

High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD

Kit de PCR em tempo real para HPV Multiplex de alto risco, IVD

REF MD04921, 96 reações

Dispositivo médico para diagnóstico in vitro



PT

Instruções de utilização

MD0492_IM_pt

VERSÃO 2401, janeiro 2024



Índice

1.	Introdução.....	3
2.	Utilização prevista.....	3
3.	Princípio do ensaio.....	3
4.	Descrição do produto.....	4
5.	Armazenamento, conservação e manuseamento.....	4
6.	Materiais e instrumentos necessários mas não fornecidos.....	4
7.	Colheita e preparação da amostra.....	4
8.	Advertências e precauções.....	4
8.1.	Informação de segurança.....	5
8.2.	Manuseamento e Procedimentos adequados.....	5
9.	Procedimentos de testagem.....	5
9.1.	Preparação das reações de qPCR.....	5
9.2.	Programação do equipamento de PCR em tempo real.....	6
10.	Análise de dados.....	6
10.1.	Critérios de validação da corrida.....	6
10.2.	Interpretação dos resultados.....	6
11.	Avaliação de desempenho do teste.....	7
11.1.	Resultados esperados.....	7
11.2.	Sensibilidade Analítica – Limite de Detecção (LoD).....	8
11.3.	Especificidade Analítica.....	8
11.3.1.	Inclusividade, Reatividade Cruzada e Substâncias Interferentes.....	8
11.3.2.	Substâncias Interferentes.....	9
11.4.	Precisão.....	9
11.4.1.	Repetibilidade.....	11
11.4.2.	Repetibilidade diária.....	11
11.4.3.	Reprodutibilidade entre lotes.....	11
11.4.4.	Reprodutibilidade entre operadores.....	11
11.4.5.	Reprodutibilidade entre equipamentos.....	11
11.5.	Avaliação Clínica.....	11
12.	Controlo de Qualidade.....	12
13.	Apoio Técnico.....	12
14.	Marcas registadas e direitos de propriedade.....	12
15.	Tabela de símbolos.....	12
16.	Declaração de Conformidade.....	13
17.	Referências.....	14

1. Introdução

Os Papilomavírus constituem um grupo diversificado de vírus de ADN com a capacidade de infetar tanto a pele quanto as membranas mucosas de humanos e animais. A presença do Papilomavírus humano (HPV) tem estado implicada em mais de 99% dos câncros cervicais em todo o mundo. Embora tenham sido catalogados mais de 200 tipos distintos de HPV, pelo menos 14 tipos específicos são classificados como de alto risco (HPV AR), devido à sua associação com o início de lesões mucosas que podem progredir para o cancro do colo do útero, entre outras complicações¹⁻³.

O cancro do colo do útero, classificado como o segundo tumor maligno mais comum em mulheres, destaca a gravidade das preocupações de saúde relacionadas com o HPV a nível global. Além do seu potencial oncogénico, o HPV origina a infeção sexualmente transmitida mais prevalente em todo o mundo^{4,5}.

Os HPV de alto risco incluem os tipos 16 e 18, responsáveis por cerca de 70% das lesões mais graves e cancerosas⁶. Outros tipos de alto risco, como HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58, HPV59, HPV66 e HPV68, contribuem coletivamente para mais de 90% dos adenocarcinomas cervicais⁷⁻¹⁰. A evolução maligna está frequentemente associada à integração do ADN viral no genoma da célula hospedeira. A coinfeção de tipos de HPV AR foi identificada como um fator de risco para a maior incidência da doença⁶.

Atualmente, a triagem ou diagnóstico de HPV de alto risco envolve principalmente técnicas citológicas, que possuem menor especificidade e sensibilidade em comparação com técnicas moleculares². A citologia cervicovaginal ou a citologia em meio líquido são proficientes na deteção de lesões precursoras e na indicação da presença de cancro do colo do útero após a infeção por HPV¹¹. No entanto, estes métodos, embora eficazes na identificação de lesões precursoras e na indicação da presença de cancro do colo do útero após a infeção por HPV, têm limitações na distinção entre diferentes tipos de vírus, especificamente entre os vários tipos de HPV de alto risco. Uma notável melhoria na exatidão do diagnóstico é evidente com ensaios de PCR em tempo real, oferecendo uma abordagem ágil e eficaz para a deteção de diferentes tipos de HPV de alto risco⁸.

2. Utilização prevista

O kit High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, da NZYtech é um teste molecular multiplexado baseado na tecnologia de PCR em tempo real, destinado à rápida deteção qualitativa dos ácidos nucleicos específicos de 14 tipos de Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco em amostras biológicas humanas obtidas através de citologia cervical. O objetivo deste teste é avaliar a presença ou ausência dos 14 tipos de HPV de alto risco numa única reação. O kit permite identificar os tipos de HPV de alto risco HPV16 e HPV18 em dois canais de deteção distintos, enquanto deteta simultaneamente os outros tipos de alto risco (HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58, HPV59, HPV66 e HPV68) num resultado único obtido no mesmo canal ótico. Esta informação, combinada com a avaliação médica relativamente ao histórico de citologia, outros fatores de risco e diretrizes profissionais, pode ser usada para orientar o acompanhamento do paciente. A testagem deve ser realizada por técnicos de laboratório especializados e qualificados, sobretudo na técnica de PCR em tempo real e em diagnóstico *in vitro*.

3. Princípio do ensaio

O kit High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR da NZYtech, IVD, inclui um conjunto abrangente de reagentes, enzimas e oligonucleótidos (*primers* e sondas) para a deteção qualitativa de Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco, utilizando plataformas comuns de PCR em tempo real (consulte a **Secção 6** para as especificações necessárias do instrumento). Este kit possibilita a identificação de vários tipos de genomas de HPV de alto risco: HPV16, HPV39 e HPV68 através da amplificação de alvos localizados no gene E6; HPV18 através da amplificação de um alvo no gene E1; HPV31 através da amplificação de um alvo localizado no gene E5; HPV33, HPV35, HPV52 e HPV58 através da amplificação de alvos no gene E7; e finalmente, HPV45, HPV51, HPV56, HPV59 e HPV66 através da amplificação de alvos localizados no gene L1.

O kit High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR, IVD, da NZYtech foi desenhado para oferecer o perfil de deteção mais abrangente possível, mantendo a especificidade para os 14 genomas de HPV de alto risco mencionados acima. O kit fornece um conjunto completo de reagentes para a deteção dos 14 genomas virais, visando regiões conservadas dos tipos de HPV de alto risco por meio de *primers* e sondas altamente específicos. Além disso, inclui um controlo interno para a deteção do gene humano β -actina (ACTB) utilizando *primers* e sondas específicos, para confirmar a extração bem-sucedida do ADN da amostra, bem como a ausência de inibidores de PCR. Os oligonucleótidos são específicos para a deteção de HPV e não apresentam homologia significativa com outros genomas, refletindo a alta especificidade e sensibilidade de deteção do teste.

A evolução natural do vírus detetado por este kit implica que novas informações genéticas estarão disponíveis ao longo do tempo, refletindo as estratégias de adaptação viral. Deste modo, a NZYtech revisita periodicamente as sequências genómicas dos genes alvo e, caso seja necessário, pode disponibilizar uma nova versão deste kit.

O kit High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR, IVD, utiliza a técnica de PCR em tempo real para a determinação qualitativa de ADN, considerada *gold standard* no diagnóstico molecular laboratorial. Essa metodologia altamente sensível e específica garante a deteção precisa de vários tipos de HPV de alto risco. O princípio do kit consiste na utilização de ADN isolado e purificado por meio de um sistema de extração para procurar a presença de ADN viral. O ADN extraído passa por amplificação por PCR multiplexado em uma única reação, utilizando conjuntos de *primers* e sondas altamente específicos baseados no princípio TaqMan[®]. Na presença de ADN viral extraído de amostras de um paciente infetado, as sondas TaqMan[®] ligam-se especificamente a regiões conservadas dos genes virais alvo que se encontram flanqueados por dois pares de *primers* igualmente específicos. Para permitir a identificação da amplificação dos quinze alvos específicos numa reação única, as sondas específicas para HPV16, HPV18, para os doze HPV de alto risco (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68), e para o gene-alvo ACTB humano, são rotuladas com diferentes fluoróforos, nomeadamente Texas Red[®], Cy5[™], FAM[™] e HEX[™], respetivamente. Além disso, os conjuntos de *primers*/sondas são fornecidos em concentrações otimizadas, garantindo que a amplificação de ácidos nucleicos menos abundantes não seja comprometida quando outros alvos virais estão presentes em concentrações mais elevadas.

4. Descrição do produto

O kit High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR, IVD, da NZYtech fornece um conjunto de reagentes e controlos suficientes para realizar 96 reações de PCR em tempo real em um único passo.

COMPOSIÇÃO DO KIT		VOLUME (POR TUBO)	NÚMERO DE TUBOS	COR DA TAMPA
HPV MMix	Mistura enzimática NZYSupreme Multiplex qPCR Probe Master Mix (2x)	1050 µL	1	Neutra
HPV PPMix	Mistura de <i>primers</i> & sondas HPV/ACTB (10x)	205 µL	1	Castanha
HPV POS	Controlo positivo HPV/ACTB	105 µL	1	Vermelha
NTC	Controlo negativo	105 µL	1	Neutra

5. Armazenamento, conservação e manuseamento

O kit High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, é enviado refrigerado. Após receção do kit, todos os componentes devem ser imediatamente armazenados de -85 °C a -15 °C. De forma a minimizar o tempo de exposição à temperatura ambiente que pode degradar os componentes do kit, estes deverão ser colocados imediatamente no congelador após a sua utilização.

- É recomendável reduzir ao mínimo o número de ciclos de congelação/descongelação através do armazenamento de alíquotas com soluções de trabalho. Se conveniente, após descongelação preparar alíquotas de volumes menores dos componentes do kit. O kit mantém sua estabilidade pelo menos após 10 ciclos de congelamento-descongelamento.
- O componente HPV PPMix deve ser armazenado protegido da luz. Em particular, não exponha o componente HPV MMix à luz solar direta após a mistura com o HPV PPMix.
- Contactar imediatamente a NZYtech caso, ao receber o kit, a embalagem esteja danificada.
- Tenha em atenção a data de validade indicada na embalagem. A NZYtech não recomenda a utilização do kit após a data de validade. Nessa altura, o kit deve ser descartado seguindo as instruções descritas na **Secção 8.2**.

6. Materiais e instrumentos necessários mas não fornecidos

- Equipamento de PCR em tempo real que inclua os canais de fluorescência Texas Red/JUN, FAM, VIC/HEX/JOE e Cy5 (canais de comprimento de onda de 615, 520, 556 e 670 nm, respetivamente) e acessórios fornecidos pelo fabricante. Ver na **Secção 11** os modelos dos equipamentos em que o kit foi validado.
- Consumíveis, reagentes e equipamento para extração de ADN viral de amostras biológicas/clínicas.
- Consumíveis de plástico para qPCR, isentos de nucleases: tubos de PCR de 1,5 ou 2 mL, tubos e tampas de tiras de 0,1 mL, placas de 96 poços, películas adesivas.
- Pipetas e respetivas pontas com filtro hidrófobos, estéreis e livres de nucleases.
- Bloco de refrigeração.
- Luvas descartáveis.
- Agitador de vórtex e centrífuga de bancada.

7. Colheita e preparação da amostra

O kit foi validado para a deteção de ADN extraído de amostras cervicais (solução de base líquida para citologia). Diferentes fatores, incluindo o procedimento de colheita da amostra biológica, transporte, armazenamento e tempo de processamento da amostra, são críticos para garantir a integridade da amostra e alcançar resultados ótimos. Para uma colheita eficaz, recomenda-se que as amostras sejam obtidas usando um pincel/espátula endocervical, que deve ser ressuspensado em solução PreservCyt® (Hologic Corp.) ou em meio Amies. Posteriormente, as amostras devem ser seladas adequadamente em tubos ou recipientes apropriados, devidamente rotuladas e prontamente transportadas para o laboratório. As amostras recolhidas devem ser testadas o mais rapidamente possível. A colheita inadequada, o manuseamento e/ou o transporte inadequados das amostras poderão originar um resultado falso. Os ácidos nucleicos extraídos constituem o material inicial para o ensaio com o kit High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD. A NZYtech recomenda a utilização do seguinte kit de purificação de ácidos nucleicos baseado na tecnologia de esferas magnéticas: NZY Mag Viral RNA/DNA Isolation Kit, IVD (MD0488, NZYtech). Este kit foi validado para a extração de amostras clínicas de HPV e deteção subsequente usando o kit High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD.

Por favor, assegure-se de que as amostras de ADN são adequadas em termos de pureza, concentração e integridade dos ácidos nucleicos.

O kit da NZYtech contém um controlo interno que tem como alvo o ADN humano que é co-purificado com o ADN viral. O ADN humano é amplificado com o conjunto de oligonucleotídeos (*primers* e sonda) específicos para o gene humano β -actina (ACTB). A introdução do controlo interno é útil na avaliação da eficiência da extração do ADN e/ou na deteção da presença de potenciais inibidores durante o processamento da amostra.

8. Advertências e precauções

Siga cuidadosamente os procedimentos e indicações fornecidas neste manual de forma a assegurar que o teste é realizado corretamente. Antes da primeira utilização verifique o produto e os seus componentes relativamente a integridade, totalidade e tipo de componentes do kit, etiquetagem correta e o estado de conservação aquando da entrega. Como em qualquer procedimento de testagem, as boas práticas de laboratório são essenciais. Qualquer alteração das mesmas pode resultar na falha do ensaio ou causar resultados erróneos. Devido à elevada sensibilidade do kit, deve ser dada especial atenção aos reagentes e às misturas de amplificação da reação, de forma a mantê-los livres de contaminações.

8.1. Informação de segurança

Antes de utilizar o kit, por favor consulte a ficha de dados de segurança (SDS) que está disponível no *website* da NZYtech (www.nzytech.com). A deteção do vírus deve ser realizada somente por profissionais especializados com formação nos procedimentos técnicos e nas normas de segurança, em laboratórios devidamente equipados. Os regulamentos internacionais e nacionais de biossegurança de laboratórios devem ser seguidos em todas as circunstâncias.

8.2. Manuseamento e Procedimentos adequados

- Apenas para uso profissional de diagnóstico *in vitro*.
- Não utilizar este kit após a data de validade.
- Não utilizar os componentes do kit se a embalagem estiver danificada.
- Não misturar reagentes/componentes de diferentes lotes de produção.
- Não utilizar reagentes/componentes de outros fabricantes juntamente com os reagentes/componentes deste kit.
- Em todos os procedimentos devem ser usados consumíveis de plástico e pipetas livres de nucleases (sem ADNase/ARNase).
- Utilize áreas de trabalho separadas/diferentes e isoladas para a preparação da amostra, a preparação da reação e as atividades de amplificação/deteção. A ordem das tarefas no laboratório deve ser unidirecional. Utilize sempre luvas descartáveis em cada área e troque-as antes de entrar numa área diferente. Se possível mude de bata entre procedimentos.
- Selecione materiais e equipamentos específicos para cada área de trabalho individual e não os transfira de uma área para outra.
- As amostras biológicas devem ser manuseadas como sendo infecciosas e seguindo as precauções de biossegurança adequadas.
- O controlo positivo contém um elevado número de cópias virais. Assim, este deve ser guardado e manuseado longe das amostras e dos todos os outros componentes do kit de forma a evitar contaminação cruzada.
- Utilizar sempre o controlo negativo fornecido no kit (NTC).
- Manusear as placas após amplificação com cuidado e descartá-las imediatamente no final da testagem. As placas devem ser sempre descartadas num contentor de riscos biológicos. Não abra os tubos/placas de reação pós-amplificação para evitar a contaminação com amplificações.
- No final de cada testagem, limpar/desinfetar as superfícies das zonas de trabalho e equipamentos com solução desinfetante apropriada para remoção de quaisquer vestígios de ácidos nucleicos. (DNA & RNA Cleaner, MB462, NZYtech).
- Deitar fora os resíduos de amostras e ensaios respeitando as normas regulamentares de segurança em vigor. Resíduos de compostos químicos e outras preparações são considerados resíduos perigosos. A rejeição deste tipo de resíduos está regulada por leis nacionais e regionais.
- Todos os resultados devem ser interpretados por um profissional de saúde no contexto do historial médico e sintomas do paciente.
- Este teste não pode excluir doenças causadas por outros patógenos.
- Um resultado negativo para qualquer teste de PCR não exclui a possibilidade de infeção.
- Seguir boas práticas de laboratório, como sejam vestir roupa de proteção, usar luvas permanentemente, óculos de proteção e máscara, não comer, beber ou fumar na zona de trabalho.

9. Procedimentos de testagem

Por favor, leia cuidadosamente as instruções antes de realizar o ensaio. Tenha em atenção que todas as etapas de pipetagem e a configuração experimental da placa devem ser realizadas seguindo boas práticas de PCR em tempo real. Depois da placa estar selada, deve-se iniciar imediatamente o protocolo de PCR em tempo real. Durante a preparação das misturas de reação, a exposição prolongada à temperatura ambiente pode levar a artefactos que reduzem a sensibilidade da deteção. Antes do ensaio, deve misturar gentilmente os tubos de reação fornecidos, centrifugar por cinco segundos para recolher o conteúdo no fundo do tubo e colocar em gelo. **Recomenda-se vivamente pipetar sempre em último lugar o controlo positivo do kit, HPV POS, de forma a evitar eventuais contaminações cruzadas.**

9.1. Preparação das reações

1. Preparar uma mistura de reação PCR em tempo Real com o volume suficiente para o número de testes a realizar; adicionar 5% de volume extra para compensar perdas durante a pipetagem. Proceda de acordo com a tabela seguinte, onde estão especificados os volumes para 1 ou n testes (em que n corresponde ao número total de reações). Armazene os volumes restantes de acordo com a **Seção 5**.

COMPONENTE	VOLUME 1 TESTE (μ L)	VOLUME n TESTES * + 5% (μ L)
HPV MMix **	10	$n \times 10,5$
HPV PPMix	2	$n \times 2,1$
VOLUME FINAL	12	$n \times 12,6$

* Para calcular o número total de reações necessárias para cada ensaio, contabilize o número de amostras e mais três, uma para o controlo negativo e duas para os controlos positivos, respetivamente.

** Um ligeiro precipitado pode surgir no tubo, em particular após vários ciclos de congelação/ descongelação. Para garantir o desempenho ideal, proceda a uma agitação vigorosa da mistura de enzimas antes de usar. Neste caso, não centrifugue a mistura de enzimas antes de pipetar.

2. Pipete 12 μ L da mistura de reação para cada poço de acordo com a configuração da placa de PCR em tempo Real do teste.
3. Para o controlo negativo, adicione 8 μ L de NTC no poço relativo ao controlo negativo, em substituição do ADN da amostra. O volume final deve ser de 20 μ L.
4. Para as amostras biológicas, adicione 8 μ L de cada amostra de ADN nos poços relativos às amostras em teste, de acordo com a configuração da placa de PCR em tempo Real. O volume final deve ser de 20 μ L.
5. Para o controlo positivo, adicionar 8 μ L de HPV POS em substituição do ADN da amostra. O volume final deve ser de 20 μ L.
6. Feche a placa com um filme adesivo ótico apropriado ou tampas antes de prosseguir com as etapas de PCR em tempo Real.

7. Colocar a placa no equipamento de PCR em tempo real e iniciar o protocolo de acordo com a secção seguinte.

9.2. Programação do equipamento de PCR em tempo real

A tabela seguinte exemplifica o protocolo padronizado e otimizado num determinado número de plataformas de PCR em tempo real. Estas condições podem, contudo, ser adaptadas e validadas de forma a satisfazer protocolos específicos em alguns equipamentos.

Definições para o protocolo PCR em tempo Real

CICLOS	TEMPERATURA	TEMPO	FASE
1	95 °C	3 min	Ativação da polimerase
45	95 °C	5 s	Desnaturação
	60 °C	30 s	Emparelhamento/Extensão*

* Dependendo do instrumento de PCR em tempo real seleccionar os canais de deteção adequados. A colheita de sinal de fluorescência deve ser efectuada nos canais referidos na tabela seguinte.

Os fluoróforos usados neste kit e respetivos canais de deteção são:

Fluoróforos e Canais de deteção

GENES ALVO /DETETOR	CORANTE REPORTER (SONDAS)	CANAIS DE DETEÇÃO
HPV16	Texas Red®	Texas Red/JUN
HPV18	Cy5™	Cy5
Outro HPV AR	FAM™	FAM
ACTB	HEX™	VIC/HEX ou JOE

O kit High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, foi validado nos seguintes equipamentos de PCR em tempo Real: Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5, Applied Biosystems® QuantStudio 5 Dx, Bio-Rad® CFX C1000 Touch and Bio-Rad® CFX Opus. Se pretender usar outro equipamento, o kit dever ser validado pelo utilizador usando amostras previamente caracterizadas (positivas e negativas).

10. Análise de dados

10.1. Critérios de validação da corrida

Previamente à análise dos resultados, recomendamos que consulte o manual do utilizador do respetivo aparelho. De seguida verifique se o teste de PCR em tempo real é válido. Assim, para cada placa, confirme se os resultados obtidos para os controlos positivo e negativo estão em acordo com os seguintes critérios:

Controlo positivo: as curvas de amplificação para Texas Red (HPV16), Cy5 (HPV18), FAM (Outro HPV AR) e VIC (ACTB) são positivas. É expectável que o controlo positivo origine curvas de amplificação com Ct < 32, para qualquer um dos quatro canais. O não cumprimento deste critério de controlo de qualidade é uma forte indicação de que o ensaio foi comprometido.

Controlo negativo (NTC): nenhum sinal de amplificação é detetado. Se o controlo negativo origina algumas das curvas de amplificação (Texas Red, Cy5, FAM e VIC) com forma sigmoide, poderá ter ocorrido contaminação. Repita o teste seguindo boas práticas de PCR em tempo real.

Se os controlos estão de acordo com o esperado, o teste é considerado **válido**. Por favor, proceda com a interpretação dos resultados das amostras testadas.

Se em algum dos controlos não foi obtido o resultado esperado, significa que o ensaio foi comprometido ou executado incorretamente e deve ser considerado **inválido**.

Por favor, repita o teste. Se o problema persistir, contacte o fabricante.

10.2. Interpretação dos resultados

O kit High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, da NZYtech utiliza os seguintes valores de Ct como *cut-off* (ciclos limiares) para a interpretação de resultados:

VALOR CT	INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS
Amplificação Ct ≤36	Detetado (+) → POSITIVO
Sem amplificação Ct >36	Não detetado (-) → NEGATIVO

HPV16 é detetado se a curva de amplificação do canal Texas Red é sigmoide com Ct ≤36, independentemente do resultado obtido para o gene ACTB (VIC). A presença ou ausência de um sinal no canal VIC não é significativa para a validade da análise processada.

HPV18 é detetado se a curva de amplificação do canal Cy5 é sigmoide com Ct ≤36, independentemente do resultado obtido para o gene ACTB (VIC). A presença ou ausência de um sinal no canal VIC não é significativa para a validade da análise processada.

Outro HPV AR é detetado se a curva de amplificação do canal FAM é sigmoide com Ct≤36, independentemente do resultado obtido para o gene ACTB (VIC). A presença ou ausência de um sinal no canal VIC não é significativa para a validade da análise processada.

HPV16, HPV18, Outro HPV AR não são detetados se as curvas dos canais Texas Red, Cy5 e FAM não forem positivas (Ct>36), enquanto o gene ACTB (VIC) apresenta uma curva positiva sigmoide com Ct≤45.

O teste é inválido se as curvas de amplificação de HPV16, HPV18, Outro HPV AR e ACTB forem negativas. O teste deve ser repetido, procedendo-se a nova extração de ácidos nucleicos a partir da amostra.

A tabela seguinte resume a interpretação dos resultados principais. Deve avaliar a forma das curvas de amplificação; **apenas curvas de amplificação sigmoide são indicativas de uma amplificação real.**

HPV16 (TEXAS RED/JUN)	HPV18 (CY5)	OUTRO HPV AR (FAM)	ACTB (VIC/HEX/JO E)	INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS
+	-	-	+/-*	HPV16 é detetado → POSITIVO
-	+	-	+/-*	HPV18 é detetado → POSITIVO
-	-	+	+/-*	Outro HPV AR é detetado → POSITIVO (um ou mais HPV AR: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)
+	+	-	+/-*	HPV16 e HPV18 são detetados → POSITIVO
+	-	+	+/-*	HPV16 e Outro HPV AR são detetados → POSITIVO (16 e outro(s) HPV AR: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)
-	+	+	+/-*	HPV18 e Outro HPV AR são detetados → POSITIVO (18 e outro(s) HPV AR: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)
+	+	+	+/-*	HPV AR é detetado → POSITIVO (16, 18 e outro(s) HPV AR: 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)
-	-	-	+	HPV AR não são detetados → NEGATIVO (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)
-	-	-	-	Teste inválido, repetir extração

* Não é necessária a deteção do controlo interno no canal de deteção VIC para resultados positivos nos canais de deteção Texas Red, Cy5 ou FAM. Uma carga viral elevada de ADN alvo na amostra pode originar a redução ou ausência do sinal do controlo interno.

Nota: A interpretação dos resultados deve ter em conta a possibilidade de resultados falsos negativos e falsos positivos.

- Resultados falsos negativos podem ser causados por:
 - Recolha transporte, manuseamento e/ou armazenamento incorretos das amostras.
 - Degradação da amostra.
 - Presença de inibidores de PCR em tempo real.
 - Mutações no genoma do vírus.
 - Falha no seguimento dos procedimentos deste manual.
 - Utilização de kits de extração ou plataformas de PCR em tempo real não validadas.
- Resultados falsos positivos, podem ser causados por:
 - Contaminação cruzada de amostras contendo elevadas concentrações de ADN viral de HPV AR. Devido à alta suscetibilidade do método de PCR em tempo Real a contaminações cruzadas, é crucial ter um cuidado especial durante o isolamento do DNA.
 - Contaminação cruzada com o controlo positivo devido a incorreto manuseamento do mesmo.
 - Manuseamento incorreto do produto amplificado (placa pós amplificação).

Um resultado negativo não impede a infeção e não deve ser usado como único indicador para o tratamento médico ou outras decisões relativas ao paciente. Além disso, este teste não pode descartar doenças causadas por outros patógenos.

11. Avaliação de desempenho do teste

O desempenho do kit foi validado nos equipamentos de PCR referidos na **Secção 9.2**. Se outro equipamento for usado, o kit deverá ser validado pelo utilizador utilizando amostras positivas e negativas previamente caracterizadas.

11.1. Resultados esperados

Gráficos representativos e exemplificativos de amplificação referentes a amostras clínicas negativas para HPV (Figura 1A) ou amostras de pacientes infetados com HPV AR (Figura 1B).

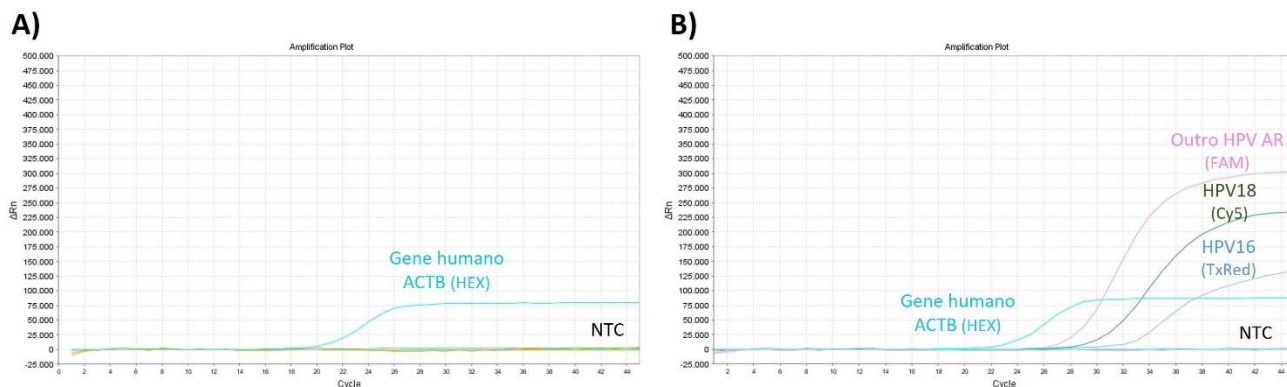


Figura 1. Curvas de fluorescência representativas de HPV AR geradas pelo kit High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD em uma amostra de zaragatoa cervical clinicamente negativa para HPV (Figura 1A) e uma amostra de zaragatoa cervical de um paciente identificado como portador de HPV AR (Figura 1B). Curva azul: detecção de DNA contendo o alvo HPV16 através do canal Texas Red; Curva verde: detecção de DNA contendo o alvo HPV18 através do canal Cy5; Curva rosa: detecção de DNA contendo outro alvo HPV AR através do canal FAM; Curva azul-claro: detecção do alvo humano ACTB através do canal VIC.

11.2. Sensibilidade Analítica – Limite de Detecção (LoD)

A sensibilidade analítica foi definida como a concentração limitante de analito que pode ser detetada com 95% de confiança. Este parâmetro foi avaliado através de ensaios com diferentes números de cópias dos ácidos nucleicos de HPV, em particular de HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58, HPV59, HPV66 e HPV68, misturados com ADN extraído de amostras negativas de amostras cervicais, usando 3 lotes de kit diferentes e seguindo as condições de reação recomendadas. Os testes foram repetidos durante 4 dias de forma a determinar o valor putativo de LoD. Os diferentes LoDs foram confirmados por dois operadores usando os 3 lotes de kit num ensaio de 48 testes, assegurando-se assim que a sensibilidade analítica se mantém em diferentes condições de testagem. Os dados revelaram que o kit High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, deteta o seguinte valor de LoD para cada tipo de HPV AR, com uma confiança $\geq 95\%$. Todos os ensaios foram realizados usando o equipamento de PCR em Tempo Real Applied Biosystems® 7500 FAST e a análise foi realizada usando o software do equipamento.

TIPO DE HPV	CONCENTRAÇÃO (CÓPIAS/REAÇÃO)	CONCENTRAÇÃO (CÓPIAS/ML)	NÚMERO DE POSITIVOS TESTADOS	% POSITIVOS	INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95%	
					MEIOR	MAIOR
HPV16	15	750	47/48	97,9%	89,1%	99,6%
HPV18	15	750	47/48	97,9%	89,1%	99,6%
HPV31	7,5	375	47/48	97,9%	89,1%	99,6%
HPV33	50	2500	48/48	100,0%	92,6%	100,0%
HPV35	10	500	46/48	95,8%	86,0%	98,8%
HPV39	7,5	375	47/48	97,9%	89,1%	99,6%
HPV45	30	1500	46/48	95,8%	86,0%	98,8%
HPV51	25	1250	48/48	100,0%	92,6%	100,0%
HPV52	20	1000	48/48	100,0%	92,6%	100,0%
HPV56	15	750	48/48	100,0%	92,6%	100,0%
HPV58	10	500	47/48	97,9%	89,1%	99,6%
HPV59	40	2000	46/48	95,8%	86,0%	98,8%
HPV66	30	1500	47/48	97,9%	89,1%	99,6%
HPV68	20	1000	46/48	95,8%	86,0%	98,8%

11.3. Especificidade Analítica

11.3.1. Inclusividade, Reatividade Cruzada e Substâncias Interferentes

A inclusividade e a reatividade cruzada foram avaliadas por análise *in silico* em comparação com patógenos evolutivamente próximos do Papilomavírus humano, e com patógenos que causam infeções com sintomas semelhantes. As sequências de *primers* e sondas incluídas no kit foram analisadas contra sequências genómicas publicadas. Após análise *in silico*, verificou-se que o design do ensaio deteta os catorze HPV AR (HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58, HPV59, HPV66 e HPV68) e não apresentou reatividade com espécies não relacionadas. Além da análise *in silico*, um painel de bactérias, fungos e vírus, incluindo aqueles comumente encontrados no trato urogenital feminino, bem como alguns tipos de HPV classificados como de baixo risco, foram testados com o kit. A reatividade cruzada do kit foi avaliada utilizando os seguintes patógenos: *Bifidobacterium breve*, *Proteus mirabilis*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus avium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium nucleatum*, *Klebsiella oxytoca*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium genitalium* e *Bacteroides fragilis*. Os ensaios foram realizados utilizando o DNA genómico dos organismos mencionados acima. Além disso, foram realizados ensaios usando sete amostras inativas representativas de espécimes clínicos humanos, incluindo *Candida albicans* (estirpe Z006), *Gardnerella vaginalis* (estirpe Z247), *Atopobium vaginae* (estirpe Z242), *Trichomonas vaginalis* (estirpe Z070), *Candida glabrata*

(estirpe Z007), *Lactobacillus crispatus* (estirpe Z246) e *Candida krusei* (estirpe Z009). Além disso, amostras clínicas de HPV de baixo risco (HPV6/11, HPV40, HPV42, HPV43, HPV44, HPV53, HPV54, HPV53/73 e HPV82) foram também testadas com o kit High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD. Todos os testes foram realizados em triplicado usando três lotes do kit. Os dados confirmaram que nenhum dos microrganismos testados gerou um sinal de amplificação.

11.3.2. Substâncias Interferentes

O impacto de 20 substâncias biológicas e químicas potencialmente interferentes que podem estar presentes na área de amostragem, incluindo sangue humano total, antimicrobianos, cremes antifúngicos, produtos de lavagem ou hidratantes, foi avaliado quanto à possível interferência com o kit High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD. Os ensaios foram realizados usando espécimes cervicais negativos (armazenados em solução ThinPrep PreservCyt®) contaminados com espécimes positivos para HPV16 e HPV18 a ~2-3x o Limite de Detecção (LoD). As substâncias potencialmente interferentes foram adicionadas às amostras simuladas em concentrações que representam os níveis mais elevados esperados em amostras cervicais humanas, com base em dados literários. Todos os testes foram realizados em duplicado usando um lote do kit e comparados com os dados obtidos com um teste de controle sem interferentes. Nas concentrações testadas, os resultados revelaram que nenhuma das moléculas testadas afetou a sensibilidade da detecção. Não obstante, a solução vaginal de BETADINE® poderá causar interferência se usada a concentrações superiores a 0,04% (w/v). A tabela abaixo resume os dados obtidos.

POTENCIAL INTERFERENTE	SUBSTÂNCIA ATIVA	CONCENTRAÇÃO FINAL NA AMOSTRA	INTERFERÊNCIA SIM (S) OU NÃO (N)		
			HPV16	HPV18	OUTRO HPV AR
Anidulafungin (antifúngico)	Anidulafungina	10% v/v	N	N	N
Flucytosine (antifúngico)	Flucitosina	10% v/v	N	N	N
Voriconazole (antifúngico)	Voriconazol	10% v/v	N	N	N
Amphotericin B (antifúngico)	Anfotericina B deoxicólica	10% v/v	N	N	N
Gino-Canesten® (antifúngico)	Clotrimazol (10 mg/ml)	10% w/v	N	N	N
Lomexin® (antimicrobiano)	Nitrato de fenticonazol	10% w/v	N	N	N
Progeffik® (Medicamento)	Progesterona (5 mg/mL)	10% v/v	N	N	N
BETADINE® Vaginal (Produto de lavagem)	Iodo povidona (100 mg/mL)	0,04% v/v	N*	N*	N*
Produto de lavagem	PEG-7 Gliceril Cocoato, Propilenoglicol	10% v/v	N	N	N
Produto de lavagem	Ácido láctico	10% v/v	N	N	N
Lubrificante Warm Up Cherry	Hidroxiethylcelulose, Gluconato de clorexidina	10% w/v	N	N	N
ClimaCare (Produto tópico)	Ácido hialurônico, ácido láctico	10% w/v	N	N	N
WOMAN ISDIN (Produto tópico)	Glicerina, Poliacrilato de glicerilo, ácido poliacrílico	10% w/v	N	N	N
Microlax® (Laxantes)	Citrato de sódio di-hidratado, Laurilsulfato de sódio	5% v/v	N	N	N
Scheriproct® (Pomadas anti-hemorroidais)	Prednisolona, Cinchocaína	10% w/v	N	N	N
Urina (humana)	-	10% v/v	N	N	N
Sangue total (humano)	-	10%; 25% v/v	N	N	N
Plasma (humano)	-	10% v/v	N	N	N
Muco (estômago de porco, tipo II)	-	0,3% w/v	N	N	N
Crema Zovirax®	Aciclovir	7% w/v	N	N	N
Controle sem qualquer substância interferente	H ₂ O	5% v/v	N	N	N

* A solução vaginal BETADINE® pode interferir no ensaio quando presente em concentrações > 0,04 v/v.

11.4. Precisão

A precisão do ensaio do kit High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD da NZYtech foi determinada pela testagem repetida de amostras positivas de HPV16, HPV18 e HPV45 representativas de duas cargas virais, 3x LoD e 30x LoD por reação, combinadas com ADN extraído de amostras cervicais negativas, utilizando 3 lotes diferentes do kit e seguindo condições típicas de reação de teste. A precisão foi expressa através da média de C_q, do coeficiente de variação de C_q e da percentagem (%) de detecção de réplicas, conforme descrito de seguida para cada caso. Os dados são resumidos nas tabelas apresentadas abaixo.

Precisão do kit High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, para a detecção do gene-alvo do tipo HPV16.

VARIÁVEL TESTADA		HPV16 (CÓPIAS/REAÇÃO)	
		3x LOD	30x LOD
REPETIBILIDADE	n	12	12
	Média Cq	33,86	30,37
	Coeficiente de Variação (%)	0,61	0,79
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE DIÁRIA	n	48	48
	Média Cq	33,65	30,34
	Coeficiente de Variação (%)	1,25	0,87
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE LOTES	n	36	36
	Média Cq	33,70	30,37
	Coeficiente de Variação (%)	1,06	0,63
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE OPERADORES	n	36	36
	Média Cq	33,79	30,38
	Coeficiente de Variação (%)	0,68	0,71
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE EQUIPAMENTOS	n	60	60
	Média Cq	33,74	30,62
	Coeficiente de Variação (%)	1,49	1,28
	% Réplicas detetadas	100	100

Precisão do kit High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, para a detecção do gene-alvo do tipo HPV18.

VARIÁVEL TESTADA		HPV18 (CÓPIAS/REAÇÃO)	
		3x LOD	30x LOD
REPETIBILIDADE	n	12	12
	Média Cq	34,31	30,75
	Coeficiente de Variação (%)	0,59	0,70
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE DIÁRIA	n	48	48
	Média Cq	34,20	30,81
	Coeficiente de Variação (%)	1,13	1,16
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE LOTES	n	36	36
	Média Cq	34,13	30,71
	Coeficiente de Variação (%)	0,98	0,67
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE OPERADORES	n	36	36
	Média Cq	34,28	30,78
	Coeficiente de Variação (%)	0,82	0,85
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE EQUIPAMENTOS	n	60	60
	Média Cq	33,99	30,81
	Coeficiente de Variação (%)	1,56	1,35
	% Réplicas detetadas	100	100

Precisão do kit High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, para a detecção do gene-alvo do tipo HPV45.

VARIÁVEL TESTADA		HPV45 (CÓPIAS/REAÇÃO)	
		3x LOD	30x LOD
REPETIBILIDADE	n	12	12
	Média Cq	34,04	30,35
	Coeficiente de Variação (%)	1,28	0,56
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE DIÁRIA	n	48	48
	Média Cq	34,01	30,34
	Coeficiente de Variação (%)	1,52	0,73
	% Réplicas detetadas	100	100

REPRODUTIBILIDADE ENTRE LOTES	n	36	36
	Média Cq	34,03	30,33
	Coefficiente de Variação (%)	1,59	0,67
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE OPERADORES	n	36	36
	Média Cq	34,08	30,38
	Coefficiente de Variação (%)	1,46	1,03
	% Réplicas detetadas	100	100
REPRODUTIBILIDADE ENTRE EQUIPAMENTOS	n	60	60
	Média Cq	33,69	30,16
	Coefficiente de Variação (%)	2,02	1,17
	% Réplicas detetadas	100	100

11.4.1. Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada por um operador através da análise de 12 réplicas para cada amostra (3xLoD e 30xLoD por reação), contabilizando um total de 24 testes executados por gene-alvo.

11.4.2. Repetibilidade diária

A repetibilidade diária foi avaliada por um operador através da análise de 48 réplicas para cada amostra (3xLoD e 30xLoD por reação), durante 4 dias, com 12 réplicas por cada concentração por dia (num total de 96 reações por gene-alvo).

11.4.3. Reprodutibilidade entre lotes

A reprodutibilidade entre lotes foi avaliada por um operador através da análise de 36 réplicas para cada amostra (3xLoD e 30xLoD por reação), usando 3 lotes diferentes do kit com 12 réplicas por cada lote.

11.4.4. Reprodutibilidade entre operadores

A reprodutibilidade do operador foi avaliada pela testagem de 36 réplicas de cada amostra (3xLoD e 30xLoD por reação), por três operadores, com 12 réplicas por operador, num total de 24 testes por operador, para os três genes-alvo.

11.4.5. Reprodutibilidade entre equipamentos

A reprodutibilidade entre equipamentos foi avaliada pela testagem de 60 réplicas por cada amostra (3x LoD e 30x LoD por reação), em cinco equipamentos de PCR em tempo real diferentes, num total de 12 réplicas por equipamento.

FABRICANTE DO EQUIPAMENTO DE PCR EM TEMPO REAL	MODELO DO EQUIPAMENTO DE PCR EM TEMPO REAL
Applied Biosystems®	7500 FAST
	QuantStudio™ 5
	QuantStudio™ 5 Dx
Bio-Rad®	CFX C1000 Touch Real-time PCR
	CFX Opus Real-time PCR

11.5. Avaliação Clínica

As características de desempenho clínico do kit High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, foram avaliadas em quatro grupos distintos de amostras cervicais caracterizadas em paralelo por técnicas de PCR isotérmico ou de PCR em tempo real. Um total de 359 amostras cervicais armazenadas em solução PreservCyt® (Hologic) ou em meio de Amies, provenientes de mulheres com diferentes idades e com resultados válidos para citologia, foram incluídas neste estudo clínico.

O desempenho clínico do kit High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, foi avaliado em 139 amostras cervicais caracterizadas usando um kit comercial de PCR isotérmico. Os ácidos nucleicos foram extraídos por um laboratório externo e, em seguida, amplificados usando o kit High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD. Os dados revelaram uma sensibilidade clínica (PPA) de 100% para a detecção de HPV16 e HPV18 e 94% para Outro HPV AR. A especificidade clínica (NPA) para a detecção de HPV16 foi de 95%, para HPV18 foi de 99% e para Outro HPV AR foi de 100%.

Adicionalmente, foi realizada a comparação do desempenho clínico do kit High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, com três kits comerciais de PCR em tempo real. Um total de 220 amostras cervicais foram analisadas. Os dados revelaram uma sensibilidade clínica (PPA) de 100% para a detecção de HPV16 e HPV18, e de 83% para Outro HPV AR. A especificidade clínica (NPA) para a detecção de HPV16 e HPV18 foi de 100%, enquanto para Outro HPV AR foi de 98%.

Os dados de desempenho clínico do kit High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, quando comparado com kits de PCR isotérmico e de PCR em tempo real são apresentados na tabela seguinte.

ENSAIO COMPARATIVO	GENE-ALVO	VP	VN	FP	FN	SENSIBILIDADE (IC 95%)	ESPECIFICIDADE (IC 95%)
PCR ISOTÉRMICO	HPV16	10	123	6	0	100% (72-100%)	95% (90-98%)
	HPV18	5	133	1	0	100% (57-100%)	99% (96-100%)
	OUTRO HPV AR	63	72	0	4	94% (86-98%)	100% (95-100%)
PCR EM TEMPO REAL	HPV16	36	183	1	0	100% (90-100%)	100% (97-100%)
	HPV18	22	197	1	0	100% (85-100%)	100% (97-100%)
	OUTRO HPV AR	59	146	3	12	83% (73-90%)	98% (94-99%)

Nota: VP = Verdadeiros Positivos; VN = Verdadeiros Negativos; FP = Falsos Positivos; FN = Falsos Negativos; PPV=Positive; IC = Intervalo de Confiança.

12. Controlo de Qualidade

Todos os componentes do kit High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, da NZYtech foram testados seguindo os protocolos descritos anteriormente. O sistema multiplex de PCR em tempo real permite detetar as sequências alvo descritas para a identificação do ADN viral de HPV16, HPV18, doze HPV AR (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, e 68), bem como do gene humano da β -actina (ACTB). Amplificações positivas foram observadas para os genes alvo, controlo positivo e controlo interno através dos canais Texas Red, Cy5, FAM e VIC.












13. Apoio Técnico

Para apoio técnico, por favor contactar por telefone a nossa equipa dedicada de apoio técnico: +351 213643514 ou através do correio eletrónico: info@nzytech.com.

14. Marcas registadas e direitos de propriedade

Todas as marcas registadas que surgem neste manual são propriedade dos seus respetivos representantes.

15. Tabela de símbolos

	Dispositivo de diagnóstico médico <i>in vitro</i>		Consultar instruções para utilização
	Número de catálogo		Fabricante
	Código do lote		Usado por
	Limite de temperatura		Suficiente para
	Controlo positivo		Manter fora do alcance da luz solar (mistura primers/sonda)
	Controlo negativo		

16. Declaração de Conformidade

Nome do produto: High-Risk HPV Multiplex Real-time PCR Kit, IVD

Número de catálogo: MD04921

Utilização: Detecção qualitativa de HPV de alto risco (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68)

Classificação: Outros (não abrangidos pelo Anexo II ou não destinados ao auto-diagnóstico) segundo a Diretiva 98/79/CE

Fabricante: NZYtech - Genes & Enzymes,
Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar
Edifício E, R/C,
1649-038, Lisboa
Portugal

Nós, NZYtech, Lda – Genes & Enzymes, declaramos que este produto, a que esta declaração de conformidade diz respeito, está em conformidade com as normas padrão ISO 9001:2015 e ISO 13485:2016, seguindo as disposições da diretiva 98/79/EC e do regulamento (EU) 2017/746 aplicado aos dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*, transposta para as leis nacionais dos Estados Membros da União Europeia.

A ficha técnica do produto é mantida na NZYtech, Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal.



Joana Brás, PhD
Diretora Técnica

17. Referências

1. Scarth JA, Patterson MR, Morgan EL, Macdonald A. The human papillomavirus oncoproteins: a review of the host pathways targeted on the road to transformation. *J Gen Virol.* 2021 Mar;102(3):001540. doi: 10.1099/jgv.0.001540. Epub 2021 Jan 11. PMID: 33427604; PMCID: PMC8148304.
2. Bordigoni A, Motte A, Tissot-Dupont H, Colson P, Desnues C. Development and validation of a multiplex qPCR assay for detection and relative quantification of HPV16 and HPV18 E6 and E7 oncogenes. *Sci Rep.* 2021 Feb 17;11(1):4039. doi: 10.1038/s41598-021-83489-2. PMID: 33597592; PMCID: PMC7889863.
3. Meites E.; Gee J.; Unger E. and Markowitz L. Human Papillomavirus (2021) <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/hpv.html>.
4. Manini, I., & Montomoli, E. (2018). Epidemiology and prevention of Human Papillomavirus. *Ann Ig*, 30(4), 28-32.
5. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, Bosch FX. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2007 Jul;7(7):453-9. doi: 10.1016/S1473-3099(07)70158-5. PMID: 17597569.
6. Luo, Q., Zeng, X., Luo, H. et al. Epidemiologic characteristics of high-risk HPV and the correlation between multiple infections and cervical lesions. *BMC Infect Dis* 23, 667 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12879-023-08634-w>.
7. Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, de Sanjosé S, Franceschi S, Clifford GM. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. *Int J Cancer.* 2012 Nov 15;131(10):2349-59. doi: 10.1002/ijc.27485. Epub 2012 Mar 20. PMID: 22323075.
8. Burd EM. Human Papillomavirus Laboratory Testing: The Changing Paradigm. *Clin Microbiol Rev* (2016) 29:291–319. doi: 10.1128/cmr.00013-15.
9. Okunade KS. Human papillomavirus and cervical cancer. *J Obstet Gynaecol.* 2020 Jul;40(5):602-608. doi: 10.1080/01443615.2019.1634030. Epub 2019 Sep 10. Erratum in: *J Obstet Gynaecol.* 2020 May;40(4):590. PMID: 31500479; PMCID: PMC7062568.
10. Chan CK, Aimagambetova G, Ukybassova T, Kongrtay K, Azizan A. Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer: Epidemiology, Screening, and Vaccination-Review of Current Perspectives. *J Oncol.* 2019 Oct 10;2019:3257939. doi: 10.1155/2019/3257939. PMID: 31687023; PMCID: PMC6811952.
11. Burd EM. Human Papillomavirus Detection and Utility of Testing. *Clin Microbiol Newsl* (2007) 29:159–67. doi: 10.1016/j.clinmicnews.2007.10.001.

