

**BIO GEÑE**  
Bioclin · QUIBASA

**HPV ALTO RISCO  
MULTIPLEX PCR**

*Instruções de uso*  
*Instrucciones de uso*  
*Instructions for use*

---

**REF** K325-3

Revisão: Fevereiro/2026

**Bioclin · QUIBASA**

# ÍNDICE

Finalidade .....	3
Princípio de Ação .....	3
Apresentação .....	3
Reagentes .....	4
Equipamentos e Insumos Operacionais .....	4
Condições de Armazenamento e Transporte .....	5
Cuidados Especiais .....	5
Amostras .....	6
Procedimento .....	7
A . Extração do DNA .....	7
B . Preparo dos Reagentes .....	7
C . Preparo da PCR .....	7
D . Definições do Termociclador para a PCR em Tempo Real .....	8
E . Validação do Resultado .....	9
F . Interpretação do Resultado .....	10
Limitações do Processo .....	11
Desempenho do Produto .....	11
Comparação de Métodos e Especificidade Metodológica .....	11
Repetibilidade .....	11
Reprodutibilidade .....	12
Sensibilidade Clínica .....	12
Sensibilidade Analítica .....	13
Linearidade .....	13
Reatividade Cruzada .....	13
Significado Diagnóstico .....	13
Referências Bibliográficas .....	14
Atendimento ao Consumidor .....	14
Simbologia Universal .....	15

## FINALIDADE

Teste destinado à detecção qualitativa do DNA do Papilomavírus Humano (HPV) em amostras biológicas, através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, permitindo a identificação dos genótipos de alto risco HPV 16, HPV 18 e HPV's (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68).

## PRINCÍPIO DE AÇÃO

O kit **Bio Gene HPV Alto Risco Multiplex PCR** é um ensaio *in vitro* destinado à detecção qualitativa do DNA de genótipos oncogênicos de alto risco do HPV através da PCR em tempo real. O teste permite a discriminação dos genótipos HPV 16 e HPV 18, além de detectar os genótipos HPV's (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68).

O método de PCR em tempo real é usado para amplificar o DNA do patógeno. Um termociclador de PCR em tempo real é usado para amplificar e detectar as sondas fluorescentes específicas para cada alvo. O software do aparelho detecta a presença do patógeno.

## APRESENTAÇÃO

Reagente	Apresentação
	Bio Gene HPV Alto Risco Multiplex PCR
	100 Testes
R1	1 x 110 µL
R2	1 x 1 mL
R3	1 x 500 µL*
R4	1 x 1,5 mL
R5	1 x 1,5 mL

\*Reagente liofilizado. O volume descrito acima corresponde ao volume final após a ressuspensão do reagente, conforme descrito no item PROCEDIMENTO, subitem B (Preparo dos Reagentes).

## REAGENTES

**R1. Solução PCR:** Primer, Sonda, TRIS-HCl.

**R2. Mix Taq:** Polimerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, Estabilizantes.

**R3. Controle Positivo:** Plasmídeo, TRIS-HCl, EDTA.

**R4. Diluente:** TRIS-HCl, EDTA.

**R5. Controle Negativo:** Água livre de DNase/RNase.

\*O R1 contém primers e sondas para os genótipos de alto risco do HPV e para o controle endógeno.

O Kit pode conter os Acessórios para Coleta de Amostra nas seguintes apresentações:

### 1º Kit de coleta Bio Gene:

- 1) Escova: para coleta em endocérvice;
- 2) Espátula: para coleta em ectocérvice;
- 3) Tubo com solução fixadora/transporte;
- 4) Espéculo vaginal: instrumento destinado a proporcionar o afastamento das paredes do canal vaginal para realização de exame ginecológico.

### 2º Kit de coleta Bio Gene:

- 1) Escova: para coleta em endocérvice;
- 2) Espéculo vaginal: instrumento destinado a proporcionar o afastamento das paredes do canal vaginal para realização de exame ginecológico;
- 3) Tubo com solução fixadora/transporte.

### 3º Kit de coleta Bio Gene:

- 1) Escova: para coleta em endocérvice;
- 2) Tubo com solução fixadora/transporte.

## EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

### Materiais contidos no kit:

- Reagentes descritos no item reagentes;
- Instruções de uso (manual).

### Materiais necessários, mas não contidos no kit:

- 1- Sistema ótico programável de detecção de fluorescência (Termociclador Real-Time PCR);
- 2- Cabine de fluxo laminar (para PCR);
- 3- Cabine de segurança biológica;
- 4- Centrífuga;
- 5- Agitador tipo vórtex;
- 6- Kit para extração de ácidos nucleicos;
- 7- Micropipetas (0,5-10 µL, 100-1000 µL);
- 8- Ponteiras estéreis, livres de Dnases/RNases com filtro;
- 9- Tubos de centrífuga de 0,5 mL e 1,5 mL;

- 10- Tubos ou placas para PCR;
- 11- Adesivos ópticos;
- 12- Tubos para armazenamento de amostras;
- 13- Suporte para tubos e microtubos;
- 14- Equipamentos de proteção individual (EPIs): jaleco, máscara descartável, touca, luvas sem pó e descartáveis, protetores de barba, óculos de segurança.

## **CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE**

A temperatura de armazenamento é de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

O transporte pode ser feito entre  $2$  e  $8^{\circ}\text{C}$  por até 5 dias.

Deve-se evitar o congelamento e descongelamento dos reagentes, a fim de prevenir sua degradação. Manter ao abrigo da luz e evitar umidade.

## **CUIDADOS ESPECIAIS**

- 1- Produto de uso exclusivo para diagnóstico *in vitro*;
- 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 reações;
- 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 e livres de DNases e RNases;
- 7- Evitar o congelamento e descongelamento repetido dos reagentes;
- 8- Armazenar as amostras de DNA a  $-20^{\circ}\text{C}$ , 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 FDS (Ficha com Dados de Segurança) disponibilizadas no site [www.bioclin.com.br](http://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

- O kit **Bio Gene HPV Alto Risco Multiplex PCR** deve ser utilizado com amostras de DNA extraídas de swab cervical, uretral e anorretal. Outros tipos de amostras podem ser utilizados de acordo com recomendações médicas ou do próprio laboratório, após validação;
- As amostras devem ser coletadas por profissionais habilitados de acordo com as recomendações do laboratório para testes moleculares;
- Aconselha-se, antes da coleta, que a(o) paciente siga as seguintes instruções:
  - Não usar cremes ou duchas vaginais 3 dias antes da coleta;
  - Abster-se da prática sexual 24h antes da coleta;
  - Coletar a amostra fora do período menstrual, preferencialmente;
  - Não aplicar ácido acético (vinagre) e / ou solução de iodo à vagina antes da coleta.
- As amostras de raspado cervical ou biópsias devem ser transportadas e armazenadas em meios adequados para posterior extração e PCR em tempo real;
- Podem ser utilizados meios de uso exclusivo para diagnóstico molecular ou meios próprios para o diagnóstico citológico e molecular, no qual será usada a mesma amostra (biópsia líquida);
- Amostras de biópsias frescas em meio líquido devem ser processadas em até 24 horas se forem mantidas à temperatura ambiente. Caso estejam congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , as amostras devem ser processadas em até 30 dias. Esses cuidados visam a preservação e integridade do material genético oriundo das amostras coletadas;
- Evite fixar amostras de raspado cervical ou biópsias em formalina, pois isso compromete a extração de DNA e a realização da PCR em tempo real;
- É crucial seguir as instruções do fabricante quanto à estabilidade e temperatura de armazenamento das amostras em meio líquido;
- O cuidado adequado garante resultados precisos e confiáveis em análises laboratoriais. Para longo tempo de armazenamento, congelar as amostras a  $-70^{\circ}\text{C}^1$ ;
- Deve-se evitar mais de 5 ciclos de congelamento e descongelamento da amostra, de modo a manter a integridade do DNA.

## PROCEDIMENTO

### A. Extração do DNA

Os ácidos nucleicos (DNA) das amostras devem ser extraídos seguindo as instruções de uso do kit escolhido, de modo a se obter material genético cuja integridade, qualidade e pureza estejam adequadas para a PCR. Deve-se utilizar um volume mínimo (input) de 200 µL de amostra biológica para extração. Volumes de amostra que sejam inferiores a 200 µL podem ser utilizados, desde que o processo seja previamente validado.

### B. Preparo dos Reagentes

O reagente **R3** contém molde de DNA e deve ser manipulado (ressuspendido) em área apropriada para evitar a contaminação dos demais reagentes.

1- Centrifugar (pulso *spin*) o reagente **Controle Positivo (R3)** antes da abertura do microtubo.

2- Ressuspende o reagente **Controle Positivo (R3)** com 500 µL do **Diluyente (R4)**.

*\*Não se deve adicionar fluoróforo de referência passiva (ROX) ao Mix Taq (R2), visto que o fluoróforo ROX é utilizado no sistema de detecção do alvo HPV 18.*

### C. Preparo da PCR

1- Separar previamente os microtubos/poços a serem utilizados, de acordo com o número de amostras e controles 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 ( <b>R2</b> )	10 µL	250 µL	500 µL	1 mL
Solução PCR ( <b>R1</b> )	1 µL	25 µL	50 µL	100 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 11  $\mu\text{L}$  da solução de PCR final nos tubos ou poços determinados para as reações.

4- Adicionar 9  $\mu\text{L}$  do **DNA extraído da amostra** ( $\geq 20 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) ou 9  $\mu\text{L}$  do **Controle Positivo (R3)** ou 9  $\mu\text{L}$  de **Controle Negativo (R5)**.

5- Proceder com a homogeneização de modo a evitar a formação de bolhas.

6- Observe que o volume total da reação é de 20  $\mu\text{L}$  e cada corrida de PCR deve incluir os controles relevantes (Controle Negativo e Controle Positivo).

7- Proceder com a homogeneização de modo a evitar a formação de bolhas.

8- Transporte os tubos/placa para o termociclador.

#### ***D. 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 Qualitativo.

#### **2- Defina os detectores (sondas) fluorescentes como:**

<b>Alvo</b>	<b>Detector</b>	<b>Quencher</b>
HPV 16	VIC/HEX	NFQ-MGB
HPV 18	ROX	
HPVs (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)	FAM	
Controle Endógeno	Cy5	

#### **OBS.:**

- Equipamentos que utilizam o ROX como referência passiva devem ser programados com a opção “none” para referência passiva.
- As amostras extraídas devem ser marcadas com os detectores VIC/HEX, ROX, FAM e Cy5.

### 3- Defina as condições dos ciclos

Etapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
1	95°C	3 minutos	1
2	95°C	15 segundos	6
	60°C	60 segundos	
3	95°C	15 segundos	39
	60°C	60 segundos	

Defina "Data Collection" como "stage 3, step 2 (60°C - 0:60)".

### E. Validação do Resultado

#### 1- Controles

Controles	Faixa Permitida CT	Amplificação/ Detecção
Positivo	VIC/HEX $\leq$ 24 ROX $\leq$ 24 FAM $\leq$ 24	Válida
Negativo	Indeterminado	Válida
Endógeno	Cy5 $\leq$ 35	Válida

#### OBS.:

- Os valores de CT do Controle Endógeno variam de acordo com as condições do processo, como a eficiência da extração do DNA, a concentração das amostras e as configurações do termociclador. Amostras com alto número de cópias de DNA podem, em alguns casos, inibir a amplificação do Controle Endógeno.

- O CT baixo indica alta concentração de material biológico na amostra e que o processo de extração foi eficiente.
- O CT alto indica baixa concentração de material biológico na amostra e/ou extração ineficiente.

Logo, estas condições devem ser avaliadas quando os valores de CT não forem adequados e, se pertinente, os resultados podem ser validados.

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

### F. Interpretação do Resultado

Bio Gene HPV Alto Risco Multiplex PCR				Resultado
VIC/HEX	ROX	FAM	CY5	
<b>CT DETERMINADO</b>	CT INDETERMINADO	CT INDETERMINADO	<b>CT DETERMINADO</b>	- <b>Positivo - HPV 16</b> - Negativo - HPV 18 - Negativo - HPVs (31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66,68)
CT INDETERMINADO	<b>CT DETERMINADO</b>	CT INDETERMINADO	<b>CT DETERMINADO</b>	- <b>Positivo - HPV 18</b> - Negativo - HPV 16 - Negativo - HPVs (31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66,68)
CT INDETERMINADO	CT INDETERMINADO	<b>CT DETERMINADO</b>	<b>CT DETERMINADO</b>	- <b>Positivo - HPVs (31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66,68)</b> - Negativo - HPV 16 - Negativo - HPV 18
CT INDETERMINADO	CT INDETERMINADO	CT INDETERMINADO	<b>CT DETERMINADO</b>	- <b>Negativo - HPV 16</b> - <b>Negativo - HPV 18</b> - <b>Negativo - HPVs (31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66,68)</b>

**Determinado:** presença de curva de amplificação com padrão sigmóide.

**Indeterminado:** ausência de curva de amplificação.

\*Os resultados são aplicáveis aos genótipos de alto risco detectados por este kit, conforme descrito no item Finalidade.

**OBS.:** Pode ocorrer presença de curva de amplificação (CT determinado) para mais de um genótipo, neste caso trata-se de uma coinfeção. O resultado é válido desde que todos os controles apresentem valores entre os limites de faixa permitida e que o aspecto da curva da amostra testada seja semelhante às curvas obtidas no **Controle Positivo (R3)**, com padrão sigmóide.

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 teste. 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**

### **Exatidão**

#### **COMPARAÇÃO DE MÉTODOS E ESPECIFICIDADE METODOLÓGICA**

O kit **Bio Gene HPV Alto Risco Multiplex PCR** foi comparado com outro kit para a quantificação do DNA do vírus HPV. Foram realizadas 100 análises e os resultados foram avaliados. Obteve-se os resultados das amostras nos dois produtos, utilizando como critério de aceitação a concordância entre os resultados. Com estes resultados pode-se concluir que o kit apresenta boa especificidade metodológica.

### **Precisão**

#### **REPETIBILIDADE**

Foram realizadas 10 dosagens durante 01 dia com duas amostras. O produto encontra-se aprovado de acordo com o critério de aprovação estabelecido, pois apresenta 100% de correlação nos resultados obtidos para as duas amostras analisadas.

## REPRODUTIBILIDADE

Foram realizadas 10 dosagens durante 3 dias consecutivos de uma amostra. O produto encontra-se aprovado de acordo com o critério de aprovação estabelecido, pois apresenta 100% de correlação nos resultados obtidos para a amostra analisada.

## SENSIBILIDADE CLÍNICA

O painel de amostras clínicas apresentado abaixo mostra que a sensibilidade e especificidade clínica do kit **Bio Gene HPV Alto Risco Multiplex PCR** são maiores que 99,9%.

Sensibilidade Clínica			
Alvo	Verdadeira Positiva	Falsa Negativa	Sensibilidade
HPV 16 (VIC/HEX)	20	0	100%
HPV 18 (ROX)	18	0	100%
Outros subtipos de HPV alto risco (12 subtipos) (FAM)	12	0	100%

Especificidade Clínica			
Alvo	Verdadeira Positiva	Falsa Negativa	Especificidade
HPV 16 (VIC/HEX)	27	0	100%
HPV 18 (ROX)	13	0	100%
Outros subtipos de HPV alto risco (12 subtipos) (FAM)	10	0	100%

## **SENSIBILIDADE ANALÍTICA**

A sensibilidade analítica encontrada nos estudos de performance foi:  
11,11 cópias/ $\mu$ L (100 cópias/reação) para o HPV 16;  
11,13 cópias/ $\mu$ L (100,17 cópias/reação) para o HPV 18;  
11,16 cópias/ $\mu$ L (100,44 cópias/reação) dos outros 12 tipos de HPV.

**OBS.:** A sensibilidade analítica do produto pode sofrer interferência de fatores como a eficiência do kit/método empregado na extração dos ácidos nucleicos e acessibilidade do equipamento termociclador em tempo real utilizado.

## **LINEARIDADE**

A linearidade encontrada foi de aproximadamente 5,0 log (1 x 10<sup>5</sup> cópias/ $\mu$ L).

## **REATIVIDADE CRUZADA**

Não foi verificada reatividade cruzada com nenhum dos patógenos que acometem o sistema urinário e/ou reprodutivo humano, ou patógenos que são transmitidos por via sexual. As espécies contempladas no estudo foram *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Neisseria gonorrhoeae*, HIV, HCV e HBV.

## **SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO**

O Papilomavírus humano (HPV), 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 aproximadamente 35 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 genótipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68 são classificados como de alto risco, já que podem estar relacionados a tumores. Dentre esses, os genótipos 16, 18, 31 e 45 são responsáveis por 85% dos casos de câncer cervical. Portanto, a identificação precoce destes vírus é importante para prevenir o desenvolvimento de lesões malignas. A detecção por PCR em tempo real tem grande importância por ser um método sensível, preciso e rápido.

**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 high-risk 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.

**QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda**

Rua Teles de Menezes, 92 – Santa Branca  
CEP 31565-130 – Belo Horizonte – MG – Brasil  
Tel.: (31) 3439.5454  
E-mail: sac@bioclin.com.br  
CNPJ: 19.400.787/0001-07 – Indústria Brasileira

**ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR**

Serviço de Assessoria ao Cliente  
Tel.: 0800 0315454  
E-mail: sac@bioclin.com.br

Número de Registro do kit de BIO GENE HPV ALTO RISCO  
MULTIPLEX PCR na ANVISA: 10269360457.

## SIMBOLOGIA UNIVERSAL

	NÚMERO DE CATÁLOGO		FABRICADO POR
	NÚMERO DO LOTE		CONTROLE
	DATA DE FABRICAÇÃO		CONTROLE POSITIVO
	DATA DE VALIDADE (último dia do mês)		CONTROLE NEGATIVO
	LIMITE DE TEMPERATURA (conservar a)		RISCO BIOLÓGICO
	O CONTEÚDO É SUFICIENTE PARA <N> TESTE		INFLÂMÁVEL
	CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO		CORROSIVO
	PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO		TÓXICO
	PROTEGER DA LUZ E CALOR		NÃO UTILIZAR SE A EMBALAGEM ESTIVER DANIFICADA
	NÃO REUTILIZE		PRODUTO ESTERELIZADO
	CUIDADO		PERIGO

**BIO GENE**  
Bioclin · QUIBASA  
**HPV ALTO RISCO  
MULTIPLEX PCR**

*Español Instrucciones de Uso*

---

**REF** K325-3

Revisión: Febrero/2026

**Bioclin · QUIBASA**

# ÍNDICE

Finalidad .....	18
Principio de Acción .....	18
Presentación .....	18
Reactivos .....	19
Equipos y Suministros Operativos .....	19
Condiciones de Almacenamiento y Transporte .....	20
Precauciones Especiales .....	20
Muestras .....	21
Procedimiento .....	22
A . Extracción del ADN .....	22
B . Preparación de los Reactivos .....	22
C . Preparación de la PCR .....	22
D . Definiciones del Termociclador para la PCR en Tiempo Real .....	23
E . Validación del Resultado .....	25
F . Interpretación del Resultado .....	26
Limitaciones del Proceso .....	27
Desempeño del Producto .....	27
Comparación de Métodos y Especificidad Metodológica .....	27
Repetibilidad .....	27
Reproducibilidad .....	27
Sensibilidad Clínica .....	27
Sensibilidad Analítica .....	28
Linealidad.....	29
Reactividad Cruzada .....	29
Significado Diagnóstico .....	29
Referencias Bibliográficas .....	29
Atención al Consumidor .....	30
Simbología Universal .....	31

## FINALIDAD

Ensayo para la detección cualitativa del ADN del Papilomavirus Humano (HPV) de genotipos de alto riesgo HPV 16, HPV 18 y HPV's (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) en muestras biológicas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real.

## PRINCIPIO DE ACCIÓN

El kit **Bio Gene HPV Alto Riesgo Multiplex PCR** es un ensayo *in vitro* basado en la detección cualitativa del ADN de los genotipos oncogénicos de HPV de alto riesgo mediante PCR en tiempo real. El kit discrimina los genotipos HPV 16 y HPV 18, además de detectar los genotipos HPV's (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68).

La metodología de PCR en tiempo real se utiliza para amplificar el ADN del patógeno. Un termociclador de PCR en tiempo real se emplea para amplificar y detectar las sondas fluorescentes específicas para cada objetivo. El *software* del equipo determina la presencia del patógeno.

## PRESENTACIÓN

Reactivo	Presentación
	<b>Bio Gene HPV Alto Riesgo Multiplex PCR</b>
	100 Pruebas
<b>R1</b>	1 x 110 µL
<b>R2</b>	1 x 1 mL
<b>R3</b>	1 x 500 µL*
<b>R4</b>	1 x 1,5 mL
<b>R5</b>	1 x 1,5 mL

\*Reactivo liofilizado. El volumen indicado arriba corresponde al volumen final después de la resuspensión del reactivo, conforme se describe en el ítem PROCEDIMIENTO, subítem B (Preparación de los Reactivos).

## REACTIVOS

**R1. Solución PCR:** Cebadores (Primers), Sondas, TRIS-HCl.

**R2. Mix Taq:** Polimerasa, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, Estabilizantes.

**R3. Control Positivo:** Plásmido, TRIS-HCl, EDTA.

**R4. Diluyente:** TRIS-HCl, EDTA.

**R5. Control Negativo:** Agua libre de DNasa/RNasa.

\*El R1 contiene cebadores y sondas para los genotipos de HPV de alto riesgo y para el control endógeno.

El kit puede contener los Accesorios para la Recolección de Muestras en las siguientes presentaciones:

### 1º Kit de Recolección Bio Gene:

- 1) Cepillo: para recolección en endocérvix
- 2) Espátula: para recolección en ectocérvix
- 3) Tubo con solución fijadora/transporte
- 4) Espéculo vaginal: instrumento destinado a proporcionar la separación de las paredes del canal vaginal para la realización del examen ginecológico

### 2º Kit de Recolección Bio Gene:

- 1) Cepillo: para recolección en endocérvix
- 2) Espéculo vaginal: instrumento destinado a proporcionar la separación de las paredes del canal vaginal para la realización del examen ginecológico
- 3) Tubo con solución fijadora/transporte

### 3º Kit de Recolección Bio Gene:

- 1) Cepillo: para recolección en endocérvix
- 2) Tubo con solución fijadora/transporte

## EQUIPOS Y SUMINISTROS OPERATIVOS

### Materiales contenidos en el kit:

- Reactivos descritos en el ítem Reactivos.
- Instrucciones de uso (manual).

### Materiales necesarios, pero no incluidos en el kit:

- 1- Sistema de detección de fluorescencia (Termociclador para PCR en Tiempo Real)
- 2- Cabina de flujo laminar (para PCR)
- 3- Cabina de seguridad biológica
- 4- Centrífuga
- 5- Agitador tipo vortex
- 6- Kit para extracción de ácidos nucleicos

- 7- Micropipetas (0,5–10  $\mu$ L, 100–1000  $\mu$ L)
- 8- Puntas estériles, libres de DNasa/RNasa, con filtro
- 9- Tubos de centrifuga de 0,5 mL y 1,5 mL
- 10- Tubos o placas para PCR
- 11- Adhesivos ópticos
- 12- Tubos para almacenamiento de muestras
- 13- Soportes para tubos y microtubos
- 14- Equipos de protección individual (EPI): bata, mascarilla desechable, gorro, guantes sin polvo y desechables, protectores de barba, gafas de seguridad.

### CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

La temperatura de almacenamiento es de -20 °C.

El transporte puede realizarse entre 2 y 8 °C durante un máximo de 5 días.

Se debe evitar la congelación y descongelación repetida de los reactivos para prevenir su degradación. Mantener protegido de la luz y evitar la humedad.

### PRECAUCIONES ESPECIALES

- 1- Producto de uso exclusivo para diagnóstico *in vitro*.
- 2- Seguir rigurosamente la metodología propuesta para la obtención de resultados exactos.
- 3- Manipular y desechar todas las muestras biológicas, reactivos y materiales utilizados en el ensayo como si fueran capaces de transmitir agentes infecciosos. Evitar el contacto directo con las muestras biológicas y los reactivos. Evitar derrames o formación de aerosoles. Los residuos deben ser manipulados y descartados de acuerdo con las medidas de seguridad adecuadas.
- 4- Los procedimientos de biología molecular, tales como la extracción de ácidos nucleicos, transcripción reversa, amplificación y detección, requieren personal capacitado para evitar resultados erróneos, especialmente debido a la degradación de los ácidos nucleicos contenidos en las muestras o a la 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 a la extracción o preparación de reacciones.
- 6- Todas las muestras y reactivos deben ser manipulados bajo una cabina de flujo laminar. Las pipetas deben utilizarse con puntas con filtro. Las puntas empleadas deben ser estériles y libres de DNasas y RNasas.
- 7- Evitar la congelación y descongelación repetida de los reactivos.
- 8- Almacenar las muestras de ADN a -20 °C si no van a ser utilizadas inmediatamente.
- 9- No utilizar el kit después de la fecha de vencimiento.

**10-** Se recomienda aplicar las normas locales, estatales y federales de protección ambiental para que el desecho de los reactivos y del material biológico se realice de acuerdo con la legislación vigente.

**11-** Para obtener información relacionada con la bioseguridad o en caso de accidentes con el producto, consultar las FDS (Fichas de Datos de Seguridad) disponibles en el sitio web [www.bioclin.com.br](http://www.bioclin.com.br) o solicitarlas al SAC (Servicio de Asesoría al Cliente) de Quibasa.

**12-** No utilizar el producto en caso de daños en el embalaje.

**13-** Es imprescindible que los instrumentos y equipos utilizados estén debidamente calibrados y sometidos a mantenimientos periódicos.

## MUESTRAS

- El kit **Bio Gene HPV Alto Risco Multiplex PCR** debe utilizarse con muestras de ADN extraídas de hisopado cervical, uretral y anorrectal. Otros tipos de muestras pueden ser utilizados según recomendaciones médicas o del propio laboratorio, previa validación.

- Las muestras deben ser recolectadas por profesionales capacitados, de acuerdo con las recomendaciones del laboratorio para pruebas moleculares.

- Se aconseja que, antes de la recolección, el/la paciente siga las siguientes instrucciones:

- No usar cremas ni duchas vaginales durante los 3 días previos a la toma de la muestra.

- Abstenerse de la actividad sexual 24 horas antes de la recolección.

- Preferiblemente, recolectar la muestra fuera del período menstrual.

- No aplicar ácido acético (vinagre) y/o solución de yodo en la vagina antes de la recolección.

- Las muestras de raspado cervical o biopsias deben ser transportadas y almacenadas en medios adecuados para la posterior extracción y PCR en tiempo real.

- Pueden utilizarse medios de uso exclusivo para diagnóstico molecular o medios compatibles con diagnóstico citológico y molecular, en los cuales se utilizará la misma muestra (biopsia líquida).

- Las muestras de biopsias frescas en medio líquido deben procesarse en un máximo de 24 horas si se mantienen a temperatura ambiente. Si están congeladas a -20 °C, deben procesarse en un máximo de 30 días. Estos cuidados garantizan la preservación e integridad del material genético proveniente de las muestras recolectadas.

- Evite fijar muestras de raspado cervical o biopsias en formalina, ya que esto compromete la extracción del ADN y la realización de la PCR en tiempo real.

- Es fundamental seguir las instrucciones del fabricante respecto a la estabilidad y temperatura de almacenamiento de las muestras en medio líquido.

- El cuidado adecuado garantiza resultados precisos y confiables en los análisis de laboratorio. Para almacenamiento prolongado, congele las muestras a -70 °C. Para almacenamiento prolongado, congele las muestras a -70 °C.
- Se deben evitar más de 5 ciclos de congelación y descongelación de la muestra para mantener la integridad del ADN.

## PROCEDIMIENTO

### A. Extracción del ADN

Los ácidos nucleicos (ADN) de las muestras deben ser extraídos siguiendo las instrucciones de uso del kit elegido, con el fin de obtener material genético cuya integridad, calidad y pureza sean adecuadas para la PCR. Debe utilizarse un volumen mínimo (input) de muestra biológica de 200  $\mu$ L para la extracción. Volúmenes inferiores a 200  $\mu$ L pueden ser utilizados, siempre que el proceso haya sido previamente validado.

### B. Preparación de los Reactivos

El reactivo R3 contiene molde de ADN y debe ser manipulado (resuspendido) en un área adecuada para evitar la contaminación de los demás reactivos.

- 1- Centrifugar (pulso spin) el reactivo **Control Positivo (R3)** antes de abrir el microtubo.
- 2- Resuspender el reactivo **Control Positivo (R3)** con 500  $\mu$ L de **Diluyente (R4)**.

*\* No se debe añadir fluoróforo de referencia pasiva (ROX) al **Mix Taq (R2)**, ya que el fluoróforo ROX se utiliza en el sistema de detección del objetivo HPV 18.*

### C. Preparación de la PCR

- 1- Separar previamente los microtubos/pozos que se utilizarán, de acuerdo con el número de muestras y controles que serán analizados.
- 2- Preparar el volumen de la solución final de PCR de acuerdo con el número de reacciones a 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

Para la preparación de un número diferente de reacciones, se debe multiplicar el volumen de los reactivos para 1 reacción por el número de reacciones necesarias.

**3-** Pipetear 11 µL de la solución final de PCR en los tubos o pocillos destinados para las reacciones.

**4-** Añadir 9 µL del **ADN extraído de la muestra** ( $\geq 20$  ng/µL) o 9 µL del **Control Positivo (R3)** o 9 µL del **Control Negativo (R5)**.

**5-** Proceder a la homogenización evitando la formación de burbujas.

**6-** Tenga en cuenta que el volumen total de la reacción es de 20 µL, y cada corrida de PCR debe incluir los controles relevantes (Control Negativo y Control Positivo).

**7-** Proceder a la homogenización evitando la formación de burbujas.

**8-** Transportar los tubos/placa al termociclador.

#### ***D. Definiciones del Termociclador para la PCR en Tiempo Real***

Verifique el manual de operación del equipo de PCR en tiempo real para la programación del experimento.

#### **1- Defina el tipo de experimento:**

Ensayo Cualitativo.

#### **2- Defina los detectores (sondas) fluorescentes como:**

Objetivo	Detector	Quencher
HPV 16	VIC/HEX	NFQ-MGB
HPV 18	ROX	
HPVs (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)	FAM	
Control Endógeno	Cy5	

**NOTA:**

- Los equipos que utilizan ROX como referencia pasiva deben programarse con la opción “none” para referencia pasiva.
- Las muestras extraídas deben marcarse con los detectores VIC/HEX, ROX, FAM y Cy5.

**3- Defina las condiciones de los ciclos**

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	95°C	3 minutos	1
2	95°C	15 segundos	6
	60°C	60 segundos	
3	95°C	15 segundos	39
	60°C	60 segundos	

Defina “Data Collection” como “stage 3, step 2 (60°C - 0:60)”.

## E. Validación del Resultado

### 1- Controles

Controles	Rango de CT Permitido	Amplificación/ Detección
Positivo	VIC/HEX $\leq$ 24 ROX $\leq$ 24 FAM $\leq$ 24	Válido
Negativo	Indeterminado	Válido
Endógeno	Cy5 $\leq$ 35	Válido

**NOTA:** Los valores de CT del Control Endógeno varían de acuerdo con las condiciones del proceso, como la eficiencia de la extracción del ADN, la concentración de las muestras y las configuraciones del termociclador. Muestras con un alto número de copias de ADN pueden, en algunos casos, inhibir la amplificación del Control Endógeno.

- Un CT bajo indica una alta concentración de material biológico en la muestra y que el proceso de extracción fue eficiente.
- Un CT alto indica una baja concentración de material biológico en la muestra y/o una extracción ineficiente.

Por lo tanto, estas condiciones deben evaluarse cuando los valores de CT no sean adecuados y, si corresponde, los resultados pueden ser validados.

Si no se cumplen los requisitos anteriores, el ensayo se considera inválido y la prueba debe repetirse.

## F. Interpretación del Resultado

Bio Gene HPV Alto Risco Multiplex PCR				Resultado
VIC/HEX	ROX	FAM	CY5	
<b>CT DETERMINADO</b>	CT INDETERMINADO	CT INDETERMINADO	<b>CT DETERMINADO</b>	- <b>Positivo - HPV 16</b> - Negativo - HPV 18 - Negativo - HPVs (31,33,35,39,45,51, 52,56,58,59,66,68)
CT INDETERMINADO	<b>CT DETERMINADO</b>	CT INDETERMINADO	<b>CT DETERMINADO</b>	- <b>Positivo - HPV 18</b> - Negativo - HPV 16 - Negativo - HPVs (31,33,35,39,45,51, 52,56,58,59,66,68)
CT INDETERMINADO	CT INDETERMINADO	<b>CT DETERMINADO</b>	<b>CT DETERMINADO</b>	- <b>Positivo - HPVs (31,33,35,39,45,51, 52,56,58,59,66,68)</b> - Negativo - HPV 16 - Negativo - HPV 18
CT INDETERMINADO	CT INDETERMINADO	CT INDETERMINADO	<b>CT DETERMINADO</b>	- <b>Negativo - HPV 16</b> - <b>Negativo - HPV 18</b> - <b>Negativo - HPVs (31,33,35,39,45,51, 52,56,58,59,66,68)</b>

**Determinado:** presencia de curva de amplificación con patrón sigmoide.

**Indeterminado:** ausencia de curva de amplificación.

\*Los resultados son aplicables a los genotipos de alto riesgo detectados por este kit, según lo descrito en el apartado Finalidad.

**NOTA:** Puede ocurrir amplificación (CT determinado) para más de un genotipo; en este caso, se trata de una coinfección. El resultado es válido siempre que todos los controles presenten valores dentro de los límites permitidos y que el aspecto de la curva de la muestra analizada sea semejante al de las curvas obtenidas con el **Control Positivo (R3)**, con patrón sigmoide.

La no detección del ADN del patógeno no excluye la presencia de infección cuando el título del patógeno se encuentra por debajo del límite de detección de este kit. Los resultados proporcionados por este kit deben ser interpretados por el profesional médico responsable, y no constituyen el único criterio para la determinación del diagnóstico y/o tratamiento del paciente. Los resultados obtenidos deben evaluarse considerando los datos clínicos y los demás exámenes de laboratorio del paciente.

### **Limitaciones del Proceso**

Las contaminaciones cruzadas que puedan ocurrir durante la recolección, procesamiento, transporte y almacenamiento de las muestras pueden ocasionar resultados falsos.

## **DESEMPEÑO DEL PRODUCTO**

### **Exactitud**

#### **COMPARACIÓN DE MÉTODOS Y ESPECIFICIDAD METODOLÓGICA**

El kit **Bio Gene HPV Alto Risco Multiplex PCR** fue comparado con otro kit destinado a la cuantificación del ADN del virus HPV. Se realizaron 100 análisis y los resultados fueron evaluados. Se obtuvieron los resultados de las muestras en ambos productos, utilizando como criterio de aceptación la concordancia entre los resultados. Con base en estos datos, se concluye que el kit presenta buena especificidad metodológica.

### **Precisión**

#### **REPETIBILIDAD**

Se realizaron 10 determinaciones durante 01 día con dos muestras. El producto se encuentra aprobado de acuerdo con el criterio de aceptación establecido, ya que presenta un 100 % de correlación en los resultados obtenidos para las 2 muestras analizadas.

#### **REPRODUCIBILIDAD**

Se realizaron 10 determinaciones durante 3 días consecutivos utilizando una muestra. El producto se considera aprobado conforme al criterio de aceptación establecido, ya que presenta un 100% de correlación en los resultados obtenidos para la muestra analizada.

### **SENSIBILIDAD CLÍNICA**

El panel de muestras clínicas presentado a continuación demuestra que la sensibilidad y la especificidad clínica del kit **Bio Gene HPV Alto Risco Multiplex PCR** son superiores al 99,9%.

Sensibilidad Clínica			
Objetivo	Verdadero Positivo	Falso Negativo	Sensibilidad
HPV 16 (VIC/HEX)	20	0	100%
HPV 18 (ROX)	18	0	100%
Otros subtipos de HPV de alto riesgo (12 subtipos) (FAM)	12	0	100%

Especificidad Clínica			
Objetivo	Verdadero Positivo	Falso Negativo	Especificidad
HPV 16 (VIC/HEX)	27	0	100%
HPV 18 (ROX)	13	0	100%
Otros subtipos de HPV de alto riesgo (12 subtipos) (FAM)	10	0	100%

### SENSIBILIDAD ANALÍTICA

La sensibilidad analítica encontrada en los estudios de desempeño fue de:

- 11,11 copias/ $\mu$ L (100 copias/reacción) para HPV 16;
- 11,13 copias/ $\mu$ L (100,17 copias/reacción) para HPV 18;
- 11,16 copias/ $\mu$ L (100,44 copias/reacción) para los otros 12 tipos de HPV.

**NOTA:** La sensibilidad analítica del producto puede verse afectada por factores como la eficiencia del kit/método utilizado en la extracción de los ácidos nucleicos y la accesibilidad/configuración del equipo de termociclador en tiempo real utilizado.

## LINEALIDAD

La linealidad encontrada fue de aproximadamente 5,0 log ( $1 \times 10^5$  copias/ $\mu$ L).

## REACTIVIDAD CRUZADA

No se verificó reactividad cruzada con ninguno de los patógenos que afectan el sistema urinario y/o reproductivo humano, ni con patógenos transmitidos por vía sexual. Las especies evaluadas en el estudio fueron: *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Neisseria gonorrhoeae*, HIV, HCV y HBV.

## SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

El Papilomavirus humano (HPV), perteneciente a la familia Papillomaviridae, infecta células de los tejidos de revestimiento (piel y mucosas), causando lesiones que resultan del crecimiento irregular de dichas células. Existen más de 150 subtipos diferentes de HPV, de los cuales aproximadamente 35 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 con el área infectada; en el caso de los HPV genitales, principalmente por contacto sexual. Los tipos de HPV pueden clasificarse como de bajo, intermedio o alto riesgo, según el tipo de lesión que producen. Los genotipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68 se consideran virus de alto riesgo, ya que pueden estar asociados a tumores; entre ellos, los genotipos 16, 18, 31 y 45 son responsables del 85% de los casos de cáncer cervical. Por lo tanto, la identificación precoz de estos virus es fundamental para prevenir el desarrollo de lesiones malignas. La detección por PCR en tiempo real es de gran importancia por ser un método sensible, preciso y rápido.

## 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 high-risk 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.



**QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda**

Rua Teles de Menezes, 92 – Santa Branca  
CEP 31565-130 – Belo Horizonte – MG – Brasil  
Teléfono: +55 (31) 3439-5454  
Correo electrónico: sac@bioclin.com.br  
CNPJ: 19.400.787/0001-07 – Industria Brasileña

**ATENCIÓN AL CONSUMIDOR**

Servicio de Asesoría al Cliente  
Línea Gratuita: 0800 031 5454  
Correo electrónico: sac@bioclin.com.br

Número de registro del kit BIO GENE HPV ALTO RISCO MULTIPLEX PCR en ANVISA: 10269360457.

## SIMBOLOGÍA UNIVERSAL

	NUMERO DE CATALOGO		FABRICADO POR
	NUMERO DE LOTE		CONTROLAR
	FECHA DE FABRICACIÓN		CONTROL POSITIVO
	FECHA DE VALIDEZ (último día del mes)		CONTROL NEGATIVO
	LÍMITE DE TEMPERATURA (tienda)		RIESGO BIOLÓGICO
	EL CONTENIDO ES SUFICIENTE PARA <N> PRUEBA		INFLAMABLE
	VER INSTRUCCIONES DE USO		CORROSIVO
	PRODUCTO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO		TÓXICO
	PROTEGER DE LUZ Y CALOR		NO UTILICE SI EL EMBALAJE ESTA DAÑADA
	NO REUTILIZA		PRODUCTO ESTERILIZADO
	PRECAUCIÓN		PELIGRO

**BIO GENE**  
Bioclin · QUIBASA  
**HPV ALTO RISCO  
MULTIPLEX PCR**

*English Instructions for Use*

---

**REF** K325-3

Revision: February/2026

**Bioclin · QUIBASA**

## TABLE OF CONTENTS

Intended Use .....	34
Principle of Action .....	34
Presentation .....	34
Reagents .....	35
Equipment and Operational Supplies .....	35
Storage and Transport Conditions .....	36
Special Care .....	36
Samples .....	37
Procedure .....	38
A . DNA Extraction .....	38
B . Reagent Preparation .....	38
C . PCR Preparation .....	38
D . Thermocycler Settings for Real-Time PCR .....	39
E . Result Validation .....	40
F . Result Interpretation .....	41
Process Limitations .....	42
Product Performance/Quality Control .....	42
Method Comparison and Methodological Specificity .....	42
Repeatability .....	42
Reproducibility .....	43
Clinical Sensitivity .....	43
Analytical Sensitivity .....	44
Linearity .....	44
Cross-Reactivity .....	44
Diagnostic Significance .....	44
References .....	45
Customer Service .....	45
Universal Symbology .....	46

## INTENDED USE

Qualitative detection of high-risk Human Papillomavirus (HPV) DNA genotypes HPV 16, HPV 18, and HPVs (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, and 68) in biological samples through real-time polymerase chain reaction (PCR).

## PRINCIPLE OF ACTION

The **Bio Gene HPV Alto Risco Multiplex PCR** kit is an in vitro assay based on the qualitative detection of high-risk oncogenic HPV genotype DNA through real-time PCR. The kit discriminates HPV genotypes 16 and 18, as well as detects HPVs genotypes (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, and 68).

The real-time PCR method is used to amplify the pathogen's DNA. A real-time PCR thermal cycler is used to amplify and detect specific fluorescent probes for each target. The instrument's software detects the presence of the pathogen.

## PRESENTATION

Reagent	Presentation
	Bio Gene HPV Alto Risco Multiplex PCR
	100 Tests
<b>R1</b>	1 x 110 µL
<b>R2</b>	1 x 1 mL
<b>R3</b>	1 x 500 µL*
<b>R4</b>	1 x 1,5 mL
<b>R5</b>	1 x 1,5 mL

\*Lyophilized reagent. The volume described above corresponds to the final volume after resuspension of the reagent, as described in the PROCEDURE section, subsection B (Reagent Preparation).

## REAGENTS

- R1. PCR Solution:** Primers, probes, TRIS-HCl.  
**R2. Taq Mix:** Polymerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, stabilizers.  
**R3. Positive Control:** Plasmid, TRIS-HCl, EDTA.  
**R4. Diluent:** TRIS-HCl, EDTA.  
**R5. Negative Control:** DNase/RNase-free water.

\* R1 contains primers and probes for high-risk HPV genotypes and for the endogenous control.

The kit may include Sample Collection Accessories in the following configurations:

### 1<sup>st</sup> Bio Gene Collection Kit:

- 1) Brush: for endocervical sample collection
- 2) Spatula: for ectocervical sample collection
- 3) Tube with fixative/transport solution
- 4) Vaginal speculum: instrument designed to separate the walls of the vaginal canal to allow gynecological examination

### 2<sup>nd</sup> Bio Gene Collection Kit:

- 1) Brush: for endocervical sample collection
- 2) Vaginal speculum: instrument designed to separate the walls of the vaginal canal to allow gynecological examination
- 3) Tube with fixative/transport solution

### 3<sup>rd</sup> Bio Gene Collection Kit:

- 1) Brush: for endocervical sample collection
- 2) Tube with fixative/transport solution

## EQUIPMENT AND OPERATIONAL SUPPLIES

### Materials included in the kit:

- Reagents listed in the Reagents section.
- Instruction manual.

### Materials needed but not included in the kit:

- 1- Programmable optical fluorescence detection system (real-time PCR thermal cycler);
- 2- Laminar flow hood (for PCR);
- 3- Biological safety cabinet;
- 4- Centrifuge;
- 5- Vortex mixer;
- 6- Nucleic acid extraction kit;
- 7- Micropipettes (0.5–10 µL, 100–1000 µL);

- 8-** Sterile, DNase/RNase-free filter pipette tips;
- 9-** 0.5 mL and 1.5 mL centrifuge tubes;
- 10-** PCR tubes or plates;
- 11-** Optical adhesives;
- 12-** Sample storage tubes;
- 13-** Tube and microtube racks;
- 14-** Personal protective equipment (lab coat, disposable mask, cap, powder-free disposable gloves, beard covers, safety glasses).

### **STORAGE AND TRANSPORT CONDITIONS**

The storage temperature is -20 °C. Transportation can be carried out between 2 and 8 °C for up to 5 days. Freezing and thawing of reagents should be avoided to prevent degradation. Keep the product away from light and protect it from moisture.

### **SPECIAL CARE**

- 1-** This product is for in vitro diagnostic use only.
- 2-** Strictly follow the proposed methodology to obtain accurate results.
- 3-** Handle and dispose of all biological samples, reagents, and materials used in the assay as if they were capable of transmitting infectious agents. Avoid direct contact with biological samples and reagents. Avoid spills or aerosols. Waste should be handled and disposed of in accordance with appropriate safety measures.
- 4-** Molecular biology procedures - such as nucleic acid extraction, reverse transcription, amplification, and detection - require qualified personnel to avoid the risk of erroneous results, particularly due to degradation of nucleic acids in the samples or contamination by amplification products.
- 5-** Separate areas are required for extraction/reaction preparation and for amplification/detection. Never introduce amplification products into the area designated for extraction or preparation of amplification reactions.
- 6-** All samples and reagents must be handled under a laminar flow hood. Pipettes must be used with filter tips. Tips must be sterile and DNase/RNase-free.
- 7-** Avoid repeatedly freezing and thawing the reagents.
- 8-** Store DNA samples at -20 °C if not used immediately.
- 9-** Do not use the kit after the expiration date.
- 10-** We recommend following local, state, and federal environmental protection regulations to ensure that the disposal of reagents and biological materials is carried out in accordance with applicable laws.

**11-** For information regarding biosafety or in the event of accidents involving the product, consult the Safety Data Sheets (SDS) available at [www.bioclin.com.br](http://www.bioclin.com.br) or upon request from Quibasa Customer Advisory Service (SAC).

**12-** Do not use the product if the packaging is damaged.

**13-** It is essential that all instruments and equipment used are properly calibrated and subjected to regular maintenance.

## **SAMPLES**

- The Bio Gene HPV Alto Risco Multiplex PCR kit must be used with DNA samples extracted from cervical, urethral, and anorectal swabs. Other sample types may be used according to medical or laboratory recommendations, following appropriate validation.

- Samples must be collected by trained professionals in accordance with the laboratory's recommendations for molecular testing.

- Prior to sample collection, it is recommended that the patient follow these instructions:

- Do not use vaginal creams or douches for 3 days before collection.

- Abstain from sexual intercourse for 24 hours before collection.

- Preferably collect the sample outside the menstrual period.

- Do not apply acetic acid (vinegar) and/or iodine solution to the vagina before collection.

- Cervical scraping samples or biopsies must be transported and stored in appropriate media for subsequent extraction and real-time PCR.

- These may include media intended exclusively for molecular diagnostics or media suitable for both cytological and molecular diagnostics, in which the same sample (liquid biopsy) will be used.

- Fresh biopsy samples in liquid medium should be processed within 24 hours if kept at room temperature. If stored frozen at -20 °C, samples should be processed within 30 days. These measures ensure the preservation and integrity of the genetic material obtained from collected samples.

- Avoid fixing cervical scraping samples or biopsies in formalin, as this compromises DNA extraction and real-time PCR performance.

- It is essential to follow the manufacturer's instructions regarding the stability and storage temperature of samples in liquid medium.

- Proper handling ensures accurate and reliable laboratory analysis results. For long-term storage, freeze samples at -70 °C<sup>1</sup>.

- More than five freeze-thaw cycles should be avoided to maintain DNA integrity.

## PROCEDURE

### A. DNA Extraction

Nucleic acids (DNA) from the samples must be extracted following the instructions for use of the selected extraction kit, ensuring that the integrity, quality, and purity of the genetic material are appropriate for PCR. A minimum input volume of 200  $\mu\text{L}$  of biological sample must be used for extraction. Sample volumes below 200  $\mu\text{L}$  may be used provided that the procedure has been previously validated.

### B. Reagent Preparation

Reagent R3 contains a DNA template and must be handled (resuspended) in an appropriate area to prevent contamination of the other reagents.

- 1- Centrifuge (spin down) the **Positive Control (R3)** before opening the microtube.
- 2- Resuspend the **Positive Control (R3)** with 500  $\mu\text{L}$  of **Diluent (R4)**.

*\*Passive reference dye (ROX) must not be added to the **Taq Mix (R2)**, as ROX is used in the detection system for the HPV 18 target.*

### C. PCR Preparation

- 1- Prepare in advance the microtubes/wells to be used, according to the number of samples and controls to be analyzed.
- 2- Prepare the total volume of the final PCR solution according to the number of reactions to be performed.

Reagents	1 Reaction	25 Reactions	50 Reactions	100 Reactions
Taq Mix (R2)	10 $\mu\text{L}$	250 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	1mL
PCR Solution (R1)	1 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$

For preparing a different number of reactions, multiply the reagent volumes for 1 reaction by the required number of reactions.

- 3- Pipette 11  $\mu\text{L}$  of the final PCR solution into the designated tubes or wells.
- 4- Add 9  $\mu\text{L}$  of **extracted sample DNA** ( $\geq 20 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ), or 9  $\mu\text{L}$  of the **Positive Control (R3)**, or 9  $\mu\text{L}$  of the **Negative Control (R5)**.
- 5- Homogenize carefully to avoid bubble formation.
- 6- Note that the total reaction volume is 20  $\mu\text{L}$ , and each PCR run must include the appropriate controls (Negative Control and Positive Control).
- 7- Homogenize carefully to avoid bubble formation.
- 8- Transfer the tubes/plate to the thermal cycler.

#### ***D. Thermocycler Settings for Real-Time PCR***

Refer to the real-time PCR instrument's operating manual for experiment programming.

##### **1- Set the experiment type to:**

Qualitative Test.

##### **2- Configure the fluorescent detectors (probes) as follows:**

Target	Detector	Quencher
HPV 16	VIC/HEX	NFQ-MGB
HPV 18	ROX	
HPVs (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)	FAM	
Endogenous Control	Cy5	

#### **NOTE:**

- Instruments that use ROX as a passive reference must be programmed with the passive reference option set to "none."
- Extracted samples must be labeled with the VIC/HEX, ROX, FAM, and Cy5 detectors.

### 3- Set the Cycling Conditions

Step	Temperature	Time	Cycles
1	95°C	3 minutes	1
2	95°C	15 seconds	6
	60°C	60 seconds	
3	95°C	15 seconds	39
	60°C	60 seconds	

Set “Data Collection” to “stage 3, step 2 (60°C - 0:60)”.

### E. Result Validation

#### 1- Controls

Control	Acceptable CT Range	Amplification/ Detection
Positive	VIC/HEX $\leq$ 24 ROX $\leq$ 24 FAM $\leq$ 24	Valid
Negative	Not detected	Valid
Endogenous	Cy5 $\leq$ 35	Valid

**NOTE:** CT values for the Endogenous Control may vary depending on process conditions, such as DNA extraction efficiency, sample concentration, and thermal cycler settings. Samples with a high number of DNA copies may, in some cases, inhibit amplification of the Endogenous Control.

- A low CT value indicates a high concentration of biological material in the sample and that the extraction process was efficient.
- A high CT value indicates a low concentration of biological material in the sample and/or an inefficient extraction.

Therefore, these conditions should be evaluated when CT values fall outside the acceptable range and, when appropriate, the results may still be validated.

If the above requirements are not met, the assay is considered invalid and the test must be repeated.

### ***F. Result Interpretation***

<b>HPV Alto Risco Multiplex</b>				<b>Result</b>
<b>VIC/HEX</b>	<b>ROX</b>	<b>FAM</b>	<b>CY5</b>	
<b>CT DETECTED</b>	CT NOT DETECTED	CT NOT DETECTED	<b>CT DETECTED</b>	<b>Positive for HPV 16</b> Negative for HPV 18 Negative for HPVs (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)
CT NOT DETECTED	<b>CT DETECTED</b>	CT NOT DETECTED	<b>CT DETECTED</b>	<b>Positive for HPV 18</b> Negative for HPV 16 Negative for HPVs (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)
CT NOT DETECTED	CT NOT DETECTED	<b>CT DETECTED</b>	<b>CT DETECTED</b>	<b>Positive for HPVs (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)</b> Negative for HPV 16 and HPV 18
CT NOT DETECTED	CT NOT DETECTED	CT NOT DETECTED	<b>CT DETECTED</b>	<b>Negative for all high-risk HPV genotypes tested</b>

**CT detected:** presence of an amplification curve with a sigmoidal pattern.

**CT not detected:** absence of an amplification curve.

\*The results apply only to the high-risk genotypes detected by this kit, as described in the Intended Use section.

**Note:** Amplification (CT detected) may occur for more than one genotype; in such cases, this indicates a co-infection. The result is valid provided that all controls fall within their acceptable CT ranges and the amplification curve of the tested sample resembles the curves obtained for the Positive Control (R3), showing a sigmoidal pattern.

Failure to detect pathogen DNA does not exclude the possibility of infection when the pathogen load is below the detection limit of this kit. The results provided by this kit must be interpreted by the responsible healthcare professional and should not be used as the sole criterion for determining the patient's diagnosis and/or treatment. Results must be evaluated in conjunction with the patient's clinical data and additional laboratory tests.

### **Process Limitations**

Cross-contamination during sample collection, processing, transport, or storage may lead to false results.

## **PRODUCT PERFORMANCE/QUALITY CONTROL**

### **Accuracy**

#### **METHOD COMPARISON AND METHODOLOGICAL SPECIFICITY**

The **Bio Gene HPV Alto Risco Multiplex PCR** kit was compared with another kit designed for quantifying HPV DNA. A total of 100 analyses were performed, and the results were evaluated. Sample results from both products were compared using agreement between results as the acceptance criterion. Based on these findings, the kit demonstrates good methodological specificity.

### **Precision**

#### **REPEATABILITY**

Ten measurements were performed in a single day using two samples. The product met the established acceptance criteria, demonstrating 100% agreement in the results obtained for both samples.

## REPRODUCIBILITY

Ten measurements were performed over three consecutive days using one sample. The product met the established acceptance criteria, demonstrating 100% agreement in the results obtained for the analyzed sample.

## CLINICAL SENSITIVITY

The clinical sample panel shown below demonstrates that the clinical sensitivity and specificity of the **Bio Gene HPV Alto Risco Multiplex PCR** kit are greater than 99.9%.

Clinical Sensitivity			
Target	True Positive	False Negative	Sensitivity
HPV 16 (VIC/HEX)	20	0	100%
HPV 18 (ROX)	18	0	100%
Other high-risk HPVs subtypes (12 subtypes) (FAM)	12	0	100%

Clinical Specificity			
Target	True Positive	False Negative	Specificity
HPV 16 (VIC/HEX)	27	0	100%
HPV 18 (ROX)	13	0	100%
Other high-risk HPVs subtypes (12 subtypes) (FAM)	10	0	100%

## ANALYTICAL SENSITIVITY

The analytical sensitivity determined in the performance studies was:  
11.11 copies/ $\mu$ L (100 copies/reaction) for HPV 16;  
11.13 copies/ $\mu$ L (100.17 copies/reaction) for HPV 18;  
11.16 copies/ $\mu$ L (100.44 copies/reaction) for the other 12 HPV types.

**NOTE:** The analytical sensitivity of the product may be affected by factors such as the efficiency of the nucleic acid extraction kit/method used and the performance capability of the real-time thermal cycler.

## LINEARITY

The linearity observed was approximately 5.0 log ( $1 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L).

## CROSS-REACTIVITY

No cross-reactivity was observed with any pathogens that infect the urinary and/or reproductive systems, nor with sexually transmitted pathogens. The species included in the study were: *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Neisseria gonorrhoeae*, HIV, HCV, and HBV.

## DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE

Human papillomavirus (HPV), belonging to the Papillomaviridae family, infects epithelial cells of the skin and mucosa, causing lesions that result from abnormal cellular growth. There are more than 150 different HPV subtypes, approximately 35 of which infect the anogenital region of both females and males, potentially causing conditions ranging from warts to low- and high-grade dysplastic lesions.

HPV transmission occurs through direct contact with the infected area; in the case of genital HPV, transmission occurs through sexual contact. HPV types are classified as low-, intermediate-, or high-risk according to the types of lesions they cause.

HPV genotypes 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, and 68 are categorized as high-risk viruses because they may be associated with tumors. Among these, genotypes 16, 18, 31, and 45 account for 85% of cervical cancer cases.

Therefore, early identification of these viruses is essential to prevent the development of malignant lesions. Real-time PCR detection is highly valuable due to its sensitivity, precision, and rapid results.

## 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 high-risk 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.



### **QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda**























Rua Teles de Menezes, 92 – Santa Branca  
CEP 31565-130 – Belo Horizonte – MG – Brazil  
Phone: +55 (31) 3439-5454  
Email: [sac@bioclin.com.br](mailto:sac@bioclin.com.br)  
CNPJ: 19.400.787/0001-07 – Brazilian Industry

## **CUSTOMER SERVICE**

Customer Advisory Service  
Phone: 0800 031 5454  
E-mail: [sac@bioclin.com.br](mailto:sac@bioclin.com.br)

Registration number of the BIO GENE HPV ALTO RISCO MULTIPLEX PCR kit with ANVISA: 10269360457.

## UNIVERSAL SYMBOLOGY

	CATALOG NUMBER		MADE BY
	LOT NUMBER		CONTROL
	MANUFACTURING DATE		POSITIVE CONTROL
	VALIDITY DATE (last day of the month)		NEGATIVE CONTROL
	TEMPERATURE LIMIT (store)		BIOLOGICAL RISK
	CONTENT IS SUFFICIENT FOR <N> TEST		FLAMMABLE
	SEE INSTRUCTIONS FOR USE		CORROSIVE
	IN VITRO DIAGNOSTIC PRODUCT		TOXIC
	KEEP AWAY FROM SUNLIGHT		DO NOT USE IF PACKAGED IS DAMAGED
	DO NOT REUSE		PRODUCT STERILIZED
	CAUTION		DANGER



**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](http://www.bioclin.com.br)  
FARM. RESP. Silvio Wandalsen Arndt - CRF MG 7422  
C.N.P.J.: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira