
- 13- It is essential that the instruments and equipments used are properly calibrated and subjected to periodic maintenance.

SAMPLES

This kit should be used with DNA samples extracted from cervical or urethral swab. Other types of samples can be used according to medical recommendations or to laboratory.

Samples must be collected according to the laboratory's recommendations for molecular tests. They must be transported and stored between 2 and 8 ° C for 3 days¹

Use DNA samples suitable for PCR amplification with adequate purity and concentration. Avoid repeated freezing and thawing of the samples.

PROCESS DESCRIPTION

A. DNA Extraction

The nucleic acids (DNA) must be extracted in accord to the procedure of the chosen extraction kit.

For control of the extraction process, the **Internal Control (R5)** must be prepared (see item B,3) and added to the samples during the extraction as described below:

- 1- Add 4µL of the **Internal Control (R5)** to each tube containing the resuspended samples in extraction/lysis buffer.
- 2- Complete the extraction procedure according to the usage instructions of the extraction kit.

Note: Never add the Internal Control directly to pure biological sample. This may result in degradation of the sample.

B. Preparation of the Reagents

1- Before open, spin (*spin* pulse) each of the following reagents: **PCR Solution (R1)**, **IC PCR Solution (R4)**, **Internal Control (R5)** and **Standard A (R7)**.

2- Resuspend each vial of **Mix Taq (R2)*** reagent with 525µL of **Mix Buffer (R3)** reagent.

*For the presentation of 150 tests resuspend the **Mix Taq (R2)** vials as need of use.

*The **Mix Taq (R2)** reagent does not contain passive reference Dye (ROX).

3- Resuspend the following reagents: **PCR Solution (R1)**, **IC PCR Solution (R4)** and **Internal Control (R5)** with **Water (R9)** reagent, in according to the following table:

Reagent	Presentation	
	50 Tests	150 Tests
PCR Solution (R1)	55 µL	165 µL
IC PCR Solution (R4)	55 µL	165 µL
*Internal Control (R5)	600 µL	600 µL

*R5 and R7 reagents contain RNA/DNA template. They need to be handle (resuspended) in a separated area from the area designed to prepare other reagents in order to prevent contamination of other reagents.

C. Dilution of Quantitative Standard

- 1- Resuspend **Standard A (R7)** with 500 µL of **Diluent (R8)**.
- 2- Select 3 microtubes (not supplied in the kit) suitable for serial dilution of **Standard A (R7)**.
- 3- Pipette 90µL of the **Diluent (R8)** in each microtube and name them as B, C and D respectively.
- 4- Pipette 10µL of **Standard A (R7)** in microtube B and mix.
- 5- Replace the tip and pipette 10µL of microtube B in microtube C and mix.
- 6- Replace the tip and pipette 10µL of microtube C in microtube D and mix.
- 7- At the end of dilution procedure, it will be available 4 standards with the following concentrations:

Standard A - 2×10^5 copies/µL

Standard B - 2×10^4 copies/µL

Standard C - 2×10^3 copies/µL

Standard D - 2×10^2 copies/µL

D. PCR Preparation

- 1- Prior beginning the assay, select sufficient number of microtubes/wells to be used on the reaction, in accord to the number of samples, controls and quantitative standards to be used.
- 2- Prepare the final PCR solution in accord with reactions number required.

Reagents	1 Reaction	25 Reactions	50 Reactions	100 Reactions
Mix Taq (R2)	10 µL	250 µL	500 µL	1 mL
PCR Solution (R1)	1 µL	25 µL	50 µL	100 µL
CI PCR Solution (R4)	1 µL	25 µL	50 µL	100 µL
Water (R9)	3 µL	75 µL	150 µL	300 µL

To prepare different reaction number must be multiplied the volume of reagents for a reaction by the number of required reactions.

3- Pipette 15µL of the final PCR solution in microtubes or wells previously determined.

4- Add 5µL of extracted DNA sample or 5µL of Quantitative Standards or 5µL of **Negative Control (R6)** in previously determined tubes.

5- Mix well.

6- The total volume of the reaction is 20µL. Each PCR run should include the relevant controls: Negative Control, Internal Control and Quantitative Standards.

7- Transport the tubes/plate to the thermocycler and follow the instructions in the section E (Thermocycler Settings for Real-Time PCR).

E. Thermocycler Settings for Real-Time PCR

Check the operation manual of the Real-time PCR thermocycler to program the experiment.

1- Set the type of experiment:

Quantitative Test with Standard Curve.

2- Set the fluorescent probes:

	Detector	Quencher
HPV16	FAM	NFQ-MGB
Internal Control	VIC	

Note: The Negative Control and Quantitative Standards do not present the Internal Control (reporter 2), because it is used for extraction and amplification control of the samples.

3- Set the quantitative standards:

Standard A - 2×10^5 copies/µL

Standard B - 2×10^4 copies/µL

Standard C - 2×10^3 copies/µL

Standard D - 2×10^2 copies/µL

4- Set the cycling conditions:

	Temperature	Time	Cycles
1	95°C	2 minutes	1
2	95°C	10 seconds	50
	60°C	60 seconds	

Set "Data Collection" as "stage 2, step 2 (60@0:60)".

F. Result Validation**1- Standard Curve**

Standard Curve	Permitted Range	Amplification / Detection
Correlation Coefficient (R^2)	$0,99 \leq R^2 \leq 1,00$	Valid

If the R^2 value does not fall within the limits of range, the result must be considered invalid and the test must be repeated.

2- Negative Control

CT Negative Control		Result	Amplification/ Detection
FAM	VIC		
Undetermined	Undetermined	Negative	Valid

3- Samples

HPV16		Result	Detection
FAM	VIC		
Determined concentration	$25 \leq CT \leq 31$	Positive	Valid
	$CT < 25$ ou $CT > 31$	Positive	Invalid*
Undetermined concentration	$25 \leq CT \leq 31$	Negative	Valid
	$CT < 25$ ou $CT > 31$	Negative	Invalid*

*The CT values of Internal Control vary with the process conditions, as the extraction efficiency of the DNA/RNA, the concentration of the samples and the thermocycler settings. Therefore, these conditions must be evaluated when the CT values are not appropriated and, in case it is relevant, the results can be validated.

Example: In some cases, the samples with high numbers of copies of DNA / RNA can inhibit the amplification of the Internal Control, resulting in CT value outside the optimal range, this does not invalidate the test results.

If the above requirements are not achieved, the assay must be considered invalid and must be repeated.

G. Result Interpretation

This kit is able to detect from 10 to 1.000.000 copies of DNA per reaction.

The thermocycler software calculates automatically the samples concentration.

Example: If the program shows a concentration of $2.00E+005$, this means that the sample concentration is 2.0×10^5 copies/ μ L.

Sample Result in Copies/ μ L (FAM)	Copies per Reaction
$\geq 1 \times 10^6$	> 1.000.000
$2 \leq \text{Quantity} \leq 9 \times 10^5$	Quantity obtained
< 2	< 10

The non-detection of the pathogen DNA does not exclude the presence of infection when the pathogen title is below the detection limit of this kit. The results provided by this kit must be interpreted by the medical professional responsible, not being the only parameter for the determination of diagnosis and/or treatment of the patient.

The results obtained must be evaluated considering the clinical data and laboratory tests of the patient.

PROCESS LIMITATIONS

Cross contamination that eventually occurs during the sample collection, processing, transportation and storage may give false results.

PRODUCT PERFORMANCE

QUALITY CONTROL

Accuracy

COMPARISON OF METHODS AND METHODOLOGY SPECIFICITY

The **Bio Gene HPV Alto Risco PCR** test was compared with another protocol for the quantification of the HPV16 DNA. 25 analyzes were performed and the results were evaluated. Comparing the two tests, the difference between the results obtained was ≤ 0.5 log. This show that the test has good methodological specificity.

Precision**REPEATABILITY**

The repeatability was calculated from 10 successive determinations, using 2 positive samples with different concentrations, obtaining the following results:

	Sample 1	Sample 2
Average Concentration (Log)	2,063	4,292
Standard Deviation (Log)	0,079	0,070
Coefficient of variation (%)	3,849	1,642

REPRODUCIBILITY

The reproducibility was calculated from 10 successive determinations for 3 consecutive days, using 1 sample with different concentrations, obtaining the following results:

	Day 1	Day 2	Day 3
Average Concentration (Log)	4,292	4,346	4,367
Standard Deviation (Log)	0,070	0,106	0,118
Coefficient of variation (%)	1,642	2,449	2,704

Clinical Sensitivity

The **Bio Gene HPV Alto Risco PCR** showed clinical sensitivity of 99.9% and a clinical specificity of 99.9%.

Method		Clinical Data		Total
Bio Gene HPV Alto Risco PCR	Result	Positive	Negative	
	Positive	25	0	25
	Negative	0	25	25
TOTAL		25	25	50

Analytical Sensitivity

It was found in the performance study that the analytical sensitivity of the kit is 0,23 log. This means the assay is capable to detect approximately 8 target molecules in 5µL DNA extraction product, used on the amplification reaction.

DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE

Human Papillomavirus belongs to the *Papillomaviridae* family, infects lining tissue cells (skin and mucosa), causing lesions due to irregular cell growth. There are more than 150 different subtypes of HPV. Nearly 35 of them infect the female and male anogenital region and may cause from warts to dysplastic lesions from low and high grade. HPV transmission occurs by direct contact between the infected area in the case of genital HPV through sexual contact. HPV types can be classified as low, intermediate and high risk virus, according to the type of injury caused. The HPV genotypes 16, 18, 31, 33, 45, 52, 56, 58 are classified as high risk virus, since they are related to tumors. Because of that, early detection of these viruses is important to prevent the development of malignant lesions HPV-associated. Because of that, the quantitative detection of HPV by real time PCR is very important since it is a sensitive, precise and responsive method.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Collection, transport, preparation and storage of specimens for molecular methods; approved guideline. CLSI document MM13-A. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
2. Schmitz, M; Scheungraber, C; Herrmann, J. et al. Quantitative multiplex PCR assay for the detection of the seven clinically most relevant highrisk HPV types. J Clin Virol. 2009 Apr;44(4):302-7. Epub 2009 Feb 14. PubMed PMID: 19223232.
3. Seaman, W.T; Andrews, E; Couch, M. Detection and quantitation of HPV in genital and oral tissues and fluids by real time PCR. Virol J. 2010 Aug 19; 7:194.
4. Seth, R; Rippin, J; Guo, L; Jenkins, D. Detection and quantitation of HPV gene expression using real-time PCR. Methods Mol Med. 2005; 119:61-72.

CUSTOMER SERVICE

Customer Advisory Service

Phone: 0800 031 5454

E-mail: sac@bioclin.com.br

ANVISA registration for Bio Gene HPV Alto Risco PCR: 10269360244

UNIVERSAL SYMBOLOGY

	CATALOG NUMBER		MANUFACTURED BY
	BATCH CODE		CONTROL
	DATE OF MANUFACTURE		POSITIVE CONTROL
	USED BY (last day of month)		NEGATIVE CONTROL
	TEMPERATURE LIMITATION (store at)		BIOLOGICAL RISK
	CONTAINS SUFFICIENT FOR <N> TESTS		INFLAMMABLE
	CONSULT INSTRUCTIONS FOR USE		CORROSIVE
	IN VITRO DIAGNOSTIC DEVICE		POISON
	EUROPEAN AUTHORIZED REPRESENTATIVE		CE MARK
	KEEP AWAY FROM SUNLIGHT		DO NOT USE IF PACKAGE IS DAMAGED



Bioclin · QUIBASA



Rua Teles de Menezes, 92 . Belo Horizonte . MG . Brasil . CEP: 31565-130
Tel +55 31 3439 5454 . Fax +55 31 3439 5455 . www.bioclin.com.br
FARM. RESP. Sílvia Wandalsen Arndt - CRF MG 7422
C.N.P.J.: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira