



High PapillomaStrip

Test para el genotipado de 19 HPV's anogenitales de medio-alto riesgo

Test for the genotyping of 19 medium-high risk anogenital HPV's

Test per la genotipizzazione di 19 HPV anogenitali a medio-alto rischio



OPERON, S.A. - Camino del Plano, 19 - E-50410 Cuarte de Huerva - (Zaragoza) – ESPAÑA
+34 976 503597

ES

HIGH PAPILOMASTRIP

Test para la detección de 19 HPV's anogenitales de medio-alto riesgo

FINALIDAD PREVISTA

El test High PapillomaStrip es un test basado en la técnica del blot reverso que permite la detección cualitativa en muestras de ADN, procedentes de frotis o biopsias cervicouterinas, de 19 subtipos del virus del papiloma humano (*Papillomavirus*) de medio-alto riesgo: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73 y 82 (MM4 e IS39).

Para el diagnóstico final deben tenerse también en cuenta otros parámetros como los síntomas mostrados y el historial clínico del paciente.

FUNDAMENTO

El kit High PapillomaStrip se basa en el principio de la hibridación reversa, y permite la detección e identificación en muestras de ADN, procedentes de frotis o biopsias cervicouterinas de 19 HPV's anogenitales de medio-alto riesgo.

El virus del papiloma humano (HPV) es responsable de una variedad de afecciones de la piel y la mucosa. Las manifestaciones clínicas varían en función de la localización anatómica de la lesión y el tipo de HPV implicado. Hasta la fecha, se han descrito más de 100 genotipos de HPV diferentes, de los cuales más de 40 infectan el tracto anogenital. De ellos, aproximadamente 1/3 están asociados con cáncer cervical y neoplasia anal. Los HPV's anogenitales se dividen, generalmente, en dos categorías: aquellos con un riesgo oncogénico potencial bajo (Grupo de bajo riesgo) y aquellos con un riesgo oncogénico potencial medio-alto (Grupo de medio-alto riesgo). Los HPV's de alto riesgo están asociados, generalmente, a lesiones precancerosas de alto grado y a cáncer invasivo, mientras que los HPV's de bajo riesgo se suelen encontrar en condiciones asintomáticas o benignas como las verrugas genitales (1, 2).

Entre los tipos de HPV más frecuentes se encuentran:

- Riesgo medio-alto: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73 y 82.
- Riesgo bajo: 6, 11, 34, 40, 42, 43, 44.

El HPV es un virus que contiene una única molécula circular de ADN de doble cadena de unas 8 Kb. Se pueden distinguir tres regiones: una región reguladora de los procesos de transcripción y replicación (URR), una región génica de expresión "temprana" que codifica proteínas implicadas en la transcripción, transformación y replicación (E1-E2-E5-E6-E7) y una región génica de expresión "tardía" que codifica proteínas estructurales (L1-L2-E4).

Hoy en día, el diagnóstico de la infección por HPV se basa en la detección del ADN viral. La presencia de regiones conservadas en diferentes partes del ADN viral ha permitido el desarrollo de primers consenso, tales como los sistemas MY09-MY11 (región L1), PGMY09-PGMY11 (región L1), Gp5+-Gp6+ (región L1), SPF10 (región L1) y LCR-E7 (región E7), que permiten la detección de un amplio espectro de diferentes genotipos de HPV. Sin embargo, las diferencias en el potencial oncogénico de los HPV's hacen necesario el identificar el tipo de HPV presente en la muestra, para lo cual se siguen diferentes técnicas: análisis de restricción, secuenciación, Elisa, hibridación reversa o microarrays (3, 4, 5, 6, 7, 8).

El procedimiento del kit High PapillomaStrip consta de tres pasos: a) extracción de ADN, b) amplificación mediante PCR y c) hibridación/revelado.

a) Extracción de ADN

Reactivos no incluidos en el kit.

Puede utilizarse cualquier protocolo estándar de purificación de ADN.

b) Amplificación mediante PCR

El kit High PapillomaStrip incluye los reactivos necesarios para realizar la amplificación de las regiones E6-E7 de los 19 HPVs que se detectan en el kit. Se ha seleccionado esta región ya que la expresión de los genes E6-E7 está directamente asociada con la carcinogénesis, por lo que la detección de estas dianas puede proporcionar información biológica y patológica importante. Además, hay estudios que demuestran la existencia de un proceso de delección génica de la región L1. Esta delección se produce al integrarse el ADN del HPV de alto riesgo en las regiones epiteliales y se ha descrito que sucede en, aproximadamente, un 30% de los casos de las muestras de cáncer cervical positivas para la región E6 (9, 10).

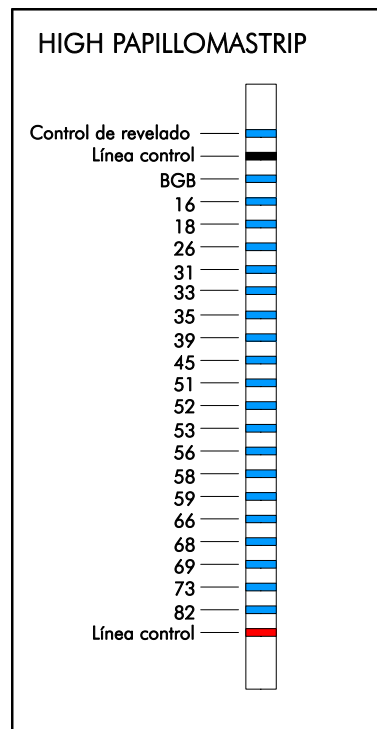
Se emplean primers específicos para cada uno de los 19 HPVs, con objeto de evitar los problemas que pueden presentar los primers consenso de amplificación preferente de algún subtipo particular.

Durante la PCR se produce también la amplificación de un gen control (β -globina) que se utiliza como indicador de la ausencia de inhibidores de la PCR en la muestra de ADN amplificada.

c) Hibridación y revelado

En esta etapa se produce la unión específica de los fragmentos de ADN amplificados durante la PCR a una serie de sondas depositadas sobre unas membranas de nylon.

Las membranas llevan unidas de forma covalente una sonda por cada HPV detectado, además de una sonda para el control de amplificación (β -globina, BGB), una sonda control del revelado y dos líneas, una negra y otra roja, para el control de la posición de la tira y como ayuda en la interpretación de los resultados (ver dibujo adjunto).



La detección de los fragmentos hibridados a las diferentes sondas se realiza mediante el uso de un conjugado (estreptavidina-peroxidasa) que se une a una marca de biotina que se añade a los fragmentos de ADN amplificados durante la PCR. Tras la adición de un sustrato de la peroxidasa (TMB) se genera un precipitado de color azul allí donde se haya producido la hibridación. Como resultado final del test se obtiene un patrón de bandas que se interpreta con la ayuda de una tira control.

MATERIALES INCLUIDOS EN EL KIT

HIGH PAPILLOMASTRIP			Kit 16 tests
	Membranas	STRIPS	16 tests
	Cubetas 8 canales	PL	2
Reactivos de PCR REAG PCR	Premezcla PCR	REAG PCR MIX	0,8 ml
	Primers	REAG PRIMER	0,11 ml
	Taq	REAG TAQ HS	0,050 ml
	Desnaturalizante	SOLN DN	1 ml
	Tampón de hibridación	BUF HYB	60 ml
	Tampón de lavado 1	BUF WASH 1	100 ml
	Conjugado	CONJ HRP	60 ml
	Tampón de lavado 2	BUF WASH 2	130 ml
	Substrato	SUBS TMB	30 ml
	Instrucciones de uso		1
	Plantilla de interpretación		1

MATERIALES NO INCLUIDOS EN EL KIT

Para el desarrollo del kit se requieren, además, los siguientes materiales:

1. Microtubos para PCR.
2. Micropipetas y puntas para micropipetas (estériles o irradiadas con UV e, idealmente, con filtro).
3. Pinzas y lápiz (opcional).
4. Cronómetro.
5. Termómetro.

EQUIPOS NECESARIOS PARA EL DESARROLLO DEL KIT

1. Termoagitador para placas
El kit ha sido validado con los termoagitadores: PST-60HL (Biosan S.L.), Profiblot T30 y T48 (Tecan), Autoblot 3000H (medTEC), TENDIGO (Fujirebio), Dynablot Heat (Dy nex).
2. Termociclador
Se han probado con éxito los siguientes termocicladores: PTC-100 (MJ Research), MJ Mini Gradient Thermal Cycler (BioRad), Mastercycler Personal (Eppendorf), S1000 Thermal Cycler (BioRad).
3. Escáner BLOTrix S1 o BLOTrix R2 (BioSciTec, opcional).

PRECAUCIONES

1. Utilizar todos los reactivos únicamente *in vitro*.
2. Seguir rigurosamente las instrucciones indicadas. La modificación de cualquiera de los **pasos o temperaturas** puede afectar gravemente a los resultados del test.
3. Es esencial que todos los materiales que se vayan a usar estén libres de DNAsas. Se recomienda usar puntas de pipeta con filtro en la preparación de PCRs, para evitar problemas de contaminación por formación de aerosoles. Siga todas las precauciones normales para la preparación de las amplificaciones. Utilice material autoclavado para el proceso de hibridación/revelado.

4. Almacenar los componentes del kit en las condiciones indicadas.
5. No intercambiar los componentes de kits con distinto número de lote.
6. No usar los componentes del kit después de las fechas de caducidad.
7. Las tiras reactivas son de un único uso.
8. Las cubetas proporcionadas son de un único uso.
9. Cada canal de la cubeta es para una única tira.
10. En caso de rotura del envase, el producto puede ser utilizado si ninguno de los componentes ha sido dañado.
11. El producto usado debe desecharse conforme a la legislación vigente.
12. Las muestras de pacientes deben considerarse siempre como potencialmente infecciosas. Observe todas las normas medioambientales y de seguridad.
13. Es aconsejable que la tira, una vez utilizada se manipule teniendo las mismas consideraciones que con la muestra. Se recomienda gestionarla como material potencialmente peligroso.
14. La solución de desnaturalización contiene < 2 % de NaOH y es irritante para ojos y piel (H314 y P280, P305, P351, P338, P310).
15. No tirar la caja externa del kit hasta que se haya utilizado todo el contenido. La caja contiene información esencial respecto al marcado CE del producto y lotificación.

ALMACENAMIENTO

Almacenar todos los reactivos a 2-8 °C. Debido al almacenamiento a 2-8 °C puede observarse la aparición de precipitados en alguna de las soluciones (tampón de hibridación, tampones de lavado 1 y 2, conjugado). Estos precipitados se redisuelven al atemperar (conjugado) o calentar a 42 °C (tampón de hibridación y tampones de lavado 1 y 2).

La fecha de caducidad de todos los reactivos está impresa en la etiqueta.

MUESTRAS

El test ha sido diseñado y validado para su uso con ADN obtenido de frotis o raspados cervicouterinos. Se ha demostrado también su correcto funcionamiento con muestras procedentes de frotis de pene.

Para la toma de muestra utilizar una torunda de algodón o cepillo secos y estériles. Asegurarse de tomar una cantidad suficiente de muestra, pero sin que se produzca el sangrado de la lesión. Guardar la torunda en su tubo, sin utilizar ningún medio conservante. Conservarla a 2-8 °C si se va a procesar en menos de una semana o a -20 °C si se va a procesar más adelante.

La calidad y concentración del ADN extraído de las muestras cervicouterinas es de vital importancia para el correcto funcionamiento del test. Por ello, el kit incluye un control que detectará la presencia de inhibidores de la PCR en el ADN (amplificación de la β -globina). Además, se recomienda medir la concentración de las muestras de ADN a emplear, ya que el uso de muestras de ADN con una concentración inferior a 10 ng/ μ l, aunque muestren amplificación del gen control, podría reducir la sensibilidad del test.

Algunos de los procedimientos de extracción de ADN que han sido evaluados con resultados satisfactorios con el kit High PapillomaStrip son:

- a) Kit de extracción de ADN de OPERON S.A.: Ref 3.149.020.64.000, kit de extracción de ADN.
- b) Extracción de ADN con resinas de sílice (QIAamp DNA Mini Kit; Qiagen).
- c) Protocolo de extracción para el microarray Clart HPV2 de Genomica S.L.
- d) Extracción de ADN mediante partículas magnéticas.

Almacenar las muestras de ADN a 2-8 °C, si se van a analizar en un tiempo breve, o a -20 °C para almacenamientos más prolongados.

PROCEDIMIENTO HIGH PAPILLOMASTRIP

1.- Reacción en cadena de la polimerasa

Preparación de PCRs

Importante: antes de abrir los viales con los reactivos de PCR centrifugarlos brevemente. De este modo se asegurará de que todo el contenido de los mismos esté en el fondo del tubo.

- Preparar los tubos de PCR necesarios según el número de ADNs que se vayan a amplificar.
- En cada tubo de PCR añadir: 38 μ l de premezcla de PCR + 5 μ l de primers + 2 μ l de Taq + 5 μ l de ADN. Mezclar. Si es posible, mantener todos los reactivos a 2-8 °C durante la preparación.

Si se van a amplificar varios ADNs se recomienda preparar una mezcla común con todos los reactivos, de modo que finalmente se añadan 45 μ l de mezcla + 5 μ l de ADN. Por ejemplo:

Nº de PCRs	Premezcla de PCR	Primers	Taq
1	38 μ l	5 μ l	2 μ l
3	133 μ l	17,5 μ l	7 μ l
5	209 μ l	27,5 μ l	11 μ l
8	342 μ l	45 μ l	18 μ l

* Las mezclas con todos los reactivos para la PCR deben prepararse siempre en exceso, para contrarrestar las pérdidas de volumen que se producen durante el proceso de pipeteo.

Siguiendo las buenas prácticas de laboratorio, el usuario debería amplificar también un control negativo (agua o tampón TE, por ejemplo) y, si fuera necesario, un control positivo (no incluido en el kit).

Amplificación

Debe tenerse en cuenta la importancia de conseguir una adecuada concentración de ADN para obtener los resultados esperados.

Introducir los tubos en el aparato de PCR (si se requiere, añadir 1 gota de aceite Nujol sobre cada reacción de PCR) y amplificar el ADN con el siguiente programa:

94 °C, 5 min
40 ciclos de: 94 °C, 1 min
58 °C, 1 min
72 °C, 1 min
72 °C, 5 min
4 °C

Una vez terminada la PCR continuar con el desarrollo de la tira. Si las muestras no se van a analizar en el momento, almacenarlas a 2-8 °C durante no más de 24 h. Para almacenamientos más prolongados, congelar a -20 °C.

→ Ver esquema de preparación de PCR en Anexo al documento

2.- Desarrollo de la tira

Bajo petición, Operon facilitará al usuario el procedimiento de trabajo según el instrumento que se vaya a utilizar para el desarrollo de las tiras (PST-60HL, Profiblot, Autoblot 3000H, TENDIGO o Dynablot Heat). Alternativamente, puede consultarlo en la siguiente dirección web:

<https://operon.es/es/products-protocols/>

En el paso de desnaturalización, se dispensarán en la placa **12,5 μ l de desnaturalizante + 12,5 μ l de PCR.**

El producto se ha probado utilizando diferentes plataformas de trabajo. A modo informativo se especifican los nombres comerciales de las plataformas de trabajo utilizadas, lo que no implica un uso exclusivo y dependiente de dichas marcas comerciales, sino que se refieren de forma representativa al modo de trabajo utilizado. El producto funciona correctamente mientras se utilice una plataforma que asegure el programa de temperatura planteado para el producto.

→ Ver esquema básico del desarrollo de la tira en Anexo al documento

3.- Interpretación de la tira

La interpretación de las tiras puede hacerse de manera visual, con ayuda de la plantilla incluida en el kit (ver procedimientos de trabajo para cada instrumento) o de forma automática, mediante el uso de los escáneres BLOTriX R2 o BLOTriX S1 (BioSciTec).

Bajo petición, OPERON, S.A., S.A. facilitará al usuario las instrucciones para la interpretación automática de las tiras mediante escáner (DO-09053004 "Instrucciones de uso BLOTriX R2_S1"). Alternativamente, puede consultarlo en la siguiente dirección web:

<https://operon.es/es/products-protocols/>

Importante: la interpretación automática de los resultados requiere siempre de una verificación visual de las tiras; bandas muy débiles podrían no ser detectadas por el instrumento.

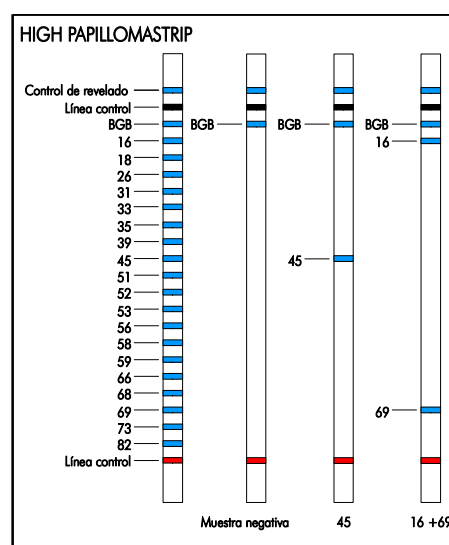
RESULTADOS

El kit High PapillomaStrip permite la detección y genotipado de 19 de los HPV's anogenitales de medio-alto riesgo más frecuentes: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73 y 82. Las bandas obtenidas en cada tira se interpretan con ayuda de una plantilla.

Una muestra de ADN podrá dar como resultado:

- Sólo la banda control (β -globina): ninguno de los 19 HPV's que se detectan con el kit está presente o ha podido ser amplificado.
- La banda control y una banda asociada a un tipo determinado de HPV: muestra positiva para ese determinado HPV.
- La banda control y varias bandas asociadas a diversos HPV's: muestra positiva con infección múltiple.
- Una o varias bandas asociadas a diversos HPV's: muestra positiva con infección por uno o varios HPV's en la que el gen de la β -globina no amplifica. Esto puede suceder, por ejemplo, cuando la muestra presenta un elevado número de copias de uno o varios virus, ya que las condiciones de PCR se han diseñado para favorecer la amplificación del ADN del HPV frente a la del control interno.

Ejemplos de genotipado utilizando la tira High PapillomaStrip



CONTROL DE CALIDAD

La línea control de revelado debe aparecer siempre por encima de la línea negra superior. Su ausencia será indicativa de problemas en la fase de hibridación/revelado del producto.

La tira correspondiente al control de amplificación negativo mostrará únicamente la línea de control de revelado. En el caso de muestras negativas, es necesaria la presencia de la banda asociada al control interno (β -globina) para confirmar que se trata de un verdadero negativo. La ausencia de esta banda en una muestra negativa es indicativa de ausencia de amplificación durante la PCR, lo que puede estar causado por falta de ADN (medir concentración), por su degradación o por la presencia de inhibidores de la PCR en el mismo (hemoglobina, restos de sales, etc).

PRESTACIONES / EVALUACIONES INTERNAS Y EXTERNAS

La utilización de este test está limitada a profesionales cualificados y familiarizados con métodos de Biología Molecular.

Se ha evaluado el test con numerosas muestras de ADN procedentes de frotis cervicouterinos, extraídas con diferentes protocolos, con resultados satisfactorios. El test se ha empleado también con éxito para el análisis de la presencia de HPV en frotis de pene.

Evaluación nº 1

Se ha comparado la sensibilidad y especificidad de High PapillomaStrip con las del test HC2 HPV DNA de Digene/Qiagen. Para ello se analizaron un total de 50 muestras de exudados cervico-vaginales con ambos métodos y se comprobaron los resultados mediante amplificación con primers individuales y específicos de cada uno de los HPV detectados, seguida de análisis en gel de agarosa e hibridación con sondas específicas.

Las muestras de exudados cervico-vaginales se trataron según el protocolo del test HC2 HPV DNA (desnaturalización mediante adición de NaOH). Una vez realizado el test de Digene, se procedió a la purificación de ADN de dichas muestras mediante el empleo de columnas de sílice (QuiAprep Spin MiniPrep kit, Qiagen). Estas muestras de ADN se emplearon directamente para el análisis con tres lotes diferentes de High PapillomaStrip.

Los resultados de concordancia de sensibilidad y especificidad se muestran en la siguiente tabla:

		+ (42)	- (8)	Total
High PapillomaStrip	+	41	0	41
	-	1	8	9
	Total	42	8	50

Concordancia de sensibilidad = 97,6 %
Concordancia de especificidad > 99 %
Porcentaje de concordancia = 98 %

		+ (42)	- (8)	Total
Digene	+	31	0	31
	-	11	8	19
	Total	42	8	50

Concordancia de sensibilidad = 73,8 %
Concordancia de especificidad > 99 %
Porcentaje de concordancia = 78 %

Evaluación nº 2

Se ha comparado la sensibilidad y especificidad de High PapillomaStrip con el test CLART *Papillomavirus* Humano de Genómica (Grupo Zeltia). El estudio fue realizado en el Centro de Análisis Genéticos C.A.G.T. (Zaragoza). Para ello, se analizaron un total de 99 muestras de exudados cervico-vaginales con ambos métodos y se comprobaron los resultados mediante amplificación con primers individuales y específicos de cada uno de los HPV detectados, seguida de análisis en gel de agarosa e hibridación con sondas específicas.

Se extrajo ADN de las muestras de exudados cervico-vaginales según el protocolo del kit CLART *Papillomavirus* Humano. Estas muestras de ADN se emplearon tanto en el análisis con el microarray como para el análisis con High PapillomaStrip.

Los resultados de concordancia de sensibilidad y especificidad se muestran en la siguiente tabla:

		+	-	Total
		(59)	(40)	
High PapillomaStrip	+	57	0	57
	-	2	40	42
	Total	59	40	99

Concordancia de sensibilidad = 96,6 %
 Concordancia de especificidad > 99 %
 Porcentaje de concordancia = 98 %

		+	-	Total
		(59)	(40)	
CLART	+	53	0	53
	-	6	40	46
	Total	59	40	99

Concordancia de sensibilidad = 89,8%
 Concordancia de especificidad > 99 %
 Porcentaje de concordancia = 94 %

El porcentaje de detección y los resultados de concordancia de sensibilidad para cada subtipo de HPV dentro del grupo de muestras analizado fue:

HPV	Porcentaje de detección en la muestra		Concordancia de sensibilidad		HPV	Porcentaje de detección en la muestra		Concordancia de sensibilidad	
	High Papilloma Strip	Microarray CLART HPV	High Papilloma Strip	Microarray CLART HPV		High Papilloma Strip	Microarray CLART HPV	High Papilloma Strip	Microarray CLART HPV
16	16,1	14,1	94,1	82,3	53	5	6,1	71,4	85,7
18	3	3	100	100	56	12,1	6,1	100	50
26	0	0	--	--	58	7,1	9,1	77,8	100
31	5	5	100	100	59	7,1	5	100	71,4
33	4	4	100	100	66	13,1	13,1	92,9	92,9
35	3	2	100	66,7	68	7,1	3	100	42,9
39	2	0	100	0*	69	0	0	--	--
45	0	0	--	--	73	4	1	100	25
51	6,1	7,1	85,7	100	82	4	4	100	100
52	9,1	7,1	100	77,8					

*Dato obtenido con sólo 2 muestras positivas.

POSIBLES PROBLEMAS

1. No aparece ninguna banda en la tira, incluida la banda control.

- No se han equilibrado a temperatura ambiente el conjugado y/o revelador.
- No se ha añadido el conjugado y/o revelador, o se han añadido en poca cantidad.

2. Sólo aparece la línea de la sonda control.

- Fallo de amplificación de la PCR (comprobar en gel de agarosa).
- No se ha añadido la PCR, o se ha añadido en menor cantidad, en el paso de hibridación.
- Temperatura incorrecta del tampón de hibridación/lavado 1 (superior a la indicada).
- Temperatura incorrecta del incubador (superior a la indicada).

3. Fuerte color de fondo en la tira tras el revelado.

- Los pasos de lavado no se realizaron de manera adecuada (tiempo inadecuado, cantidad de tampón menor, tampones fríos).

4. Tinción no homogénea de la tira.

- Agitación inadecuada (revisar la programación del termoagitador para placas).
- Las tiras no quedaron sumergidas por completo durante las incubaciones.

5. Resultados inesperados

- Temperatura de incubación y/o de los tampones/reactivos inadecuadas.
- Contaminación en las PCRs (comprobar con un control negativo).
- Contaminación de canales adyacentes por paso de líquido de un canal a otro al añadir el tampón de hibridación.

En el siguiente gráfico se muestran en gris los rangos de temperatura de trabajo (hibridación/revelado; prueba realizada con el termoagitador PST-60HL) con los cuales se obtienen resultados adecuados en cada una de las bandas (buena intensidad de hibridación, sin reacción entrecruzada):

	39 °C	40 °C	41 °C	42 °C	43 °C	44 °C	45 °C		39 °C	40 °C	41 °C	42 °C	43 °C	44 °C	45 °C
SBG								S52							
S16								S53							
S18								S56							
S26								S58							
S31								S59							
S33								S66							
S35								S68							
S39								S69							
S45								S73							
S51								S82							

SENSIBILIDAD

Se ha determinado la sensibilidad de detección de High PapillomaStrip para cada uno de los HPVs detectados en el kit.

Para ello, se prepararon plásmidos de las regiones E6-E7 de los 19 HPVs en el vector pGemT. La concentración de cada plásmido se cuantificó mediante espectrofotometría a 260 nm y la sensibilidad de detección de High PapillomaStrip para cada HPV se determinó mediante el análisis, con tres lotes diferentes de producto, de diluciones 1/10 de los distintos plásmidos en un ADN control negativo.

Los resultados de sensibilidad obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Subtipo de HPV	Sensibilidad		Subtipo de HPV	Sensibilidad	
	Concentración (pg/μl)	pg por PCR		Concentración (pg/μl)	pg por PCR
HPV16	0,0002	0,001	HPV53	0,00002	0,0001
HPV18	0,0002	0,001	HPV56	0,00002	0,0001
HPV26	0,00002	0,0001	HPV58	0,0002	0,001
HPV31	0,00002	0,0001	HPV59	0,0002	0,001
HPV33	0,00002	0,0001	HPV66	0,0002	0,001
HPV35	0,00002	0,0001	HPV68	0,0002	0,001
HPV39	0,0002	0,001	HPV69	0,0002	0,001

Subtipo de HPV	Sensibilidad	
	Concentración (pg/μl)	pg por PCR
HPV45	0,00002	0,0001
HPV51	0,0002	0,001
HPV52	0,00002	0,0001

Subtipo de HPV	Sensibilidad	
	Concentración (pg/μl)	pg por PCR
HPV73	0,00002	0,0001
HPV82	0,002	0,01

ESPECIFICIDAD

Se ha comprobado la ausencia de reacción entrecruzada con los siguientes patógenos:

Escherichia coli	Ureaplasma urealyticum	HPV67
Neisseria gonorrhoeae tipo I	Mycoplasma genitalium	HPV70
Neisseria gonorrhoeae tipo II/III	HPV6	HPV71
Herpes simplex 1	HPV11	HPV72
Herpes simplex 2	HPV40	HPV74
Haemophilus ducreyi	HPV42	HPV81
Trichomonas vaginalis	HPV43	HPV83
Streptococcus agalactiae	HPV44	HPV84
Staphylococcus aureus mecA (-)	HPV54	HPV91
Staphylococcus aureus mecA (+)	HPV61	
Cándida albicans	HPV62	

EFFECTO HOOK

Se ha evaluado el funcionamiento del kit High PapillomaStrip en presencia de cantidades crecientes de ADN plasmídico (hasta 100 ng). No se ha observado efecto de inhibición de la PCR, ni reducción de la intensidad de las bandas obtenidas, ni aparición de problemas de reacción entrecruzada. No existe, por lo tanto, efecto Hook.

PRECISIÓN INTRAENSAYO

Se ha estudiado la precisión intraensayo de High PapillomaStrip mediante el análisis de, por un lado, 5 curvas de sensibilidad (diluciones 1/10 de un ADN control compuesto por una mezcla de plásmidos de los 19 HPVs detectados con el kit) y, por otro lado, cinco réplicas de cinco muestras de ADN obtenidas a partir de frotis cervico-vaginales.

En general, el kit High PapillomaStrip ha demostrado tener una buena precisión intraensayo. Tanto en la prueba realizada con curvas de diluciones (donde se amplifican todos los HPVs detectados de forma simultánea) como en la prueba realizada con muestras reales, se observa una muy buena reproducibilidad con muestras de intensidad media, normal o fuerte y una ligera variabilidad en las muestras cercanas al límite de detección de los diferentes HPVs.

PRECISIÓN INTERDÍA

Se ha estudiado la precisión interdía de High PapillomaStrip mediante el análisis de 5 curvas de sensibilidad (diluciones 1/10 de un ADN control compuesto por una mezcla de plásmidos de los 19 HPVs detectados con el kit). Cada curva de sensibilidad fue realizada por una misma persona, utilizando un mismo lote de producto y a lo largo de cinco días consecutivos.

En general, el kit High PapillomaStrip muestra una buena reproducibilidad variando el día. Al igual que en la precisión intraensayo, se observa una muy buena reproducibilidad con muestras de intensidad media, normal o fuerte y una ligera variabilidad en las muestras cercanas al límite de detección de los diferentes HPV.

PRECISIÓN INTERLABORATORIO

Se ha estudiado la precisión interlaboratorio mediante el análisis de 3 curvas de sensibilidad (diluciones 1/10 de un ADN control compuesto por una mezcla de plásmidos de los 19 HPV detectados con el kit). Cada curva fue realizada por una persona diferente, en el mismo día y utilizando el mismo lote de producto.

En general, el kit High PapillomaStrip muestra una buena reproducibilidad variando el operador y condiciones. Las mayores divergencias se encuentran, al igual que sucede en el resto de las pruebas realizadas con este tipo de muestras (mezclas de todos los HPV detectados), en las diluciones cercanas al límite de sensibilidad de cada HPV.

PRECISIÓN INTERLOTE

Se ha estudiado la precisión interlote del kit High PapillomaStrip mediante el análisis, con tres lotes diferentes del producto, de una curva de sensibilidad (diluciones 1/10 de un ADN control compuesto por una mezcla de plásmidos de los 19 HPV detectados con el kit) y de 19 muestras de plásmidos de cada uno de los HPV detectados con el kit.

En general, el kit High PapillomaStrip ha mostrado una buena precisión interlote. Los resultados obtenidos con las 19 muestras de plásmidos fueron idénticos en todos los casos; los resultados obtenidos en las curvas de sensibilidad, al igual que en el resto de las pruebas de precisión, han demostrado una muy buena reproducibilidad con muestras de intensidad media, normal o fuerte y una ligera variabilidad en las muestras cercanas al límite de detección de los diferentes HPV.



HIGH PAPILOMASTRIP

Test for the detection of 19 medium-high risk anogenital HPVs

INTENDED USE

The High PapillomaStrip test is a test based on the reverse blot technique that allows qualitative detection in DNA samples from cervico-uterine smears or biopsies, of 19 human *Papillomavirus* subtypes of medium-high risk: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73 y 82 (MM4 and IS39).

Take also under consideration other parameters such as symptoms or clinical history when giving the final diagnosis.

PRINCIPLE

High PapillomaStrip kit is based on the principle of reverse hybridization and allows for the detection and identification of 19 medium-high risk genital HPVs in DNA samples from cervico-uterine smears or biopsies.

Human *Papillomavirus* (HPV) is responsible for a variety of skin and mucosa disorders. The clinical manifestations may vary according to the anatomic location of the lesion and the type of HPV involved. To date, over 100 different HPV genotypes have been described, of which more than 40 infect the anogenital tract. Of these, approximately 1/3 is associated with cervical cancer and anal neoplasm. The anogenital HPVs are generally divided into two categories: those with a low oncogenic potential risk (Low-Risk Group) and those with a medium-high oncogenic potential risk (Medium-High-Risk Group). The high-risk HPVs are generally associated with high-grade precancerous lesions and invasive cancer, while low-risk HPVs are frequently found in asymptomatic or benign conditions such as genital warts (1, 2).

The most common types of HPV are:

- Medium-high risk: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73 and 82.
- Low risk: 6, 11, 34, 40, 42, 43, 44.

The HPV virus contains a single molecule of circular double stranded DNA of approximately 8 Kb. Three regions can be distinguished: a region regulating the transcription and replication processes (URR), a gene region of "early" expression encoding proteins involved in transcription, transformation and replication (E1-E2-E5-E6-E7) and a gene region of "late" expression encoding structural proteins (L1-L2-E4).

Currently, the diagnosis of HPV infection is based on viral DNA detection. The presence of conserved regions in different portions of viral DNA has allowed for the development of consensus primers, such as the systems MY09-MY11 (L1 region), PGMY09-PGMY11 (L1 region), Gp5+-Gp6+ (L1 region), SPF10 (L1 region) and LCR-E7 (E7 region), that enable the detection of a wide spectrum of different HPV genotypes. However, the differences in the oncogenic potential of HPVs make it necessary to identify the type of HPV present in the sample, for which different techniques are used: restriction analysis, sequencing, ELISA, reverse hybridization or microarrays (3, 4, 5, 6, 7, 8).

The procedure of High PapillomaStrip kit consists in three steps: a) DNA extraction, b) amplification by PCR and c) hybridization/developing.

a) DNA extraction

Reagents not included in the kit.

Any standard DNA purification protocol can be used.

b) Amplification by PCR

High PapillomaStrip kit includes all reagents required for the amplification of regions E6-E7 from the 19 HPVs detected by this kit. Since the expression of the E6-E7 genes is directly associated with carcinogenesis, this region has been selected as the detection of these targets may provide significant biological and pathological information. Furthermore, some studies show the existence of a gene deletion process in region L1. This deletion occurs when DNA from high-risk HPV integrates into the epithelial regions, and it has been described that it occurs in approximately 30% of the cases of cervical cancer samples positive for E6 region (9, 10).

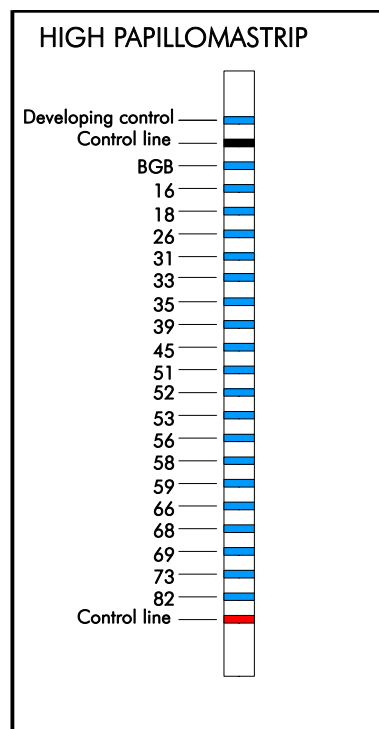
Specific primers are used for each of the 19 HPVs in order to avoid problems that may occur with consensus primers for preferred amplification of any particular subtype.

During PCR, the amplification of a control gen (β -globin) also occurs, acting as an indicator of the absence of PCR inhibitors in the amplified DNA sample.

c) Hybridization and developing

At this stage there is a specific binding of DNA fragments amplified during the PCR reaction to a series of probes deposited on nylon membranes.

Probes for each HPV detected are covalently linked to the membrane, along with a probe for the amplification control (β -globin, BGB), a probe for the developing control and two lines, one black and one red, to control the positioning of the strip and as an aid in the interpretation of results (see attached diagram).



The detection of the fragments hybridized to different probes is performed using a conjugate (streptavidin-peroxidase) that binds to a biotin label that is added to the DNA fragments amplified during the PCR. Following the addition of a substrate for the peroxidase (TMB) a blue precipitate generates where hybridization has occurred.

As final result of the test, a band pattern is obtained which is interpreted with the aid of a control strip.

MATERIALS PROVIDED WITH THE KIT

HIGH PAPILOMASTRIP			16-test Kit
	Membranes	STRIPS	16 tests
	8-channel trays	PL	2
PCR Reagents REAG PCR	PCR Mix	REAG PCR MIX	0.8 ml
	Primers	REAG PRIMER	0.11 ml
	Taq	REAG TAQ HS	0.050 ml
	Denaturant	SOLN DN	1 ml
	Hybridization Buffer	BUF HYB	60 ml
	Wash Buffer 1	BUF WASH 1	100 ml
	Conjugate	CONJ HRP	60 ml
	Wash Buffer 2	BUF WASH 2	130 ml
	Substrate	SUBS TMB	30 ml
	Instructions of use		1
	Interpretation chart		1

MATERIALS NOT INCLUDED IN THE KIT

The following additional material is required when using the kit:

1. Microtubes for PCR
2. Micropipettes and micropipette tips (sterile or UV-irradiated and ideally with a filter)
3. Tweezers and a pencil (optional)
4. Chronometer
5. Thermometer

REQUIRED EQUIPMENTS FOR KIT DEVELOPMENT

1. Thermoshakers for plates
The kit has been validated with the following thermoshakers: PST-60HL (Biosan S.L.), Profiblot T30 y T48 (Tecan), Autoblot 3000H (medTEC), TENDIGO (Fujirebio), Dynablot Heat (Dynex).
2. Thermocycler
The following thermocyclers have been successfully used with the kit: PTC-100 (MJ Research), MJ Mini Gradient Thermal Cycler (BioRad), Mastercycler Personal (Eppendorf), S1000 Thermal Cycler (BioRad).
3. BLOTriX S1 or BLOTriX R2 scanner (BioSciTec, optional).

PRECAUTIONS

1. Only use the reagents *in vitro*.
2. Strictly follow the instructions provided. Modifying any of the prescribed **steps or temperatures** may severely affect the test results.
3. All the materials and reagents used must be free of DNAses. The use of filtered pipette tips is recommended for PCR preparation to prevent aerosol contamination. Ensure that all the usual precautions are taken in the preparation of the amplifications. Use autoclaved material for the hybridization/development process.
4. Store the kit components as indicated in the instructions.
5. Do not exchange components from kits with different lot numbers.
6. Do not use kit components after the expiration dates.

7. Strips are for single-use.
8. Supplied trays are for single-use.
9. Each channel of the supplied trays is for just one strip.
10. If the package is broken, the product can still be used providing none of the components have been damaged.
11. The used product should be discarded in compliance with current legislation.
12. Patient samples must always be treated as potentially infectious. Environmental and safety standards must be adhered to.
13. Once it is used, it is advisable to manipulate the strip taking into account the same considerations as for the sample. The strips have to be manipulated with the proper precautions and should be managed as biohazardous material.
14. The denaturation solution contains < 2% NaOH and is an irritant to both eyes and skin (H314 and P280, P305, P351, P338, P310).
15. Do not discard the external box of the kit until its content has been totally used. The external box contains essential information regarding the EC marking and component lots.

STORAGE

Store all reagents at 2-8 °C. Precipitate formation may occur in some solutions (hybridization buffer, wash buffer 1 and 2, conjugate) due to storage at 2-8 °C. These precipitates are redissolved when brought to room temperature (conjugate) or heated to 42 °C hybridization buffer and wash buffer 1 and 2).

Expiry date for all reagents is printed on the respective label.

SAMPLES

The test has been designed and validated for its use with DNA derived from cervico-uterine smears. It has also shown to perform correctly with samples from penis swabs.

For sampling use dry and sterile cotton swabs or brushes. Make sure to take sufficient sample amount, but without causing bleeding from the lesion. Put the swab into its tube, do not use any preserving medium. Store at 2-8 °C if it is to be processed within one week or at -20 °C for a later processing.

The quality and concentration of DNA extracted from cervico-uterine specimens is crucial for the proper functioning of the test. For this reason, the kit includes a control that detects the presence of PCR inhibitors in DNA (amplification of the β -globin). Additionally, we recommend measuring the concentration of DNA samples to be used, since the use of DNA samples with a concentration below 10 ng/ μ l, although showing control gene amplification, could reduce the sensitivity of the test.

Some of the DNA extraction procedures that have been evaluated with satisfactory results with High PapillomaStrip kit are:

- a) DNA extraction kit from OPERON S.A.: Ref 3.149.020.64.000, DNA extraction kit.
- b) DNA extraction with silica resins (QIAamp DNA Mini Kit; Qiagen).
- c) Extraction protocol for microarray Clart HPV2 from Genomica S.L.
- d) DNA extraction with magnetic particles.

Store the DNA samples at 2-8 °C if they are going to be used shortly after, or at -20 °C for longer periods of storage.

HIGH PAPILOMASTRIP PROCEDURE

1.- Polymerase chain reaction

PCR preparation

Important: before opening the vials with the PCR reagents centrifuge them briefly. This will ensure that all the contents will be at the bottom of the tube.

- Place the tubes required according to the number of DNAs to be amplified.
- Add to each PCR tube: 38 μ l of PCR premix + 5 μ l of primers + 2 μ l of Taq + 5 μ l of DNA. Mix. Whenever possible, keep all reagents at 2-8 °C during preparation. If several DNAs are to be amplified, it is recommended to prepare a common mixture containing all reagents, so 45 μ l mixture + 5 μ l DNA are finally added. For example:

Nr of PCRs	PCR Premix	Primers	Taq
1	38 μ l	5 μ l	2 μ l
3	133 μ l	17.5 μ l	7 μ l
5	209 μ l	27.5 μ l	11 μ l
8	342 μ l	45 μ l	18 μ l

* Always prepare an excess of the mixtures containing all PCR reagents, to compensate volume losses during pipetting process.

Due to requirements of "good laboratory practice", the user should also include a negative control (e.g. water or TE buffer) to exclude contamination and, if required, a positive control (not included in the kit).

Amplification

Regard the importance of getting a suitable concentration of the DNA to get a proper result.

Place the tubes into the cycler device (if required, add 1 drop of Nujol oil on top of every PCR reaction) and amplify DNA by the following program:

94 °C , 5 min
 40 cycles of: 94 °C, 1 min
 58 °C, 1 min
 72 °C, 1 min
 72 °C, 5 min
 4 °C

Once the PCR is finished, continue with the developing of the strip. If the samples are not to be tested immediately, they must be stored at 2-8 °C for no more than 24 hrs. For longer storage, freeze at -20 °C.

→ See the PCR preparation diagram in the Annex of the document.

2.- Strip developing

On request, Operon will provide the user with the working procedure for the specific instrument to be used for processing the strips (PST-60HL, Profiblot, Autoblot 3000H, TENDIGO or Dynablot Heat). Alternatively, please refer to the following web address:

<https://operon.es/products-protocols/>

In the denaturing step, **12.5 μ l of denaturation buffer + 12.5 μ l of PCR** will be dispensed in the tray.

The product has been tested using different work platforms. For your information, the commercial names of the work platforms used are specified, which does not imply an exclusive use of such trademarks but the work protocol. The product works correctly as long as the platform used ensures the temperature program raised for the product.

→ See the Strip developing diagram in the Annex of the document.

3.- Strip interpretation

Strip interpretation can be done visually, using the evaluation chart included in the kit (see working procedures for each instrument) or automatically, with BLOTRix R2 or BLOTRix S1scanners (BioSciTec).

On request, OPERON, S.A. will provide the user with the instructions for the automatic strip interpretation with the scanners (DO-09053004 "Instructions of use BLOTRix R2_S1"). Alternatively, please refer to the following web address:

<https://operon.es/products-protocols/>

Important: results of strips interpretation with the scanners must always be visually verified; very faint bands could be not detected by the instruments.

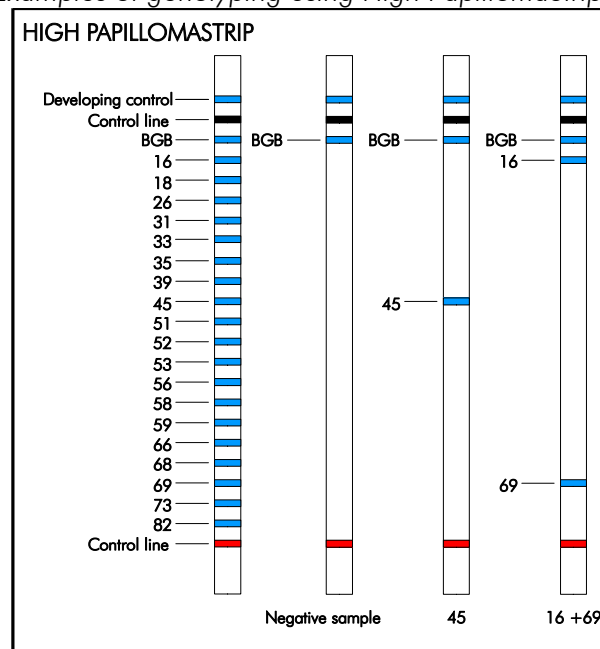
RESULTS

High PapillomaStrip kit allows for the detection and genotyping of 19 of the most common medium-high risk anogenital HPVs: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73 and 82. The bands obtained on each strip are interpreted with the aid of a chart.

A DNA sample may render the following results:

- The control band only (β -globin): none of the 19 HPVs detected by this kit is present or could be amplified.
- The control band and one band associated to a certain type of HPV: sample positive for that particular HPV.
- The control band and several bands associated to different HPVs: positive sample with multiple infection.
- One or several bands associated to different HPVs: positive sample with infection by one or several HPVs in which the β -globin gene does not amplify. This may happen, for example, when the sample has a high number of copies of one or more viruses, as the PCR conditions have been designed to favor the amplification of HPV DNA versus that of the internal control.

Examples of genotyping using High PapillomaStrip



QUALITY CONTROL

The development control line should always appear above the upper black line. Its absence will be indicative of issues encountered during the product hybridization/development stage.

The strip corresponding to the amplification negative control will show only the developing control band. For negative samples, the presence of the band associated to the internal control (β -globin) is

required to confirm that it is a true negative. The absence of this band in a negative sample is indicative of the absence of amplification during the PCR, which can be caused by lack of DNA (measure concentration), by degradation or by the presence of PCR inhibitors in the same (hemoglobin , traces of salts, etc.).

FEATURES / EXTERNAL AND INTERNAL EVALUATIONS

The use of this test is restricted to professional users that are familiar with the methods used in Molecular Biology.

The test has been evaluated with several DNA samples from cervico-uterine smears, obtained by different protocols, with satisfactory results. The test has been successfully used for the analysis of the presence of HPV in penis swabs.

Evaluation nº 1

The sensitivity and specificity of High PapillomaStrip were compared with the ones of HC2 HPV DNA test from Digene/Qiagen. For this purpose, a total of 50 samples of cervico-vaginal smears were analyzed by both methods and the results were verified by amplification with individual primers specific to each one of the HPVs detected, followed by agarose gel analysis and hybridization with specific probes.

Cervico-vaginal smears were processed according to the protocol of HC2 HPV DNA test (denaturation by addition of NaOH). Once performed the Digene test, we proceeded to the purification of DNA from these samples by using silica columns (QuiAprep Spin MiniPrep kit, Qiagen). These DNA samples were directly used for the analysis using three different High PapillomaStrip lots.

The results of sensitivity and specificity concordance are shown in the table below:

		+ (42)	- (8)	Total
High PapillomaStrip	+	41	0	41
	-	1	8	9
	Total	42	8	50
Sensitivity Concordance = 97.6 % Specificity Concordance > 99 % Concordance Percentage = 98 %				

		+ (42)	- (8)	Total
Digene	+	31	0	31
	-	11	8	19
	Total	42	8	50
Sensitivity Concordance = 73.8 % Specificity Concordance > 99 % Concordance Percentage = 78 %				

Evaluation nº 2

The sensitivity and specificity of High PapillomaStrip were compared with the Human *Papillomavirus* CLART test from Genomica (Zeltia Group). The study was performed at the Centro de Análisis Genéticos C.A.G.T. (Zaragoza). A total of 99 samples of cervico-vaginal smears were analyzed by both methods and the results were verified by amplification with individual primers specific to each one of the HPVs detected, followed by agarose gel analysis and hybridization with specific probes.

DNA was extracted from the cervico-vaginal smears according to the protocol of the Human Papillomavirus CLART kit. These DNA samples were used both for the analysis using the microarray and High PapillomaStrip.

The results on sensitivity and specificity concordance are shown in the table below:

		+ (59)	- (40)	Total
High PapillomaStrip	+	57	0	57
	-	2	40	42
	Total	59	40	99
Sensitivity Concordance = 96,6 % Specificity Concordance > 99 % Percentage of Concordance = 98 %				

		+ (59)	- (40)	Total
CLART	+	53	0	53
	-	6	40	46
	Total	59	40	99
Sensitivity Concordance = 89,8 % Specificity Concordance > 99 % Percentage of Concordance = 94 %				

The percentage of detection and results on sensitivity concordance of each HPV subtype within the set of samples tested was:

HPV	Detection percentage in sample		Sensitivity concordance		HPV	Detection percentage in sample		Sensitivity concordance	
	High PapillomaS trip	Microarray CLART HPV	High Papilloma Strip	Microarray CLART HPV		High Papilloma Strip	Microarray CLART HPV	High Papilloma Strip	Microarray CLART HPV
16	16,1	14,1	94,1	82,3	53	5	6,1	71,4	85,7
18	3	3	100	100	56	12,1	6,1	100	50
26	0	0	--	--	58	7,1	9,1	77,8	100
31	5	5	100	100	59	7,1	5	100	71,4
33	4	4	100	100	66	13,1	13,1	92,9	92,9
35	3	2	100	66,7	68	7,1	3	100	42,9
39	2	0	100	0*	69	0	0	--	--
45	0	0	--	--	73	4	1	100	25
51	6,1	7,1	85,7	100	82	4	4	100	100
52	9,1	7,1	100	77,8					

*Result obtained with only two positive samples.

POTENTIAL ISSUES

1. No bands appear on the strip, including the control band.

- The conjugate and/or developer were not balanced at room temperature.
- The conjugate and/or developer were not added, or were added in too small quantity.

2. Only the control band appears

- PCR amplification has failed (check with an agarose gel).
- The PCR was not added, or was added in too small quantity in the hybridization step.
- Incorrect hybridization or wash 1 buffers temperature (higher than instructed).
- Incorrect incubator temperature (higher than instructed).

3. The strip has a strong background colour following development

- The washing steps were not performed effectively (wrong timing, buffer quantity too small, cold buffers).

4. Non-homogenous strip staining

- Inadequate shaking (please review the plate thermo-shaker programme).
- The strips were not entirely submerged during the incubations.

5. Unexpected results

- Inadequate incubation and/or buffer/reagent temperatures.
- PCR contamination (verify using a negative control).
- Contamination of adjacent channels owing to the transfer of liquid from one channel to another when adding the hybridization buffer.

The following table displays in gray the working temperature ranges (hybridization/developing; test performed using the PST-60HL thermoshaker) with which adequate results are obtained for each band (good hybridization intensity, no cross-reaction):

	39 °C	40 °C	41 °C	42 °C	43 °C	44 °C	45 °C
SBG							
S16							
S18							
S26							
S31							
S33							
S35							
S39							
S45							
S51							

	39 °C	40 °C	41 °C	42 °C	43 °C	44 °C	45 °C
S52							
S53							
S56							
S58							
S59							
S66							
S68							
S69							
S73							
S82							

SENSITIVITY

The detection sensitivity of High PapillomaStrip for each of the HPVs detected by the kit was determined.

For this purpose, plasmids of regions E6-E7 from the 19 HPVs were prepared in the pGemT vector. The concentration of each plasmid was quantified by spectrophotometry at 260 nm and the High PapillomaStrip detection sensitivity for each HPV was determined by the analysis, using three different lots of product, of 1/10 dilutions of the different plasmids in a negative control DNA.

Sensitivity results obtained are shown in the following table:

HPV Subtype	Sensitivity	
	Concentration (pg/ µl)	pg per PCR
HPV16	0,0002	0,001
HPV18	0,0002	0,001
HPV26	0,00002	0,0001
HPV31	0,00002	0,0001
HPV33	0,00002	0,0001
HPV35	0,00002	0,0001
HPV39	0,0002	0,001
HPV45	0,00002	0,0001
HPV51	0,0002	0,001
HPV52	0,00002	0,0001

HPV Subtype	Sensitivity	
	Concentration (pg/ µl)	pg per PCR
HPV53	0,00002	0,0001
HPV56	0,00002	0,0001
HPV58	0,0002	0,001
HPV59	0,0002	0,001
HPV66	0,0002	0,001
HPV68	0,0002	0,001
HPV69	0,0002	0,001
HPV73	0,00002	0,0001
HPV82	0,002	0,01

SPECIFICITY

The absence of reaction was checked with the following pathogens:

Escherichia coli	HPV6	HPV74
Neisseria gonorrhoeae tipo I	HPV11	HPV81
Neisseria gonorrhoeae tipo II/III	HPV40	HPV83
Herpes simplex 1	HPV42	HPV84
Herpes simplex 2	HPV43	HPV91

Haemophilus ducreyi	HPV44	
Trichomonas vaginalis	HPV54	
Streptococcus agalactiae	HPV61	
Staphylococcus aureus mecA (-)	HPV62	
Staphylococcus aureus mecA (+)	HPV67	
Cándida albicans	HPV70	
Ureaplasma urealyticum	HPV71	
Mycoplasma genitalium	HPV72	

HOOK EFFECT

The performance of High PapillomaStrip kit in the presence of increasing amounts of plasmidic DNA (up to 100 ng) was evaluated. No PCR inhibition effect, or reduction in the intensity of the bands obtained, or problems arising from cross-reaction were observed. Therefore, there is no hook effect.

INTRA-ASSAY PRECISION

The intra-assay precision of High PapillomaStrip has been studied examining, first, 5 sensitivity curves (1/10 dilutions of a control DNA consisting of a mixture of plasmids of the 19 HPVs detected by the kit) and on the other side, five replicates of five DNA samples obtained from cervico-vaginal smears.

Overall, High PapillomaStrip kit has shown a good intra-assay precision. Both the test performed with dilution curves (where all detected HPVs are amplified simultaneously) and the test using actual samples, show a very good reproducibility for samples of medium, normal or strong intensity and a slight variation in samples near the limit of detection of the different HPVs.

INTER-DAY PRECISION

The inter-day precision of High PapillomaStrip has been studied examining 5 sensitivity curves (1/10 dilutions of a control DNA consisting of a mixture of plasmids of the 19 HPVs detected by the kit). Each sensitivity curve was constructed by the same operator, using the same product lot and over five consecutive days.

Overall, High PapillomaStrip kit shows a good reproducibility varying the day. As in the intra-assay precision, a very good reproducibility for samples of medium, normal or strong intensity and a slight variability for the samples near the limit of detection of the different HPVs can be observed.

INTER-LAB PRECISION

The inter-lab precision has been studied examining 3 sensitivity curves (1/10 dilutions of a control DNA consisting of a mixture of plasmids of the 19 HPVs detected by the kit). Each curve was constructed by a different operator, on the same day and using the same product lot.

Overall, the High PapillomaStrip kit shows a good reproducibility varying the operator and the conditions. The largest differences are found, as for the rest of the tests performed with these samples (mixtures of all detected HPVs), in the dilutions near the limit of sensitivity of each HPV.

INTER-LOT PRECISION

The inter-lot precision of High PapillomaStrip kit has been studied by the analysis using three different product lots of a sensitivity curve (1/10 dilutions of a control DNA consisting of a mixture of plasmids of the 19 HPVs detected by the kit) and 19 plasmid samples from each of the HPVs detected by this kit.

Overall, High PapillomaStrip kit has shown a good inter-lot precision. The results obtained for the 19 plasmid samples were identical in all cases, the results of the sensitivity curves, as in the rest of the precision tests, have demonstrated a very good reproducibility for samples of medium, normal or strong intensity and a light variability for the samples near the limit of detection of the different HPVs.

IT

HIGH PAPILOMASTRIP

Test per la geno di 19 HPV anogenitali a medio-alto rischio

USO PREVISTO

Il test High PapillomaStrip è un test basato sulla tecnica del blot inverso che permette l'identificazione qualitativa, in campioni di DNA provenienti da striscio o biopsia cervicale, di 19 sottotipi del virus del papilloma umano (*Papillomavirus*) a medio-alto rischio: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73 e 82 (MM4 e IS39).

Per formulare una diagnosi, si prega di tenere in considerazione anche altri aspetti come i sintomi mostrati e la storia clinica del paziente.

FONDAMENTO

Il kit High PapillomaStrip è basato sul principio dell'ibridazione inversa e permette il rilevamento e l'identificazione di 19 HPV genitali a medio-alto rischio in campioni di DNA provenienti da striscio o biopsia cervicale.

Il virus del papilloma umano (HPV) è responsabile di una varietà di disturbi della pelle e della mucosa. Le manifestazioni cliniche variano in funzione della localizzazione anatomica della lesione e del tipo di HPV coinvolto. Ad oggi, sono stati descritti oltre 100 genotipi diversi di HPV, dei quali più di 40 infettano il tratto anogenitale. Tra questi, circa 1/3 sono associati al cancro del collo dell'utero e a neoplasie anali. Gli HPV anogenitali vengono generalmente suddivisi in due categorie: quelli con potenziale rischio oncogeno basso (gruppo a basso rischio) e quelli con potenziale rischio oncogeno medio-alto (gruppo ad medio-alto rischio). Gli HPV ad alto rischio sono generalmente associati a lesioni precancerose di alto grado e a cancro invasivo, mentre gli HPV a basso rischio solitamente si riscontrano in condizioni asintomatiche o benigne come le verruche vaginali (1, 2).

Tra i tipi di HPV più frequenti si annoverano:

1. Rischio medio-alto: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73 e 82.
2. Rischio basso: 6, 11, 34, 40, 42, 43, 44.

L'HPV è un virus che contiene un'unica molecola circolare di DNA a doppio filamento di circa 8 Kb, in cui è possibile distinguere tre regioni: una regione di regolazione dei processi di trascrizione e replicazione (URR), una regione genica a espressione "precoce" che codifica proteine coinvolte nella trascrizione, trasformazione e replicazione (E1-E2-E5-E6-E7) e una regione genica a espressione "tardiva" che codifica per proteine strutturali (L1-L2-E4).

Attualmente, la diagnosi di infezione da HPV si basa sul rilevamento del DNA virale. La presenza di regioni conservate in diverse parti del DNA virale ha permesso lo sviluppo di primer consenso, quali i sistemi MY09-MY11 (regione L1), PGMY09-PGMY11 (regione L1), Gp5+-Gp6+ (regione L1), SPF10 (regione L1) e LCR-E7 (regione E7), che permettono il rilevamento di un ampio spettro di genotipi diversi di HPV. Tuttavia, le differenze tra gli HPV in termini di potenziale oncogeno rendono necessaria l'identificazione del tipo di HPV presente nel campione, che si esegue attraverso tecniche diverse: analisi di restrizione, sequenziamento, Elisa, ibridazione inversa o microarray (3, 4, 5, 6, 7, 8).

La procedura del kit High Papillomastrip prevede tre fasi: a) estrazione del DNA b) amplificazione tramite PCR e c) ibridazione/rivelazione.

a) Estrazione del DNA

Reagenti non inclusi nel kit.

Può essere utilizzato qualsiasi protocollo standard di purificazione.

b) Amplificazione tramite PCR

Nel kit High PapillomaStrip sono inclusi i reagenti necessari per eseguire l'amplificazione delle regioni E6-E7 dei 19 HPV che il kit permette di rilevare. Questa regione è stata selezionata in virtù del fatto che l'espressione dei geni E6-E7 è direttamente associata alla cancerogenesi, per cui il rilevamento di questi target può fornire informazioni importanti a livello biologico e patologico. Inoltre, vi sono studi che dimostrano l'esistenza di un processo di delezione genica della regione L1. Questa delezione si produce quando il DNA dell'HPV ad alto rischio si integra nelle regioni epiteliali, un evento che, secondo quanto riportato, avviene in circa il 30% dei casi di campioni di cancro del collo dell'utero positivi per la regione E6 (9, 10).

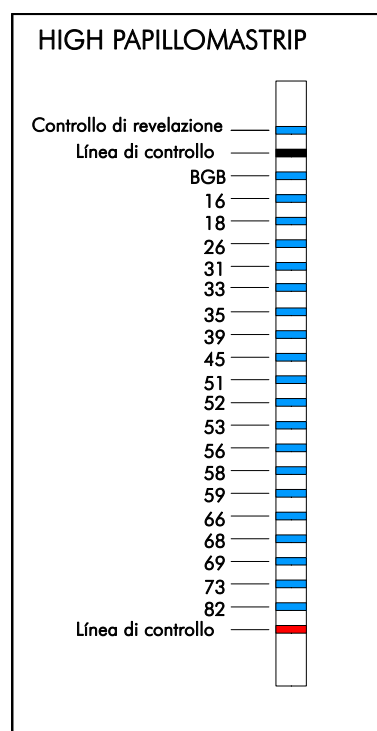
Vengono utilizzati primer specifici per ciascuno dei 19 HPV, al fine di evitare i possibili problemi associati all'uso di primer consenso che potrebbero determinare l'amplificazione preferenziale di un particolare sottotipo.

Durante la PCR viene amplificato anche un gene di controllo (β -globina), che si usa come indicatore dell'assenza di inibitori della PCR nel campione di DNA amplificato.

c) Ibridazione e rivelazione

In questa fase ha luogo il legame specifico tra i frammenti di DNA amplificati durante la PCR e una serie di sonde depositate su membrane di nylon.

Sulle membrane è legata con legame covalente una sonda per ciascun HPV rilevato, oltre a una sonda per il controllo dell'amplificazione (β -globina, BGB), una sonda di controllo della rivelazione e due linee, una nera e una rossa, per il controllo del posizionamento della striscia e come ausilio per l'interpretazione dei risultati (vedere la figura qui di seguito).



Il rilevamento dei frammenti ibridati con le diverse sonde si esegue utilizzando un coniugato (streptavidina-perossidasi) che si lega a una marcatura di biotina incorporata durante la PCR nei frammenti di DNA amplificato. Dopo l'aggiunta di un substrato della perossidasi (TMB), si genera un

precipitato di colore blu nei siti in cui è avvenuta l'ibridazione. Come risultato finale del test si ottiene un pattern di bande da interpretare con l'ausilio della striscia di controllo.

MATERIALI INCLUSI NEL KIT

HIGH PAPILLOMASTRIP			Kit 16 tests
	Membrane	STRIPS	16 tests
	Vaschetta 8 canali	PL	2
Reagenti per PCR REAG PCR	Mix di PCR	REAG PCR MIX	0,8 ml
	Primer	REAG PRIMER	0,11 ml
	Taq	REAG TAQ HS	0,050 ml
	Denaturante	SOLN DN	1 ml
	Tampone di ibridazione	BUF HYB	60 ml
	Tampone di lavaggio 1	BUF WASH 1	100 ml
	Coniugato	CONJ HRP	60 ml
	Tampone di lavaggio 2	BUF WASH 2	130 ml
	Substrato	SUBS TMB	30 ml
	Istruzioni d'uso		1
	Schema per l'interpretazione		1

MATERIALI NON INCLUSI NEL KIT

Per l'uso del kit sono necessari, inoltre, i seguenti materiali:

1. Microprovette per PCR.
2. Micropipette e punte per micropipette (sterili o irradiate con UV e, preferibilmente, con filtro).
3. Pinzette e matita (opzionale).
4. Cronometro.
5. Termometro.

APPARECCHI NECESSARI PER LO SVILUPPO DEL KIT

1. Termomixer per piastre
Il kit è stato validato con i termoagitatori: PST-60HL (Biosan S.L.), Profiblot T30 y T48 (Tecan), Autoblot 3000H (medTEC), TENDIGO (Fujirebio), Dynablot Heat (Dy nex).
2. Termociclatore
Sono stati testati con successo i termociclatori qui di seguito: PTC-100 (MJ Research), MJ Mini Gradient Thermal Cycler (BioRad), Mastercycler Personal (Eppendorf), S1000 Thermal Cycler (BioRad).
3. BLOTrix S1 or BLOTrix R2 scanner (BioSciTec, opzionale).

PRECAUZIONI

1. Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso *in vitro*.
2. Seguire rigorosamente le istruzioni fornite. La modifica di qualsiasi **punto della procedura o temperatura** può compromettere i risultati del test.
3. È essenziale che tutti i materiali utilizzati siano liberi di DNAse. Si consiglia di utilizzare puntali di pipette con filtro nella preparazione di PCR, per evitare problemi di contaminazione per

formazione di aerosol. Seguire tutte le normali precauzioni necessarie per l'amplificazione del DNA. Utilizzare materiali autoclavato per il processo di ibridazione / rilevazione.

4. Conservare i componenti del kit nelle condizioni indicate.
5. Non scambiare componenti di kit con diverso numero di lotto.
6. Non utilizzare i componenti del kit dopo la data di scadenza.
7. Le strisce reattive sono monouso.
8. La vaschetta in dotazione sono monouso.
9. Ogni canale dei vassoi in dotazione è per una sola striscia.
10. In caso di rottura della confezione, è possibile utilizzare il prodotto sempreché nessuno dei componenti risulti danneggiato.
11. Il prodotto usato deve essere smaltito in conformità con la legislazione vigente.
12. I campioni dei pazienti devono sempre essere considerati come potenzialmente infettivi. Osservare tutte le norme ambientali e di sicurezza.
13. È opportuno che la striscia viene manipolato volta aver utilizzato le stesse considerazioni con il campione. Si raccomanda di gestirlo come materiale potenzialmente pericolosa.
14. La soluzione di denaturazione contiene < 2% di NaOH ed è irritante per gli occhi e per la pelle (H314 e P280, P305, P351, P338, P310).
15. Non gettare il box esterno del kit fino a quando il suo contenuto è stato completamente utilizzato. Il box esterno contiene le informazioni essenziali per la marcatura CE e per le lotti di componenti.

CONSERVAZIONE

Conservare tutti i reagenti a 2-8 °C. A causa della conservazione a 2-8 °C, in alcune delle soluzioni (tampone di ibridazione, tamponi di lavaggio 1 e 2, coniugati) potrebbero formarsi dei precipitati. Tali precipitati si ridisciolgono durante il riscaldamento a temperatura ambiente (coniugato) o a 42 °C (tampone di ibridazione e tamponi di lavaggio 1 e 2).

La data di scadenza di tutti i reagenti è indicata sull'etichetta.

CAMPIONI

Il test è stato progettato e collaudato per l'uso con DNA ottenuto da striscio cervicale o raschiamento uterino. Il suo corretto funzionamento è stato dimostrato anche con campioni provenienti da tampone uretrale.

Per il prelievo del campione utilizzare un tampone di cotone o uno spazzolino asciutti e sterili. Assicurarsi di prelevare una quantità sufficiente di campione, ma senza provocare il sanguinamento della lesione. Conservare il tampone nel relativo tubo, senza utilizzare alcun mezzo di conservazione. Conservarlo a 2-8° se verrà trattato entro una settimana o a -20 °C se verrà trattato successivamente.

La qualità e la concentrazione del DNA estratto dai campioni cervico-uterini sono di vitale importanza per il corretto funzionamento del test. Per questo motivo, nel kit è incluso un controllo che permette di rilevare la presenza di inibitori della PCR nel DNA (amplificazione della β -globina). Inoltre, si consiglia di misurare la concentrazione dei campioni di DNA da utilizzare, in quanto l'uso di campioni di DNA con concentrazione inferiore a 10 ng/ μ l potrebbe comportare una riduzione della sensibilità del test, a prescindere dalla corretta amplificazione del gene di controllo.

Di seguito sono indicate alcune delle procedure di estrazione del DNA testate con risultati soddisfacenti con il kit High PapillomaStrip:

- a) Kit di estrazione del DNA di OPERON S.A.: rif 3.149.020.64.000, Kit de estrazione di DNA.
- b) Estrazione del DNA con resine di silice (QIAamp DNA Mini Kit; Qiagen).
- c) Protocollo di estrazione per microarray Clart HPV2 di Genomica S.L.
- d) Estrazione del DNA mediante particelle magnetiche.

Se i campioni di DNA verranno analizzati in breve tempo, conservarli a 2-8°C; per una conservazione prolungata mantenerli a -20 °C.

PROCEDURA HIGH PAPILLOMASTRIP

1.- Reazione a catena della polimerasi

Preparazione delle PCR

Importante: prima di aprire i flaconi con i reagenti PCR, centrifugare brevemente. Questo assicurerà che tutto il contenuto sarà al fondo del flacone.

- Preparare le provette per PCR necessarie in base al numero di campioni di DNA da amplificare.
- Aggiungere in ciascuna provetta per PCR: 38 μ l di premix di PCR + 5 μ l di primer + 2 μ l di Taq + 5 μ l di DNA. Mescolare. Se possibile, durante la preparazione mantenere tutti i reagenti a 2-8 °C.

In caso di amplificazione di più campioni di DNA, si consiglia di preparare una mix comune contenente tutti i reagenti, in modo da aggiungere poi 45 μ l di mix + 5 μ l di DNA. Ad esempio:

N° di PCR	Premix di PCR	Primer	Taq
1	38 μ l	5 μ l	2 μ l
3	133 μ l	17,5 μ l	7 μ l
5	209 μ l	27,5 μ l	11 μ l
8	342 μ l	45 μ l	18 μ l

* Le mix contenenti tutti i reagenti per la PCR devono essere preparate sempre in eccesso, per compensare le perdite di volume che si verificano durante il pipettamento.

Secondo la buona pratica di laboratorio, l'utente deve inoltre amplificare un controllo negativo (acqua o tampone TE, per esempio) e, se necessario, un controllo positivo (non incluso nel kit).

Amplificazione

Considerate l'importanza di ottenere una adeguata concentrazione del DNA per ottenere un risultato corretto.

Inserire le provette nell'apparecchio di PCR (se necessario, aggiungere 1 goccia di olio Nujol per ogni reazione di PCR) e amplificare il DNA con il seguente programma:

94 °C, 5 min
40 cicli di: 94 °C, 1 min
58 °C, 1 min
72 °C, 1 min
72 °C, 5 min
4 °C

Una volta terminata la PCR, continuare con lo sviluppo della striscia. Se i campioni non vengono analizzati immediatamente, conservarli a 2-8 °C per non più di 24 ore. In caso di conservazione prolungata, congelarli a -20 °C.

→ Vedere le schema di preparazione della PCR nell'allegato

2.- Sviluppo della striscia

Su richiesta, l'azienda fornirà all'utente la procedura di lavoro dipendendo dello strumento che verrà utilizzato per lo sviluppo delle strisce (PST-60HL, Profiblot, Autoblot 3000H, TENDIGO o Dynablot Heat). In alternativa, è possibile consultare il seguente indirizzo web: _

<https://operon.es/products-protocols/>

Nel denaturazione fase, 12,5 μ l di denaturazione buffer + 12,5 μ l di PCR verrà erogata nel vassoio.

Il prodotto è stato testato con diverse piattaforme di lavoro. Per vostra informazione si specificano i nomi commerciali delle piattaforme di lavoro utilizzate ma non implica l'uso esclusivo e dipendente di tali marchi commerciale. Il prodotto funziona correttamente durante l'utilizzo di una piattaforma che

garantisce il programma di temperatura sollevata per il prodotto.

→ Vedere il sviluppo della striscia nell'allegato

3.- Interpretazione della striscia

Interpretazione della striscia può essere fatta visivamente, usando il schema per l'interpretazione incluso nel kit (vedere la procedura per ogni strumento) o automaticamente, utilizzando gli scanner BLOTriX R2 o BLOTriX S1 (BioSciTec).

Su richiesta, l'azienda fornirà all'utente le istruzioni per l'interpretazione automatica delle strisce con scanner (DO-09053004 "Instructions of use BLOTriX R2_S1"). In alternativa, è possibile consultare il seguente indirizzo web:

<https://operon.es/products-protocols/>

Importante: l'interpretazione automatica del risultato richiede sempre una verifica visiva delle strisce; bande molto deboli non potrebbero essere rilevate dallo strumento.

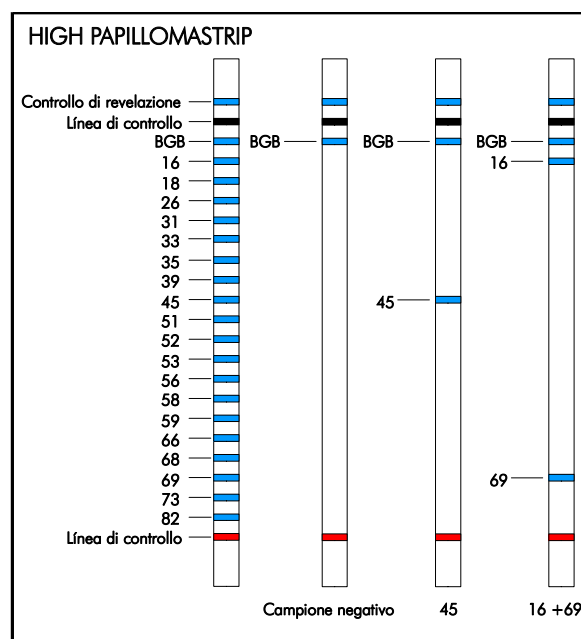
RISULTATI

Il kit High PapillomaStrip permette di rilevare ed eseguire la genotipizzazione di 19 HPV anogenitali a medio-alto rischio più frequenti. 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73 e 82. Le bande ottenute in ciascuna striscia vanno interpretate con l'aiuto di uno schema di riferimento.

Un campione di DNA potrà dare come risultato:

1. Solo la banda di controllo (β -globina): nessuno dei 19 HPV rilevabili con il kit è presente o ha potuto essere amplificato.
2. La banda di controllo e una banda associata a un determinato tipo di HPV: campione positivo per quel determinato HPV.
3. La banda di controllo e varie bande associate a diversi HPV: campione positivo con infezione multipla.
4. Una o più bande associate a diversi HPV: campione positivo con infezione da uno o più HPV, nel quale il gene della β -globina non si amplifica. Ciò può succedere, ad esempio, quando nel campione è presente un elevato numero di copie di uno o più virus, in quanto le condizioni di PCR sono state progettate per favorire l'amplificazione del DNA di HPV rispetto a quella del controllo interno.

Esempi di genotipizzazione utilizzando la striscia High PapillomaStrip



CONTROLLO DI QUALITÀ

La linea di controllo della rivelazione deve comparire sempre al di sopra della linea nera superiore. La sua eventuale assenza indicherà un problema nella fase di ibridazione/rivelazione del prodotto.

La strisce corrispondente al controllo de amplificazione negativo mostrerà soltanto la banda di controllo di rivelazione. Nel caso di campioni negativi, è necessario che sia presente la banda associata al controllo interno (β -globina) per comprovare l'effettiva negatività. L'assenza di questa banda in un campione negativo indica che durante la PCR l'amplificazione non è avvenuta. Ciò può essere causato dalla mancanza di DNA (misurare la concentrazione), dalla sua degradazione o dalla presenza di inibitori della PCR nel DNA (emoglobina, resti di sali, ecc.).

PRESTAZIONI / VALUTAZIONI INTERNE ED ESTERNE

Questo test deve essere utilizzato esclusivamente da professionisti qualificati e familiarizzati con i metodi di biologia molecolare.

Il funzionamento del test è stato comprovato con numerosi campioni di DNA provenienti da strisci cervicali, estratti con protocolli diversi, con risultati soddisfacenti. Il test è stato utilizzato con successo anche per l'analisi della presenza di HPV in tamponi uretrali.

Valutazione 1

La sensibilità e specificità di High PapillomaStrip sono state confrontate con quelle del test HC2 HPV DNA di Digene/Qiagen. A tal fine, è stato analizzato un totale di 50 campioni di essudati cervico-vaginali con entrambi i metodi e i risultati sono stati confrontati tramite amplificazione con primer individuali e specifici per ciascuno degli HPV rilevati, seguita da analisi su gel di agarosio e ibridazione con sonde specifiche.

I campioni di essudati cervico-vaginali sono stati trattati secondo il protocollo del test HC2 HPV DNA (denaturazione tramite aggiunta di NaOH). Una volta realizzato il test di Digene, è stata eseguita la purificazione del DNA di tali campioni utilizzando colonne di silice (QuiAprep Spin MiniPrep kit, Qiagen). Questi campioni di DNA sono stati usati direttamente per l'analisi con tre lotti diversi di High PapillomaStrip.

I risultati in termini di concordanza di sensibilità e specificità sono riportati nella tabella seguente:

		+ (42)	- (8)	Totale
High PapillomaStrip	+	41	0	41
	-	1	8	9
	Totale	42	8	50

Concordanza di sensibilità = 97,6%
Concordanza di specificità > 99%
Percentuale di concordanza = 98%

		+ (42)	- (8)	Totale
Digene	+	31	0	31
	-	11	8	19
	Totale	42	8	50

Concordanza di sensibilità = 73,8%
Concordanza di specificità > 99%
Percentuale di concordanza = 78 %

Valutazione 2

La sensibilità e specificità di High PapillomaStrip sono state confrontate con quelle del test CLART *Papillomavirus* Humano di Genomica (Grupo Zeltia). Lo studio è stato realizzato presso il Centro de Análisis Genéticos C.A.G.T. (Zaragoza, Spagna). A tal fine, è stato analizzato un totale di 99 campioni di essudati cervico-vaginali con entrambi i metodi e i risultati sono stati confrontati tramite amplificazione con primer individuali e specifici per ciascuno degli HPV rilevati, seguita da analisi su gel di agarosio e ibridazione con sonde specifiche.

Il DNA dei campioni di essudati cervico-vaginali è stato estratto secondo il protocollo del kit CLART *Papillomavirus* Humano. Questi campioni di DNA sono stati usati sia per l'analisi con il microarray, sia per l'analisi con High PapillomaStrip.

I risultati in termini di concordanza di sensibilità e specificità sono riportati nella tabella seguente:

		+ (59)	- (40)	Totale
High PapillomaStrip	+	57	0	57
	-	2	40	42
	Totale	59	40	99

Concordanza di sensibilità = 96,6%
 Concordanza di specificità > 99%
 Percentuale di concordanza = 98%

		+ (59)	- (40)	Totale
CLART	+	53	0	53
	-	6	40	46
	Totale	59	40	99

Concordanza di sensibilità = 89,8%
 Concordanza di specificità > 99%
 Percentuale di concordanza = 94%

La percentuale di rilevamento e i risultati in termini di concordanza di sensibilità per ciascun sottotipo di HPV all'interno del gruppo di campioni analizzato sono stati:

HPV	Percentuale di rilevamento nel campione		Concordanza di sensibilità	
	High Papilloma Strip	Microarray CLART HPV	High Papilloma Strip	Microarray CLART HPV
16	16,1	14,1	94,1	82,3
18	3	3	100	100
26	0	0	--	--
31	5	5	100	100
33	4	4	100	100
35	3	2	100	66,7
39	2	0	100	0*
45	0	0	--	--
51	6,1	7,1	85,7	100
52	9,1	7,1	100	77,8

HPV	Percentuale di rilevamento nel campione		Concordanza di sensibilità	
	High Papilloma Strip	Microarray CLART HPV	High Papilloma Strip	Microarray CLART HPV
53	5	6,1	71,4	85,7
56	12,1	6,1	100	50
58	7,1	9,1	77,8	100
59	7,1	5	100	71,4
66	13,1	13,1	92,9	92,9
68	7,1	3	100	42,9
69	0	0	--	--
73	4	1	100	25
82	4	4	100	100

*Dato ottenuto con 2 soli campioni positivi.

POSSIBILI PROBLEMI

1. Sulla striscia non compare alcuna banda, nemmeno quella di controllo.

- Non si è atteso che il coniugato e/o il rivelatore raggiungessero la temperatura ambiente.
- Il coniugato e/o il rivelatore non sono stati aggiunti o sono stati aggiunti in quantità insufficiente.

2. Compare solo la linea della sonda di controllo.

- Errore di amplificazione nella PCR (eseguire un controllo su gel di agarosio).
- Durante la fase di ibridazione il prodotto di PCR non è stato aggiunto o è stato aggiunto in quantità insufficiente.
- Temperatura non corretta del tampone di ibridazione/lavaggio 1 (superiore a quella indicata).
- Temperatura non corretta dell'incubatore (superiore a quella indicata).

3. Forte colore di fondo sulla striscia dopo la fase di rivelazione.

- La procedura di lavaggio non è stata eseguita correttamente (durata troppo breve, quantità di tampone insufficiente, tamponi freddi).

4. Colorazione non omogenea della striscia

- Agitazione inadeguata (controllare la programmazione del termomixer per piastre).
- Le strisce non sono rimaste completamente sommerse durante le incubazioni.

5. Risultati inattesi

- Temperatura di incubazione e/o dei tamponi/reagenti non corretta
- Contaminazione nelle PCR (verificare con un controllo negativo).
- Contaminazione di canali adiacenti dovuta al passaggio di liquido da un canale all'altro durante l'aggiunta del tampone di ibridazione.

Nel grafico riportato di seguito sono mostrati in grigio gli intervalli di temperatura operativa (ibridazione/rivelazione; prova realizzata con il termomixer PST-60HL) con i quali si ottengono risultati adeguati in ciascuna delle bande (buona intensità di ibridazione, assenza di reazioni crociate).

	39 °C	40 °C	41 °C	42 °C	43 °C	44 °C	45 °C		39 °C	40 °C	41 °C	42 °C	43 °C	44 °C	45 °C
SBG								S52							
S16								S53							
S18								S56							
S26								S58							
S31								S59							
S33								S66							
S35								S68							
S39								S69							
S45								S73							
S51								S82							

SENSIBILITÀ

È stata determinata la sensibilità di rilevamento di High PapillomaStrip per ciascuno degli HPV rilevabili con il kit.

A tal fine, sono stati preparati plasmidi delle regioni E6-E7 dei 19 HPV nel vettore pGemT. La concentrazione di ciascun plasmide è stata quantificata spettrofotometricamente a 260 nm e la sensibilità di rilevamento di High PapillomaStrip per ogni HPV è stata determinata mediante l'analisi, con tre lotti diversi di prodotto, di diluizioni 1/10 dei differenti plasmidi in un DNA controllo negativo.

I risultati di sensibilità ottenuti sono riportati nella tabella seguente:

Sottotipo di HPV	Sensibilità		Sottotipo di HPV	Sensibilità	
	Concentrazione (pg/μl)	pg per PCR		Concentrazione (pg/μl)	pg per PCR
HPV16	0,0002	0,001	HPV53	0,00002	0,0001
HPV18	0,0002	0,001	HPV56	0,00002	0,0001
HPV26	0,00002	0,0001	HPV58	0,0002	0,001
HPV31	0,00002	0,0001	HPV59	0,0002	0,001
HPV33	0,00002	0,0001	HPV66	0,0002	0,001
HPV35	0,00002	0,0001	HPV68	0,0002	0,001
HPV39	0,0002	0,001	HPV69	0,0002	0,001
HPV45	0,00002	0,0001	HPV73	0,00002	0,0001
HPV51	0,0002	0,001	HPV82	0,002	0,01
HPV52	0,00002	0,0001			

SPECIFICITÀ

È stato provato che non esiste reazione crociata con i patogeni riportati nella tabella seguente:

Escherichia coli	HPV16	HPV59
Neisseria gonorrhoeae tipo I	HPV18	HPV66
Neisseria gonorrhoeae tipo II/III	HPV26	HPV68
Herpes simplex 1	HPV31	HPV69
Herpes simplex 2	HPV33	HPV73
Haemophilus ducreyi	HPV35	HPV82
Trichomonas vaginalis	HPV39	
Streptococcus agalactiae	HPV45	
Staphylococcus aureus mecA (-)	HPV51	
Staphylococcus aureus mecA (+)	HPV52	
Cándida albicans	HPV53	
Ureaplasma urealyticum	HPV56	
Mycoplasma genitalium	HPV58	

EFFETTO HOOK

Il funzionamento del kit High PapillomaStrip è stato comprovato in presenza di quantità crescenti di DNA plasmidico (fino a 100 ng). Non sono stati osservati effetti di inibizione della PCR, né di riduzione dell'intensità delle bande ottenute, né comparsa di problemi di reazioni crociate. Non si verifica, pertanto, alcun effetto Hook.

PRECISIONE INTRASAGGIO

La precisione intrasaggio di High PapillomaStrip è stata studiata mediante l'analisi di, da un lato, 5 curve di sensibilità (diluizioni 1/10 di un DNA di controllo composto da una mistura di plasmidi dei 19 HPV rilevabili con il kit) e, dall'altro, cinque replicati di cinque campioni di DNA ottenuti a partire da strisci cervicali.

In generale, il kit High PapillomaStrip ha dimostrato una buona precisione intrasaggio. Sia nella prova realizzata con curve di diluizione (in cui tutti gli HPV rilevabili vengono amplificati simultaneamente), sia nella prova realizzata con campioni reali, si osserva una riproducibilità molto buona con campioni di intensità media, normale o forte e una leggera variabilità nei campioni prossimi al limite di rilevamento dei diversi HPV.

PRECISIONE INTERGIORNALIERA

La precisione intergiornaliera di High PapillomaStrip è stata studiata mediante l'analisi di 5 curve di sensibilità (diluizioni 1/10 di un DNA di controllo composto da una mistura di plasmidi dei 19 HPV rilevabili con il kit). Ogni curva di sensibilità è stata eseguita da una stessa persona, utilizzando lo stesso lotto di prodotto e in cinque giorni consecutivi.

In generale, il kit High PapillomaStrip mostra una buona riproducibilità tra un giorno e l'altro. Come per la precisione intrasaggio, si osserva una riproducibilità molto buona con campioni di intensità media, normale o forte e una leggera variabilità nei campioni prossimi al limite di rilevamento dei diversi HPV.

PRECISIONE INTERLABORATORIO

La precisione interlaboratorio è stata studiata mediante l'analisi di 3 curve di sensibilità (diluizioni 1/10 di un DNA di controllo composto da una mistura di plasmidi dei 19 HPV rilevabili con il kit). Ogni

curva è stata realizzata da una persona diversa, nello stesso giorno e utilizzando lo stesso lotto di prodotto.

In generale, il kit High PapillomaStrip mostra una buona riproducibilità al variare dell'operatore e delle condizioni. Le maggiori divergenze si riscontrano, come accade nel resto delle prove realizzate con questo tipo di campioni (misure di tutti gli HPV rilevabili), nelle diluizioni prossime al limite di sensibilità di ciascun HPV.

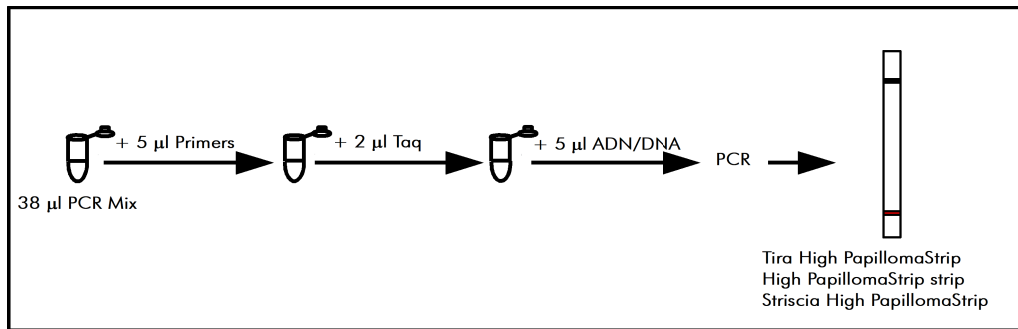
PRECISIONE INTERLOTTO

La precisione interlotto del kit High PapillomaStrip è stata studiata mediante l'analisi, con tre lotti diversi di prodotto, di una curva di sensibilità (diluizioni 1/10 di un DNA di controllo composto da una miscela di plasmidi dei 19 HPV rilevabili con il kit) e di 19 campioni di plasmidi di ciascuno degli HPV rilevabili con il kit.

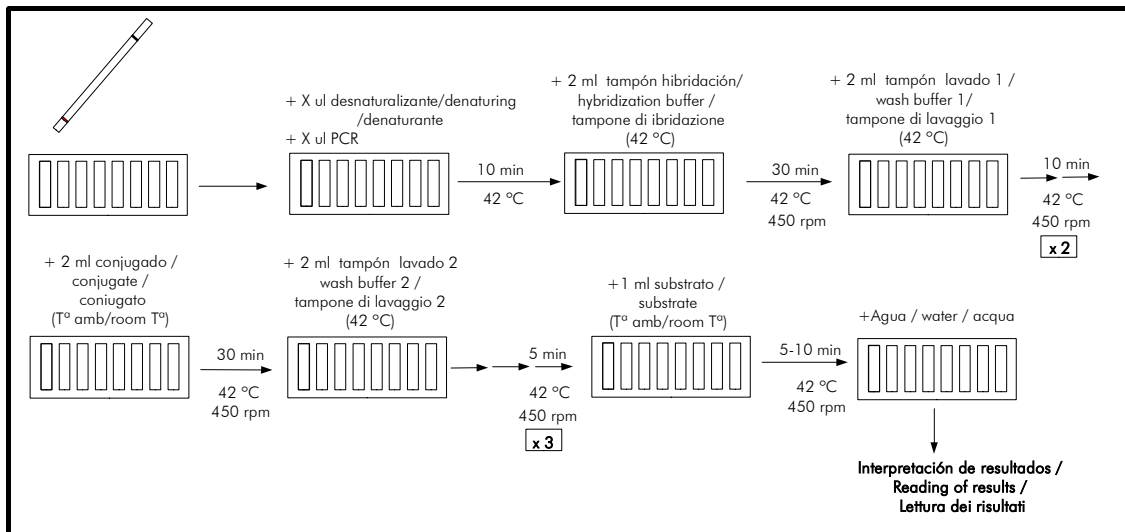
In generale, il kit High PapillomaStrip ha mostrato una buona precisione interlotto. I risultati ottenuti con i 19 campioni di plasmidi sono stati identici in tutti i casi; i risultati ottenuti con le curve di sensibilità, analogamente a quanto avvenuto nelle altre prove di precisione, hanno dimostrato una riproducibilità molto buona con campioni di intensità media, normale o forte e una leggera variabilità nei campioni prossimi al limite di rilevamento dei diversi HPV.

ANEXO / ANNEX / ALLEGATO

Esquema de preparación de PCR / PCR preparation diagram / Schema di preparazione della PCR



Desarrollo de la tira / Strip developing diagram / Sviluppo della striscia



BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHY/BIBLIOGRAFIA

1. Bosch, F.X. et al. "Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group". J. Natl. Cancer Inst. (1995). 87: 796-802.
2. Bosch, F.X. et al. "Papillomavirus research update: highlights of the Barcelona HPV 2000 international papillomavirus conference". J. Clin. Pathol. (2001). 54: 163-175.
3. Gravitt P.E. et al. "Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method". J. Clin. Microbiol. (1998). Vol 36, N° 10: 3020-3027.
4. Coutlèe F. et al. "Enhanced detection and typing of human papillomavirus (HPV) DNA in anogenital samples with PGMV primers and the linear array HPV genotyping test". J. Clin. Microbiol. (2006). Vol 44, N° 6: 1998-2006.
5. Jacobs M.V. et al. "Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes". J. Clin. Microbiol. Vol 33, N° 4: 901-905.
6. Kleter B. et al. "Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus". J. Clin. Microbiol. (1999). Vol 37, N° 8: 2508-2517.
7. Gheitt T. "Development of a sensitive and specific assay combining multiplex PCR and DNA microarray primer extension to detect high-risk mucosal human papillomavirus types". J. Clin. Microbiol. (2006). Vol 44, N° 6: 2025-2031.
8. Sandri M.T. "Comparison of the digene HC2 assay and the Roche AMPLICOR human papillomavirus (HPV) test for detection of high-risk HPV genotypes in cervical samples". J. Clin. Microbiol. (2006). Vol 44, N° 6: 2141-2146.
9. Han, J. et al. "Simultaneous amplification and identification of 25 human papillomavirus types with Templex Technology". (2006). J. Clin. Microbiol. Vol 44, N°11: 4157-4162.
10. Sotlar K. et al. "Detection and typing of human papillomavirus by E6 nested multiplex PCR". (2004). J. Clin. Microbiol. Vol 42, N° 7: 3176-3184.



Fecha de caducidad / Expiration date / Data di scadenza



Número de lote / Lot number / Numero di lotto



Uso diagnóstico in vitro / For in vitro diagnostic use / Per uso diagnostico in vitro



Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 98/79/CE sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro / This product fulfills the requirements of Directive 98/79/CE on in vitro diagnostic medical devices / Questo prodotto soddisfa i requisiti della Direttiva 98/79/CE relativa a dispositivi medico-diagnostici in vitro.



Número de catálogo / Catalogue number / Numero di catalogo



Leer instrucciones de uso / Please read pack inserts / Leggere le istruzioni d'uso



Fabricado por / Manufactured by / Prodotto da



Contenido suficiente para <n> ensayos / Contents sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per <n> saggi



Conservar a / Store at / Conservare a



Precaución / Caution / Precauzione



Reactivo corrosivo / Corrosive reagent / Reagente corrosivo



DO-09051005 Rev. 10– 15.07.2019



OPERON, S.A. - Camino del Plano, 19 - E-50410 Cuarte de Huerva - (Zaragoza) – SPAIN
+34 976 503597