

Gebruiksaanwijzing *digene*[®] HC2 HPV DNA Test

IVD

Σ 96

In vitro nucleïnezuurhybridisatie-assay met signaalversterking gebruikmakend van microtiterplaat-chemiluminescentie voor kwalitatieve detectie van DNA van 18 laagrisico- en hoogrisicotypen humaan papillomavirus (HPV) in cervicale samples

Voor gebruik met:

digene HC2 DNA-sampleafnamehulpmiddel

digene Specimen Transport Medium (STM, sampletransportmedium)

Hologic PreservCyt[®]-oplossing

BD SurePath[®]-conserveervloeistof



REF

5196-1330



QIAGEN

19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874
VS

EC REP

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
DUITSLAND

L2126nl Rev. 4



INHOUDSOPGAVE

NAAM EN BEOOGD GEBRUIK	1
SAMENVATTING EN UITLEG	2
PRINCIPE VAN DE PROCEDURE	3
MEEGELEVERDE REAGENTIA EN MATERIALEN	4
BENODIGDE, MAAR NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN	5
WAARSCHUWINGEN EN VOORZORGSMAATREGELEN	6
VEILIGHEIDSMATREGELEN	6
VEILIGHEIDS- EN RISICOBEPALINGEN VOOR COMPONENTEN	6
VOORZORGSMAATREGELEN BIJ DE VERWERKING	8
VOORBEREIDEN EN BEWAREN VAN REAGENTIA	9
AFNAME EN BEHANDELING VAN SAMPLES	13
CERVIX-SAMPLES IN STM	13
CERVIXBIOPTEN	13
CERVIX-SAMPLES IN PRESERVCYT-OPLOSSING	13
CERVIX-SAMPLES IN SUREPATH-CONSERVEERVLOEISTOF	14
TESTPROCEDURE	15
TESTEN MET EEN HOOG SAMPLEDOORVOERVOLUME MET HET RAPID CAPTURE SYSTEM	15
HANDMATIGE METHODE	15
DENATURATIE.....	16
VORTEXEN EN DENATURATIE	20
HYBRIDISATIE: GECOMBINEERDE-PROBECOCTAIL- (CPC) EN DUBBELE-PROBEMETHODE	23
HYBRIDEN-CAPTURING	25
HYBRIDEN-DETECTIE.....	26
WASSEN	26
SIGNAALAMPLIFICATIE	27
VERIFICATIECRITERIA VOOR DE ASSAYKALIBRATIE	29
BEREKENING VAN DE CUT-OFF	32
KWALITEITSCONTROLE	33
INTERPRETATIE VAN SAMPLERESULTATEN	34
WERKINGSEIGENSCHAPPEN	35
GEGEVENS DIE DE INDICATIE LAAGRISICO-; EN HOOGRISICO-HPV ONDERSTEUNEN.....	35
GEGEVENS DIE DE INDICATIE PRIMAIRE SCREENING HIGH-RISK HPV ONDERSTEUNEN	39
ANALYTISCHE SENSITIVITEIT	42
WERKING VAN DE GECOMBINEERDE-PROBECOCTAIL (CPC)	43
GELIJKWAARDIGHEID VAN SAMPLES IN STM EN PRESERVCYT-OPLOSSING	43
CORRELATIE RESULTAAT SUREPATH-SAMPLES MET STM-SAMPLES IN EEN KLINISCHE POPULATIE.....	43
REPRODUCEERBAARHEID	44
HIGH-RISK HPV-PROBE	45
KRUISREACTIVITEIT	46
KRUISREACTIVITEITSPANEL.....	46
KRUIHYBRIDISATIE	47
EFFECT VAN BLOED EN ANDERE STOFFEN OP STM-SAMPLES	47
EFFECT VAN BLOED EN ANDERE STOFFEN OP SAMPLES IN PRESERVCYT-OPLOSSING	47
REPRODUCEERBAARHEID VAN DE <i>DIGENE</i> HC2 HPV DNA TEST MET KLINISCHE SAMPLES DIE NA AFNAME IN STM ZIJN GEDAAN	47
RLE/CO.....	48
REPRODUCEERBAARHEID VAN DE <i>DIGENE</i> HC2 HPV DNA TEST MET KLINISCHE SAMPLES DIE NA AFNAME IN PRESERVCYT-OPLOSSING ZIJN GEDAAN	48
RLE/CO.....	49
REPRODUCEERBAARHEID VAN DE <i>DIGENE</i> HC2 HIGH-RISK HPV DNA TEST MET SAMPLES DIE NA AFNAME IN SUREPATH-CONSERVEERVLOEISTOF ZIJN GEDAAN.....	50
REPRODUCEERBAARHEID SUREPATH-RESULTAAT BIJ GEBRUIK VAN HET RAPID CAPTURE SYSTEM VOOR HET VERWERKEN VAN ASSAYS.....	50

BEPERKINGEN VAN DE PROCEDURE	51
REFERENTIES	52
OPLOSSEN VAN PROBLEMEN.....	55
CONTAMINATIECONTROLE	59
QIAGEN CONTACTINFORMATIE	60

NAAM EN BEOOGD GEBRUIK

Voor in-vitrodiagnostiek.

De *digene* HC2 HPV DNA Test waarbij de Hybrid Capture[®] 2 (HC2)-technologie wordt toegepast, is een nucleïnezuurhybridisatie-assay met signaalversterking met behulp van microtiterplaat-chemiluminescentie voor de kwalitatieve detectie van DNA van 18 laagrisico- en hoogrisicotypen HPV in cervicale samples.

Cervicale samples die met de *digene* HC2 HPV DNA Test mogen worden getest, zijn:

- Samples die zijn afgenomen met het *digene* HC2 DNA sampleafnamehulpmiddel
- Samples die zijn afgenomen met behulp van een cervixborstel of met een endocervicale borstel-/spatelcombinatie en vervolgens in PreservCyt-oplossing zijn opgenomen (zie gebruiksaanwijzing *digene* HC2 Sample Conversion Kit voor alle details)
- Samples die na afname zijn opgenomen in SurePath-conserveervloeistof (ALLEEN voor High-Risk HPV DNA-tests)
- Biopten die zijn opgenomen in *digene* sampletransportmedium (STM)

Bij gebruikmaking van de Low-Risk en High-Risk HPV-probes kan deze test voor de volgende doeleinden worden gebruikt:

- als hulpmiddel bij de diagnose van seksueel overdraagbare HPV-infecties met HPV-typen 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 en 68.
- om onderscheid te kunnen maken tussen twee HPV DNA-groepen: laagrisico-HPV-typen 6, 11, 42, 43 en 44, en hoogrisico-HPV-typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 en 68; welk specifiek HPV-type er aanwezig is, kan echter niet worden vastgesteld.

Bij gebruikmaking van de High-Risk HPV-probe kan deze test voor de volgende doeleinden worden gebruikt:

- voor detectie van hoogrisico-HPV-typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 en 68, waarvan is aangetoond dat ze de primaire causale factor vormen bij de ontwikkeling van baarmoederhalskanker.
- als eerste screeningstest bij bevolkingsonderzoek, al dan niet in combinatie met een cervixuitstrijkje, om te bepalen of vrouwen een verhoogd risico lopen op de ontwikkeling van baarmoederhalskanker of op de aanwezigheid van hooggradige cervixpathologie. De diagnose HPV vormt in toenemende mate een aanwijzing voor een cervixpathologie naarmate de leeftijd vordert.
- als vervolgstest voor patiënten na een abnormale Pap-uitslag of bij cervixpathologie, om te bepalen of doorverwijzing voor colposcopie of andere vervolgproucedures noodzakelijk is.
- als vervolgstest voor patiënten met een uitslag van het cervixuitstrijkje die duidt op CIN-1 laesies (LSIL, Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion) of CIN-2 of CIN-3 laesies (HSIL, High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion) voordat colposcopie wordt verricht. Bij deze patiënten zal een uitslag van de *digene* HC2 HPV DNA Test de arts kunnen helpen bij de keuze van de behandelingsmethode voor de patiënt, doordat de uitslag kan dienen als hulpmiddel bij de risicobeoordeling van deze vrouwen op de afwezigheid van hooggradige cervixafwijkingen.

De *digene* HC2 HPV DNA Test dient in combinatie met klinische informatie die ontleend is aan andere diagnostische en screeningstests, lichamelijke onderzoeken en de volledige medische geschiedenis, en in overeenstemming met passende behandelingsmethoden voor de patiënt te worden gebruikt. Uitslagen van de *digene* HC2 HPV DNA Test **mogen niet** worden gebruikt als enige basis voor de klinische beoordeling en behandeling van patiënten.

SAMENVATTING EN UITLEG

De aanwezigheid van bepaalde HPV-typen in het vrouwelijke geslachtsorgaan wordt in verband gebracht met een aantal aandoeningen waaronder condylomen, bowenoïde papulose, cervicale, vaginale en vulvaire intra-epitheliale neoplasie en carcinoom.¹⁻³ Het wordt algemeen aanvaard dat deze virussen hoofdzakelijk seksueel overdraagbaar zijn en dat hoogrisico-HPV-typen de voornaamste erkende risicofactoren vormen voor de ontwikkeling van baarmoederhalskanker.⁴⁻⁸

Humane papillomavirussen bestaan uit een icosahedraal viruspartikel (virion) dat bestaat uit een circulair dubbelstrengs DNA-molecuul van 8000 baseparen omgeven door een capside. Na infectie van epitheelcellen nestelt het virale DNA zich door de gehele dikte van het epitheel, maar intacte virions worden alleen in de bovenste lagen van het weefsel aangetroffen. Viraal DNA kan dus ofwel in virions, ofwel als episomale of geïntegreerde HPV-sequenties worden gevonden, afhankelijk van het type en de graad van de laesie.

Tot nu toe kan HPV niet in vitro worden gekweekt en immunologische tests zijn ontoereikend om de aanwezigheid vast te stellen van cervicale HPV-infectie. Anogenitale HPV-infectie kan indirect worden aangetoond door lichamelijk onderzoek en door de aanwezigheid van karakteristieke cellulaire veranderingen die geassocieerd zijn met virusreproductie in cervixuitstrijkjes of bipten. Bipten kunnen ook worden geanalyseerd door direct de aanwezigheid van HPV-DNA te meten met behulp van nucleïnezuurhybridisatie.

Van oudsher werden HPV-typen 16 en 18 beschouwd als HPV-typen die een hoog risico van kanker met zich meebrachten, en HPV-typen 6 en 11 als HPV-typen met een laag risico van kanker.⁸⁻¹⁰ Later is van HPV-typen 31, 33 en 35 aangetoond dat zij een middelsterk verband hebben met kanker.^{2,11-14} Ondanks dit nuttige conceptuele kader zijn deze 7 HPV-typen verantwoordelijk voor slechts zo'n 70% van de cervicale neoplasma's.⁹⁻¹¹ Andere HPV-typen, waaronder de typen 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 en 68, zijn geïdentificeerd als de voornaamste HPV-typen die detecteerbaar zijn in de overige laesies.^{15-20,32-36} Deze HPV-typen kunnen ook worden onderverdeeld in laag-, midden- en hoogrisicogroepen, op basis van hun respectieve indeling in de diverse categorieën van histopathologische diagnose.^{21, 32-37}

HPV-DNA blijkt bij ongeveer 10% van de vrouwen met normaal cervicaal epitheel aanwezig te zijn, maar de werkelijke prevalentie in specifieke groepen vrouwen wordt sterk beïnvloed door leeftijd en andere demografische variabelen.^{2,10,21,31} Uit prospectieve onderzoeken is gebleken dat 15-28% van de HPV-DNA-positieve vrouwen binnen 2 jaar squameuze intra-epitheliale neoplasie (SIL) ontwikkelde, in vergelijking met slechts 1-3% van de HPV-DNA-negatieve vrouwen.^{22,23} Met name het risico van progressie bij HPV-typen 16 en 18 was groter (ongeveer 40%) dan bij andere HPV-typen.²²

PRINCIPE VAN DE PROCEDURE

De *digene* HC2 HPV DNA Test met gebruikmaking van HC2-technologie is een hybridisatie-assay met capturing van antilichamen en signaalversterking waarbij detectie plaatsvindt met behulp van microtiterplaat-chemiluminescentie. Samples die het target-DNA bevatten hybridiseren met een specifieke HPV RNA-probe. De resulterende RNA:DNA-hybriden worden gevangen op het oppervlak van een microtiterplaat die is gecoat met antilichamen specifiek voor RNA:DNA-hybriden. De geïmmobiliseerde hybriden worden vervolgens blootgesteld aan specifiek voor RNA:DNA-hybriden alkalische fosfatase geconjugeerde antilichamen en gedetecteerd met een chemiluminescent substraat. Elk antilichaam is geconjugeerd met meerdere moleculen alkalische fosfatase. Meerdere geconjugeerde antilichamen binden aan elke gevangen hybride, met als gevolg een substantiële signaalversterking. Wanneer het substraat door de gebonden alkalische fosfatase wordt gesplitst, wordt er licht uitgezonden dat gemeten wordt als relatieve lichteenheden (RLE's) met behulp van een luminometer. De intensiteit van het uitgezonden licht duidt op de aanwezigheid of het ontbreken van target-DNA in de sample.

Een RLE-meting gelijk aan of groter dan de cut-off-waarde wijst op aanwezigheid van HPV-DNA-sequenties in de sample. Een RLE-meting kleiner dan de cut-off-waarde wijst op het ontbreken van de specifieke geteste HPV-DNA-sequenties of HPV-DNA-concentraties die onder de detectiegrens van de assay vallen.

Tests met een hoog sampledoorvoervolume met de *digene* HC2 HPV DNA Test kunnen worden uitgevoerd met gebruik van het Rapid Capture[®] System (RCS). Dit instrument verwerkt maximaal 352 samples in acht uur. Om te kunnen testen met een hoog sampledoorvoervolume worden alle stappen van de assay uitgevoerd met het RCS, met uitzondering van sampledenaturatie, chemiluminescente signaaldetectie en rapportage van resultaten.

MEEGELEVERDE REAGENTIA EN MATERIALEN

Er zitten 96 tests in een digene HC2 HPV DNA Test-kit (cat. nr. 5196-1330). Het aantal patiëntenresultaten varieert, afhankelijk van het aantal keren dat een kit gebruikt wordt:

1 x gebruik = 40 patiëntenresultaten (laagrisico en hoogrisico)

2 x gebruik = 32 patiëntenresultaten (laagrisico en hoogrisico)

- 1 x 0,35 ml **Indicatorkleurstof**
Bevat 0,05% w/v natriumazide.
- 1 x 50 ml **Denaturatiereagens**
Verdunde oplossing van natriumhydroxide (NaOH).
- 1 x 5 ml **Probe-verdunningsmiddel**
Gebufferde oplossing met 0,05% w/v natriumazide.
- 1 x 150 µl **Laagrisico HPV-probe**
HPV 6/11/42/43/44 RNA-probe in gebufferde oplossing (groene dop).
- 1 x 100 µl **Hoogrisico HPV-probe**
HPV 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68 RNA-probe in gebufferde oplossing (rode dop).
- 1 x 1 ml **Low-Risk HPV Quality Control** (kwaliteitscontrole voor laagrisico-HPV)
5 pg/ml (500.000 kopieën/ml) gekloneerd HPV 6 DNA en carrier-DNA in STM met 0,05% w/v natriumazide.
- 1 x 1 ml **High-Risk HPV Quality Control**
(kwaliteitscontrole voor hoogrisico-HPV) 5 pg/ml (500.000 kopieën/ml) gekloneerd HPV 16-DNA en drager-DNA in STM met 0,05% w/v natriumazide.
- 1 x 2,0 ml **Negatieve kalibrator**
Carrier-DNA in sampletransportmedium (STM) met 0,05% w/v natriumazide.
- 1 x 1,0 ml **Kalibrator voor laagrisico-HPV**
1 pg/ml gekloneerd HPV 11 DNA en carrier-DNA in STM met 0,05% w/v natriumazide.
- 1 x 1,0 ml **Kalibrator voor hoogrisico-HPV**
1 pg/ml gekloneerd HPV 16 DNA en carrier-DNA in STM met 0,05% w/v natriumazide.
- 1 x 1 **Capture-microtiterplaat**
Gecoat met anti-RNA:DNA-hybride antilichamen.
- 1 x 12 ml **Detectiereagens 1**
Alkalische fosfatase-geconjugeerde antilichamen tegen RNA:DNA-hybriden in gebufferde oplossing met 0,05% w/v natriumazide.
- 1 x 12 ml **Detectiereagens 2**
CDP-Star[®] met Emerald II (substraat voor chemiluminescentie).
- 1 x 100 ml **Wasbufferconcentraat**
Bevat 1,5% w/v natriumazide.

BENODIGDE, MAAR NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN

Hybrid Capture System *In Vitro* diagnostische apparatuur en hulpmiddelen^A

<i>digene</i> Hybrid Capture 2 System (“ <i>digene</i> HC2 System”), bestaande uit een door QIAGEN goedgekeurde luminometer (“DML-instrument”), een door QIAGEN goedgekeurde personal computer en bijbehorende randapparatuur (monitor, toetsenbord, muis, printer en printerkabel), <i>digene</i> HC2 System Software (“ <i>digene</i> assay analysis software”) (<i>digene</i> HC2-systeemsoftware, <i>digene</i> assay-analysesoftware), <i>digene</i> HC2 System Assay Protocols for HPV (assayprotocollen HC2-systeem voor HPV), LumiCheck Plate Software (software voor de LumiCheck Plate) en de <i>digene</i> HC2 System Software User Manual (gebruikershandleiding <i>digene</i> HC2-systeemsoftware)	Rapid Capture System (optioneel voor het testen met een hoog sampledoorvoervolume) ^E
Hybrid Capture System Rotary Shaker I (HCS roterend schudapparaat I)	Wasapparaat
Hybrid Capture System Microplate Heater I (HCS microtiterplaatverwarmer I)	Microtiterplaten voor hybridisatie
Hybrid Capture System Automated Plate Washer (HCS automatische plaatwasser)	Dekslens voor microtiterplaten
Hybrid Capture System Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 (HCS MST-vortexer 2) (optioneel) ^B	Lege strips voor microtiterplaten (verkrijgbaar via Costar, model #2581); optioneel voor gebruik met de Automated Plate Washer
Conversierek en rekdeksel (optioneel)	Extra lange pipetpunten voor het verwijderen van samples
<i>digene</i> samplerek met rekdeksel (optioneel)	Sampleafnamebuizen
EXPAND-4 pipet met standaard (optioneel) ^C	Rek voor sampleafnamebuizen
<i>digene</i> HC2 DNA-sampleafnamehulpmiddel ^D	Schroefdoppen voor sampleafnamebuizen
Dispenser en snijapparaat voor Tube Sealer (buisafdekfolie) (optioneel, gebruikt met de MST Vortexer 2)	Wegwerpreagensreservoirs
	DuraSeal™ Tube Sealer Film (DuraSeal™ afdekfolie voor het afsluiten van buizen)
	Hybridisatie-microbuisjes
	Rek voor microbuisjes
	Plaatafsluiters

Algemene laboratoriumapparatuur en accessoires

65 ± 2°C waterbad van geschikt formaat voor hetzij 1 conversierek (36 x 21 x 9 cm) dan wel samplerekken

Microcentrifuge (optioneel voor het centrifugeren van probevolumes om een maximaal probevolume te verkrijgen)

Vortexmixer met cupbevestiging

Eénkanaalsmicropipet; variabele instellingen voor volumes van 20-200 µl en 200-1000 µl

Positive-displacement-repeteerpipet, zoals de Eppendorf® Repeater®-pipet of gelijkwaardig

8-kanaalspipet; variabele instelling voor volumes van 25–200 µl

Timer

Natriumhypochlorietoplossing, 5% v/v (of huishoudchlor) Parafilm® of gelijkwaardig

Wegwerppipetpunten met aerosolfilter voor eenkanaalspipet (20 t/m 200 µl en 200-1000 µl)

Wegwerppunten voor Eppendorf repeteerpipet (25 en 500 µl)

Wegwerppunten voor 8-kanaalspipet (25 t/m 200 µl)

Kimtowels®-doekjes of gelijkwaardige pluisvrije papieren doekjes

Wegwerptafelfilterpapier

Poedervrije handschoenen

5 ml en/of 15 ml snap-cap, polypropyleen buisjes met ronde bodem (voor probeverduunning)

2,0 ml polypropyleen microcentrifugebuisjes met dop

Aanvullende apparatuur en accessoires voor de verwerking van samples in Surepath-conserveervloeistof

Centrifuge met uitzwaairotor die een snelheid van 800 ± 15 x g kan bereiken en waarin conische polypropyleen centrifugebuisjes van 15 ml passen

digene HC2 Sample Conversion Tubes (15-ml conische buisjes)^F

7-ml transferpipetten met standaard punt of een gelijkwaardig hulpmiddel

QIAGEN Specimen Transport Media (STM, sampletransportmedia)

Wegwerppunten voor Eppendorf repeteerpipet (100 µl)

Aanvullende apparatuur en accessoires voor de verwerking van samples in PreservCyt-oplossing

Centrifuge met uitzwaairotor die 2900 ± 150 x g kan bereiken en conische polypropyleen centrifugebuisjes van 10 ml of 15 ml kan bevatten

Serologische pipetten of transferpipetten van 5 ml

digene HC2 Sample Conversion Kit^A (HC2 sampleconversie-kit)

Wegwerppunten voor Eppendorf repeteerpipet (50 en 100 µl)

Voor handmatige vortexprocedure:

digene HC2 Sample Conversion Tubes (HC2 sampleconversiebuisjes) (15-ml conisch)^F, 10-ml conische buisjes met dop van Sarstedt, of 15-ml polypropyleen centrifugebuisjes met dop en conische bodem van het merk VWR® of Corning®

Buizenrek voor conische buizen van 10 ml of 15 ml

Voor Multi-Specimen Tube Vortexer 2-procedure

digene HC2 Sample Conversion Tubes (15-ml conisch)^F

Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2

Conversierek en -deksel (speciaal voor conische buizen van 15 ml)

Dispenser en snijapparaat voor Tube Sealer (buisafdekfolie)

DuraSeal Tube Sealer Film (buisafdekfolie) (gebruikt met de MST Vortexer 2)

^A Bij QIAGEN zijn uitsluitend apparatuur en accessoires verkrijgbaar die zijn gevalideerd met de *digene* HC2 HPV DNA Tests.

^B Ook nodig als u gebruikmaakt van de semi-automatische RCS-applicatie.

^C Speciaal artikel. Andere speciale multikanaalspipetten met instelbare puntafstand kunnen worden gebruikt, zolang een maximale puntafstand van 3,2 cm kan worden ingesteld. Als alternatief kan een enkelkanaalspipet worden gebruikt die geschikt is voor het pipetteren van 75 µl.

^D De werkingseigenschappen van de *digene* HC2 HPV DNA Test zijn alleen met de aangegeven sampleafnamekits vastgesteld.

^E Raadpleeg de *Gebruiksaanwijzing Rapid Capture System* voor specifieke instructies voor het gebruik van dat systeem voor het testen met een hoog sampledoorvoervolume met deze assay.

^F De *digene* HC2 Sample Conversion Tubes (van het merk VWR of Corning®), verkrijgbaar via QIAGEN, moeten worden gebruikt om ervoor te zorgen dat de assay naar behoren werkt wanneer gebruik wordt gemaakt van de procedure met de Multi-Specimen Tube Vortexer 2.

WAARSCHUWINGEN EN VOORZORGSMAATREGELEN

LEES DE GEHELE GEBRUIKSAANWIJZING NAUWKEURIG VOORDAT U DE TEST GAAT VERRICHTEN.

VEILIGHEIDSMATREGELEN

ALLE SAMPLES moeten als potentieel besmettelijk worden beschouwd. Er is geen testmethode bekend die volledige zekerheid kan bieden dat samples geen infectie kunnen overbrengen. Het verdient aanbeveling samples van menselijke oorsprong te behandelen overeenkomstig de toepasselijke nationale/plaatselijke werkpraktijk betreffende de bioveiligheid. Deze praktijken voor biologische veiligheid moeten worden toegepast bij materialen die vermoedelijk of zeker infectueuze agentia bevatten. Deze voorzorgen omvatten, maar beperken zich niet tot de volgende maatregelen:

1. Niet met de mond pipetteren.
2. Rook, eet of drink niet in ruimten waar reagentia of samples gehanteerd worden.
3. Draag poedervrije wegwerphandschoenen bij het werken met reagentia of samples. Was uw handen grondig na het uitvoeren van de test.
4. Reinig en desinfecteer alle gemorste hoeveelheden sample met behulp van een tuberculocide desinfectans zoals 0,5% v/v natriumhypochloriet of een ander geschikt desinfectans.^{42,43}
5. Ontsmet alle samples, reagentia en andere potentieel verontreinigde materialen en voer ze af volgens nationale en plaatselijke voorschriften.

Sommige reagentia bevatten natriumazide. Van natriumazide is gemeld dat het lood- of koperazide kan vormen in afvoerleidingen van laboratoria. Deze aziden kunnen als gevolg van schokken, bijvoorbeeld gehamer, exploderen. Om de vorming van lood- of koperazide te voorkomen, moeten afvoerleidingen na het weggooien van oplossingen die natriumazide bevatten goed worden doorgespoeld met water. Om verontreinigingen te verwijderen uit oude afvoerbuizen waarin een azideophoping vermoed wordt, adviseert de Amerikaanse Occupational Safety and Health Administration het volgende: (1) vloeistof uit de opvanginrichting hevelen met behulp van een rubber of plastic slang, (2) vullen met 10% v/v natriumhydroxideoplossing, (3) 16 uur laten inwerken en (4) grondig naspoelen met water.

RCS-geautomatiseerd testen

Raadpleeg de *Gebruiksaanwijzing Rapid Capture System* voor meer waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen specifiek voor het gebruik van dat systeem voor het testen met een hoog sampledoervoervolume.

VEILIGHEIDS- EN RISICOBEPALINGEN VOOR COMPONENTEN

De volgende risico- en veiligheidszinnen zijn van toepassing op componenten van de *digene* HC2 HPV DNA Test-kit:

Wasbufferconcentraat



Bevat: Natriumazide. Waarschuwing! Schadelijk bij opname door de mond. Schadelijk voor in het water levende organismen; kan in het aquatisch milieu op lange termijn schadelijke effecten veroorzaken. Voorkom lozing in het milieu. Inhoud/houder afvoeren naar een erkend afvalverwerkingsbedrijf.

Denaturatiereagens



Bevat: natriumhydroxide. Gevaar! Veroorzaakt ernstige brandwonden op de huid en oogletsel. Kan corrosief zijn voor metalen. Inhoud/houder afvoeren naar een erkend

afvalverwerkingsbedrijf. INDIEN IN DE OGEN: Grondig spoelen met water gedurende een aantal minuten. Verwijder contactlenzen indien aanwezig en als dit makkelijk te doen is. Doorgaan met spoelen. INDIEN OP HUID (of haar): Alle verontreinigde kleding direct verwijderen / uittrekken. Huid spoelen met water / douche. Waarschuw direct een GIFCENTRUM of een arts. Achter slot bewaren. Draag beschermende handschoenen / beschermende kleding / een beschermingsmiddel voor de ogen / voor het gezicht.

Probe-verdunningsmiddel



Bevat: azijnzuur; polyacrylzuur. Gevaar! Veroorzaakt ernstige brandwonden op de huid en oogletsel. Inhoud/houder afvoeren naar een erkend afvalverwerkingsbedrijf. INDIEN IN DE OGEN: Grondig spoelen met water gedurende een aantal minuten. Verwijder contactlenzen indien aanwezig en als dit makkelijk te doen is. Doorgaan met spoelen. INDIEN OP HUID (of haar): Alle verontreinigde kleding direct verwijderen / uittrekken. Huid spoelen met water / douche. Waarschuw direct een GIFCENTRUM of een arts. Achter slot bewaren. Draag beschermende handschoenen / beschermende kleding / een beschermingsmiddel voor de ogen / voor het gezicht.

High-Risk HPV-kalibrator

Waarschuwing! Veroorzaakt lichte huidirritatie. Als huidirritatie optreedt: Medisch advies / medische hulp invoeren.

Kalibrator voor laagrisico-HPV

Waarschuwing! Veroorzaakt lichte huidirritatie. Als huidirritatie optreedt: Medisch advies / medische hulp invoeren.

High-Risk HPV-kwaliteitscontrole

Waarschuwing! Veroorzaakt lichte huidirritatie. Als huidirritatie optreedt: Medisch advies / medische hulp invoeren.

Low-Risk HPV-kwaliteitscontrole

Waarschuwing! Veroorzaakt lichte huidirritatie. Als huidirritatie optreedt: Medisch advies / medische hulp invoeren.


Negatieve kalibrator

Waarschuwing! Veroorzaakt lichte huidirritatie. Als huidirritatie optreedt: Medisch advies / medische hulp invoeren.


Verdere informatie

Veiligheidsinformatiebladen: www.qiagen.com/safety

VOORZORGSMAATREGELEN BIJ DE VERWERKING

1. Voor in-vitrodiagnostiek.
2. De cervixborstel is uitsluitend bestemd voor gebruik bij niet-zwangere vrouwen.
3. Gebruik de reagentia niet na de houdbaarheidsdatum die naast het symbool  op de verpakking staat vermeld.
4. Wanneer u de assay buiten de aangegeven tijd- en temperatuurbereiken uitvoert, kan dit ongeldige testresultaten opleveren. Assays die niet binnen de vastgestelde tijds- en temperatuurbereiken vallen, zijn ongeldig en moeten worden herhaald.
5. Om betrouwbare testresultaten te krijgen, moeten de procedure, de criteria voor verificatie van de assaykalibratie, de kwaliteitscontrole en de interpretatie van de samplersresultaten van de *digene* HC2 HPV DNA Test nauwgezet worden gevolgd.
6. Het is belangrijk om exact het aangegeven volume reagens te pipetteren en om elke keer dat reagens wordt toegevoegd, goed te mengen. Als dit wordt nagelaten, kan dit leiden tot onjuiste testresultaten. Als de aangegeven kleurveranderingen hebben plaatsgevonden, betekent dit dat aan deze voorwaarden is voldaan.
7. De componenten van de kit zijn als één geheel getest. Wissel onderling **geen** componenten uit van andere bronnen of met andere lotnummers.
8. Nucleïnezuren zijn zeer gevoelig voor afbraak door in de omgeving aanwezige nucleases. Nucleases zijn aanwezig op de huid van mensen en op oppervlakken en materialen die door mensen zijn aangeraakt. Reinig werkoppervlakken en bedek ze met een wegwerp-werkbankbekleding, **en draag bij het uitvoeren van alle stappen van de assay poedervrije wegwerphandschoenen.**
9. Zorg ervoor dat de capture-microtiterplaat en detectiereagens 2 tijdens het uitvoeren van de assay niet gecontamineerd raken met exogene alkalische fosfatase. Stoffen die alkalische fosfatase kunnen bevatten zijn o.a. detectiereagens 1, bacteriën, speeksel, haar en huidoliën. **Het afdekken van de capture-microtiterplaat is vooral belangrijk na de wasfase en tijdens de incubatie van detectiereagens 2, aangezien exogene alkalische fosfatase kan reageren met detectiereagens 2, hetgeen fout-positieve resultaten kan opleveren.**
10. Bescherm detectiereagens 2 tegen langdurige blootstelling aan direct licht. Gebruik detectiereagens 2 onmiddellijk na de aliquotverdeling en vermijd direct zonlicht.
11. De repeteerpipet dient vóór het toedienen van reagens gevuld te worden en moet periodiek op grote luchtbellen worden gecontroleerd. Excessieve aantallen grote luchtbellen in de punt van de repeteerpipet kunnen onnauwkeurige afgifte veroorzaken, wat kan worden vermeden door de pipet te vullen, alle vloeistof uit te pipetteren en opnieuw te vullen. Raadpleeg de gebruikshandleidingen bij de pipet voor specifieke richtlijnen voor gebruik.
12. Voer het pipetteren met de meerkanaalspipet uit door gebruik te maken van de omgekeerde pipetteertechniek (zie *Hybride-detectie*) voor het doseren van detectiereagens 1 en 2. Controleer of alle pipetpunten van de meerkanaalspipet goed zitten en goed gevuld zijn.
13. Zorg ervoor dat elke microtiterplaatwell grondig gewassen wordt, zoals aangegeven in de instructies Handmatig wassen. Als de wells niet goed worden gewassen, geeft dit een verhoogd achtergrondsignaal. Dit kan fout-positieve resultaten opleveren. Restanten van wasbuffer in de wells kunnen leiden tot een verminderd signaal of slechte reproduceerbaarheid.
14. Wacht ten minste 60 minuten totdat de Microplate Heater I van het Hybrid Capture System vanuit een koude start op een temperatuur is gekomen van $65^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Als u niet de tijd neemt voor deze opwarmperiode, kan dit ertoe leiden dat de hybridisatie-microtiterplaat smelt. Raadpleeg de *Gebruikershandleiding Microplate Heater I* voor details.

VOORBEREIDEN EN BEWAREN VAN REAGENTIA

1. Bewaar de kit na ontvangst bij 2-8°C. Het wasbufferconcentraat, denaturatiereagens en de indicatorkleurstof mogen indien gewenst bij 2-30°C worden bewaard.
2. Niet gebruiken na de houdbaarheidsdatum die naast het symbool  op de verpakking staat vermeld of na de houdbaarheidsdatum van de bereide reagentia (zie onder).
3. Alle reagentia zijn gereed voor gebruik, behalve het denaturatiereagens, de Low-Risk en High-Risk HPV-probes en het wasbufferconcentraat.

Voor het testen van samples op de aanwezigheid van een van de 18 HPV-typen is een methode met een Combined-Probe Cocktail (CPC, gecombineerde-probecocktail) meegeleverd. Om met behulp van deze optie te testen moet een gecombineerde-probecocktail worden voorbereid door verdunde Low-Risk HPV-probemix en verdunde High-Risk HPV-probemix met elkaar te mengen voordat de *digene* HC2 HPV DNA Test wordt uitgevoerd. Bij de Dual Probe-methode (dubbele-probemethode) wordt gebruikgemaakt van afzonderlijke Low-Risk en High-Risk HPV-probemixen. Zie de aanwijzingen hierna.

Raadpleeg voor het testen met een hoog sampledoorvoervolume de *Gebruiksaanwijzing Rapid Capture System* voor de bereiding van HPV-probemix(en), wasbuffer, detectiereagens 1 en detectiereagens 2, aangezien deze instructies specifiek zijn voor gebruik van dat systeem voor het testen met een hoog sampledoorvoervolume.

REAGENS	BEREIDINGSMETHODE
Denaturatiereagens	<p>Eerst bereiden:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Voeg 5 druppels indicatorkleurstof toe aan de fles denaturatiereagens en meng grondig. Het denaturatiereagens dient een egale donkerpaarse kleur te hebben. • Na de bereiding blijft het denaturatiereagens gedurende drie maanden stabiel indien bewaard bij 2-8°C. Label het met de nieuwe houdbaarheidsdatum. Als de kleur verbleekt, 3 druppels indicatorkleurstof toevoegen en grondig mengen vóór gebruik. <p>Waarschuwing: Denaturatiereagens is corrosief. Draag geschikte beschermende kleding, handschoenen en een bescherming voor de ogen/het gezicht. Wees voorzichtig bij het verwijderen van de dop en bij het hanteren van de fles.</p>
Low-Risk HPV-probemix (bereid uit Low-Risk HPV-probe en probe-verdunningsmiddel-reagentia)	<p>Bereiden tijdens de incubatie van de sampledenaturatie:</p> <p>Belangrijk: Soms raakt probe opgesloten in het deksel van de flacon.</p> <p>Opmerking: Voorkom verontreiniging met RNase van probe en probemix. Gebruik pipetpunten met aërosolfilter om de probe te pipetteren. Het probe-verdunningsmiddel is viskeus.</p> <p>Zorg ervoor dat u HPV-probes tijdens het bereiden grondig mengt. Tijdens de mengstap moet er in de vloeistof een zichtbare werveling ontstaan. Een onvolledige menging kan leiden tot een verminderd signaal.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Centrifugeer de flacon met Low-Risk HPV-probe kort om de vloeistof naar de bodem van de flacon te brengen. Voorzichtig schudden om te mengen. • Bepaal hoeveel probemix u nodig hebt (25 µl/test). Geadviseerd wordt om extra probemix te maken ter compensatie van het volume dat eventueel verloren gaat in de pipetpunten of aan de zijanten van de flacons. Raadpleeg de hieronder vermelde aanbevolen hoeveelheden. Het kleinste aantal wells dat per gebruik wordt aanbevolen is 24. Indien er minder dan 24 wells per assay gewenst zijn, kan het totale aantal tests per kit worden verminderd in verband met de beperkte hoeveelheden probe en probe-verdunningsmiddel. • Breng de benodigde hoeveelheid probe-verdunningsmiddel over in een nieuwe wegwerp-container. Afhankelijk van het aantal tests wordt een polypropyleen buisje met snap-cap en ronde bodem van 5 ml of van 15 ml aanbevolen. Maak een 1:25 verdunning van Low-Risk HPV-probe in probe-verdunningsmiddel om de probemix te bereiden.

	<table border="1" data-bbox="550 170 1354 331"> <thead> <tr> <th data-bbox="553 174 820 226">Aantal tests/strips</th> <th data-bbox="820 174 1097 226">Volume probe-verdunningsmiddel*</th> <th data-bbox="1097 174 1351 226">Volume probe*</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="553 226 820 258">48/6</td> <td data-bbox="820 226 1097 258">2,0 ml</td> <td data-bbox="1097 226 1351 258">80,0 µl</td> </tr> <tr> <td data-bbox="553 258 820 289">24/3</td> <td data-bbox="820 258 1097 289">1,0 ml</td> <td data-bbox="1097 258 1351 289">40,0 µl</td> </tr> <tr> <td data-bbox="553 289 820 327">per well</td> <td data-bbox="820 289 1097 327">0,045 ml</td> <td data-bbox="1097 289 1351 327">1,8 µl</td> </tr> </tbody> </table> <p data-bbox="613 342 1234 367">*Deze waarden zijn inclusief het aanbevolen extra volume.</p> <ul data-bbox="456 380 1419 604" style="list-style-type: none"> <li data-bbox="456 380 1419 485">• Pipetteer de Low-Risk HPV-probe in het probe-verdunningsmiddel door de pipetpunt tegen de binnenwand van de buis te plaatsen, vlak boven de meniscus, en de inhoud eruit te pipetteren. De punt mag niet in het probe-verdunningsmiddel worden ondergedompeld. <li data-bbox="456 495 1419 604">• Vortex gedurende minimaal 5 seconden met maximale snelheid om grondig te mengen. Er moet een zichtbare werveling ontstaan. Label als "Low-Risk HPV-probemix" en bewaar hem totdat u hem gaat gebruiken in een schone, afgesloten container. Ongebruikte hoeveelheden probemix moeten worden weggeworpen. 	Aantal tests/strips	Volume probe-verdunningsmiddel*	Volume probe*	48/6	2,0 ml	80,0 µl	24/3	1,0 ml	40,0 µl	per well	0,045 ml	1,8 µl
Aantal tests/strips	Volume probe-verdunningsmiddel*	Volume probe*											
48/6	2,0 ml	80,0 µl											
24/3	1,0 ml	40,0 µl											
per well	0,045 ml	1,8 µl											
High-Risk HPV-probemix	Bereiden zoals Low-Risk HPV-probemix hierboven. Label als "High-Risk HPV-probemix". Ongebruikte hoeveelheden probemix moeten worden weggeworpen.												
Gecombineerde-probecocktail	Bereid Low-Risk en High-Risk HPV-probemixen zoals hierboven beschreven. Voeg de gehele inhoud verdunde Low-Risk HPV-probemix toe aan de buis met verdunde High-Risk HPV-probemix. Meng grondig door gedurende ten minste 5 seconden op volle snelheid te vortexen. Er moet een zichtbare werveling ontstaan. Label als "Gecombineerde-probecocktail". Ongebruikte hoeveelheden probemix moeten worden weggeworpen.												

<p>Wasbuffer</p>	<p>Bereiden tijdens de capture-stap:</p> <p>Voor de Hybrid Capture System Automated Plate Washer kan de wasbuffer zoals hieronder beschreven worden bereid en bewaard in een afgesloten container, of kan 1 liter ineens worden bereid en in de wasreservoirs van de Automated Plate Washer worden gedaan. Zie de onderstaande tabel voor de mengvolumes:</p> <p>Raadpleeg de Gebruikershandleiding Automated Plate Washer voor instructies voor verzorging en onderhoud.</p> <p>Waarschuwing: Wasbufferconcentraat is giftig indien het wordt ingenomen. Draag geschikte beschermende kleding, handschoenen en bescherming voor de ogen/het gezicht. Voeg om blootstelling bij de bereiding te minimaliseren water toe aan het wasbufferconcentraat.</p> <table border="1" data-bbox="519 514 1347 682"> <thead> <tr> <th>Hoeveelheid wasbuffer-concentraat</th> <th>Hoeveelheid gedestilleerd of gedeïoniseerd water</th> <th>Uiteindelijk volume wasbuffer</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>33,3 ml</td> <td>966,7 ml</td> <td>1L</td> </tr> <tr> <td>66,6 ml</td> <td>1.933,4 ml</td> <td>2L</td> </tr> <tr> <td>100 ml</td> <td>2.900 ml</td> <td>3L</td> </tr> </tbody> </table> <p>Opmerking: Het is van groot belang dat de stroomvoorziening naar de Automated Plate Washer altijd ingeschakeld blijft. Hierdoor kan de onderhoudspoeling plaatsvinden als het apparaat acht uur niet is gebruikt.</p> <p>Zorg er voor elke assay voor dat het afvalreservoir van de Automated Plate Washer leeg is en dat het spoelreservoir gevuld is met gedestilleerd of gedeïoniseerd water.</p> <p>Voor de handmatige plaatwasmethode:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Meng het wasbufferconcentraat goed. • Verdun 100 ml wasbufferconcentraat met 2,9 L gedestilleerd of gedeïoniseerd water in het wasapparaat en meng goed (uiteindelijk volume moet 3 L zijn). • Sluit de container af om contaminatie of verdamping te voorkomen. <p>Na de bereiding blijft de wasbuffer gedurende drie maanden stabiel bij 2-30°C. Label hem met de nieuwe houdbaarheidsdatum. Indien de wasbuffer gekoeld is bewaard, moet deze vóór gebruik op een temperatuur van 20-25°C worden gebracht.</p> <p>Het wordt aanbevolen om het wasapparaat en de leidingen eens in de drie maanden met 0,5% natriumhypochlorietoplossing te reinigen en grondig te spoelen met gedestilleerd of gedeïoniseerd water, ter voorkoming van mogelijke contaminatie met alkalische fosfatase afkomstig van bacteriën en schimmels.</p>	Hoeveelheid wasbuffer-concentraat	Hoeveelheid gedestilleerd of gedeïoniseerd water	Uiteindelijk volume wasbuffer	33,3 ml	966,7 ml	1L	66,6 ml	1.933,4 ml	2L	100 ml	2.900 ml	3L
Hoeveelheid wasbuffer-concentraat	Hoeveelheid gedestilleerd of gedeïoniseerd water	Uiteindelijk volume wasbuffer											
33,3 ml	966,7 ml	1L											
66,6 ml	1.933,4 ml	2L											
100 ml	2.900 ml	3L											

VOLUMES VOOR GEBRUIJKLARE REAGENTIA**Detectiereagens 1
en
detectiereagens 2****Vlak vóór gebruik:**

Meng het reagens grondig en meet daarna de juiste hoeveelheid detectiereagens 1 of detectiereagens 2 af in een schoon reagensreservoir volgens de onderstaande richtlijnen. Deze reagentia **MOGEN NIET** worden terug gegoten in de originele flessen, om verontreiniging te voorkomen: **Gooi ongebruikt materiaal na gebruik weg**. Als u geen 8-kanaalspipet gebruikt, kunt u in plaats daarvan een geschikte repetierpipet gebruiken. In dit geval moeten er hoeveelheden van het reagens worden gemaakt in een polypropyleenbuisje van een geschikt formaat voor het vereiste volume zoals hieronder is aangegeven.

Aantal tests/strips	Volume detectie- reagens 1 of 2
96/12	inhoud flesje
72/9	7,0 ml
48/6	5,0 ml
24/3	3,0 ml
1 test	0,125 ml

AFNAME EN BEHANDELING VAN SAMPLES

Cervix-samples die met behulp van het *digene* HC2 DNA-sampleafnamehulpmiddel (bestaande uit een cervixborstel en *digene* sampletransportmedium) zijn afgenomen en getransporteerd, of samples die zijn afgenomen met behulp van een cervixborstel of met een endocervicale borstel-/spatelcombinatie en vervolgens in PreservCyt-oplossing zijn opgenomen, of cervix-samples die na afname zijn opgenomen in SurePath-conserveervloeistof zijn de enige samples die worden aangeraden voor gebruik met de *digene* HC2 HPV DNA Test. Samples die met andere hulpmiddelen voor sampleafname zijn genomen of in andere transportmedia zijn getransporteerd, zijn niet geschikt voor gebruik met deze assay. De werkingseigenschappen van deze kit werden alleen bepaald aan de hand van de aangegeven afnamekits. Cervix-samples moeten worden afgenomen vóór het aanbrengen van azijnzuur of jodium als een colposcopisch onderzoek wordt verricht. Raadpleeg de gebruiksaanwijzing van het *digene* HC2 DNA sampleafnamehulpmiddel voor meer informatie over het nemen van samples en behandelingsprocedures.

CERVIX-SAMPLES IN STM

STM-samples kunnen maximaal twee weken bij kamertemperatuur worden bewaard en zonder koeling naar het onderzoekslaboratorium worden verzonden. De samples moeten in een geïsoleerde container met een transportduur van één of twee nachten worden verzonden. In het onderzoekslaboratorium moeten de samples bij 2-8°C worden bewaard indien de assay binnen een week wordt uitgevoerd. Als de assay later dan na een week wordt uitgevoerd, kunnen de samples tot 3 maanden bij -20°C worden bewaard (zie voor het invriezen *Opmerkingen* onder *Cervixbiopten*). Er is een conserveermiddel aan het STM toegevoegd om bacteriële groei te remmen en de integriteit van het DNA te behouden. Het is **niet bedoeld** om de levensvatbaarheid van organismen of cellen in stand te houden. Het *digene* HC2 DNA-sampleafnamehulpmiddel mag niet worden gebruikt voor het nemen van samples bij zwangere vrouwen.

CERVIXBIOPTEN

Vers afgenomen cervixbiopten met een diameter van 2-5 mm kunnen ook met de *digene* HC2 HPV DNA Test worden geanalyseerd. Het biopsie-sample moet direct in 1,0 ml STM worden gedaan en bevroren bij -20°C worden bewaard. Biopsie-samples kunnen bij 2-30°C binnen één nacht naar het onderzoekslaboratorium worden gestuurd, waar ze tot aan verwerking bij -20°C moeten worden bewaard. Biopten kleiner dan 2 mm in doorsnede mogen niet worden gebruikt.

Opmerkingen: Ter voorkoming van losraken van de doppen van samplebuizen die worden verzonden of die ingevroren worden bewaard:

- Dek de doppen af met Parafilm voordat u samplebuizen verstuurt die daarvoor waren ingevroren. De samples kunnen ingevroren of bij 20-25 °C worden verzonden.
- Vervang de doppen direct door schroefdoppen voor afnamebuizen als de samples voor tests uit de vriezer worden gehaald.

CERVIX-SAMPLES IN PRESERVCYT-OPLOSSING

Samples die zijn afgenomen met behulp van een cervixborstel of met een endocervicale borstel-/spatelcombinatie en vervolgens in PreservCyt-oplossing zijn gedaan om te worden gebruikt bij het maken van ThinPrep[®] Pap-test-objectglasjes kunnen worden gebruikt in de *digene* HC2 HPV DNA Test. Samples moeten worden afgenomen volgens de standaardmethode, en de ThinPrep Pap-test-objectglasjes moeten volgens de aanwijzingen van Hologic worden bereid.

Opmerking: Er moet ten minste 4 ml PreservCyt-oplossing overblijven voor de *digene* HC2 HPV DNA Test. Samples waarvan na bereiding van de Pap-test minder dan 4 ml over is, bevatten mogelijk onvoldoende materiaal en kunnen in de *digene* HC2 HPV DNA Test een fout-negatief resultaat opleveren.

Nadat ze zijn afgenomen en voordat ze worden verwerkt voor de *digene* HC2 HPV DNA Test kunnen samples in PreservCyt-oplossing maximaal 3 maanden bij temperaturen tussen 2°C en 30°C worden

bewaard. Samples in PreservCyt-oplossing kunnen niet worden ingevroren. Raadpleeg de *procedure voor de bereiding van PreservCyt-samples* voor het verwerken van deze samples.

CERVIX-SAMPLES IN SUREPATH-CONSERVEERVLOEISTOF

(ALLEEN voor High-Risk HPV DNA-tests)

De handmatige samplebereiding van SurePath-samples wordt uitgevoerd met de postgradiënt-celpellet, die het resultaat is van de bereiding van SurePath Pap-test-objectglasjes. Bereid de SurePath Pap-test-objectglasjes volgens de toepasselijke instructies voor de BD PrepStain[®] Slide Processor.

Belangrijk: Direct na bereiding van de SurePath Pap-test-objectglasjes moet 2,0 ml SurePath-conserveervloeistof in het centrifugebuisje met de resterende celpellet worden gepipetteerd. Hierdoor blijft de integriteit van de postgradiënt-celpellet behouden voor het uitvoeren van de *digene* HC2 HPV DNA Test.

De postgradiënt-celpellet met SurePath-conserveervloeistof kan gedurende maximaal 4 weken worden bewaard bij 2–30°C, voordat de samples voor de *digene* HC2 HPV DNA Test worden bereid.

Postgradiënt-celpellets van SurePath-samples worden bereid zoals in deze gebruiksaanwijzing staat beschreven. Handmatige samplebereiding levert als resultaat een gedenatureerde sample die klaar is om te worden bewerkt in de hybridisatiestap van de test.

TESTPROCEDURE

Samples kunnen infectueuze agentia bevatten en moeten dienovereenkomstig worden behandeld. De *digene* HC2 HPV DNA Test kan handmatig worden uitgevoerd zoals beschreven in deze gebruiksaanwijzing, of met behulp van het Rapid Capture System apparaat voor het testen met een hoog sampledoorvoervolume.

TESTEN MET EEN HOOG SAMPLEDOORVOERVOLUME MET HET RAPID CAPTURE SYSTEM

Het Rapid Capture System is een geautomatiseerd systeem voor pipetteren en verdunnen voor algemeen gebruik, dat kan worden gebruikt met de *digene* HC2 HPV DNA Test voor het testen met een hoog sampledoorvoervolume. Met dit systeem kunnen binnen acht uur, inclusief 3,5 uur waarin geen interventie door de gebruiker noodzakelijk is, maximaal 352 samples worden verwerkt; binnen 13 uur kunnen maximaal 704 sampleresultaten worden gegenereerd. Denaturatie van de samples ter voorbereiding van het testen wordt onafhankelijk van het RCS verricht, voordat de samples op het RCS-platform worden geplaatst. Bovendien wordt het chemiluminescentiesignaal gedetecteerd en het resultaat gerapporteerd met behulp van een offline DML-instrument, dat zowel voor handmatige als voor RCS-methoden wordt gebruikt. De procedurestappen van de *digene* HC2 HPV DNA Test worden in exact dezelfde volgorde uitgevoerd als bij de handmatige testprocedure. De RCS-toepassing maakt getrapte verwerking mogelijk van maximaal 4 microtiterplaten, waarbij elke plaat samples en de vereiste assaykalibrators en kwaliteitscontroles bevat.

Raadpleeg bij het gebruik van het Rapid Capture System de met het apparaat meegeleverde *Gebruiksaanwijzing Rapid Capture System User*, als aanvulling op deze gebruiksaanwijzing, voor de noodzakelijke informatie over de procedures en voor de beschrijvingen.

HANDMATIGE METHODE

Setup

1. Als u de Microplate Heater I gebruikt, **laat deze dan ten minste 60 minuten vanuit een koude start op een temperatuur van $65 \pm 2^{\circ}\text{C}$ komen.** Raadpleeg de *Gebruikershandleiding Microplate Heater I* voor details.
2. Controleer of de temperatuur van het waterbad 65°C is en of er voldoende water in het waterbad zit om het hele volume in de samplebuizen te kunnen onderdompelen.
3. Neem de samples en **alle** vereiste reagentia uit de koelkast **voordat u met de assay begint.** Laat ze gedurende 15 tot 30 minuten op een temperatuur van $20\text{-}25^{\circ}\text{C}$ komen.

Opmerking: Bereid samples in PreservCyt-oplossing en SurePath voordat eerder gedenatureerde samples en reagens uit de kit op kamertemperatuur worden gebracht.

4. Maak met behulp van de *digene* assay-analysesoftware een assayplaatindeling. Raadpleeg de betreffende gebruikershandleiding voor instructies hoe u een plaatindeling moet maken.
5. Plaats de kalibrators, kwaliteitscontroles en de te testen samples in een proefbuizenrek, in dezelfde volgorde waarin ze worden getest. **De negatieve kalibrator, de Low-Risk HPV-kalibrator en de High-Risk HPV-kalibrator moeten EERST worden getest.** De negatieve kalibrator (NC), Low-Risk HPV-kalibrator (LRC) of High-Risk HPV-kalibrator (HRC), Low-Risk kwaliteitscontrole (QC1-LR), High-Risk kwaliteitscontrole (QC2-HR) en de samples moeten worden ingedeeld in een opstelling met 8-microtiterplaat-wellkolommen. Zie de *voorbeeldindeling* hieronder.

Voorbeeldindeling voor een run van 24 microtiterplaatwells:			
Rij	Kolom		
	1	2	3
A	NC	Sample 1	Sample 9
B	NC	Sample 2	Sample 10
C	NC	Sample 3	Sample 11
D	LRC of HRC	Sample 4	Sample 12
E	LRC of HRC	Sample 5	Sample 13
F	LRC of HRC	Sample 6	Sample 14
G	QC1-LR	Sample 7	Sample 15
H	QC2-HR	Sample 8	Sample 16

- Bij gebruik van de methode met de gecombineerde-probecocktail (CPC) worden NC, LRC en HRC drievoudig in dezelfde microtiterplaat met de gecombineerde-probecocktail getest. Gebruik respectievelijk well A1, B1 en C1 voor de NC en well D1, E1, F1, G1, H1 en A2 voor LRC en HRC. Gebruik respectievelijk well B2 en C2 voor de QC1-LR- en QC2-HR-kwaliteitscontroles, en de samples beginnen in D2. **De CPC-procedure is nog niet goedgekeurd voor gebruik met het Rapid Capture System.**
- Voor de dubbele-probemethode moeten de Low-Risk HPV-probemixtests aan de linkerkant van de microtiterplaat worden uitgevoerd en de High-Risk HPV-probemixtests aan de rechterkant van de microtiterplaat.

Test EERST de negatieve kalibrator (NC) en Low-Risk kalibrator (LRC) drie keer met de Low-Risk HPV-probemix. Test daarna de kwaliteitscontroles (QC1-LR en QC2-HR) en de samples afzonderlijk, eveneens met de Low-Risk HPV-probemix. Plaats de NC-replica's in A1, B1, C1; de LRC-replica's in D1, E1, F1; QC1-LR in G1; QC2-HR in H1; en de samples beginnen in A2.

Test DAARNA de NC en High-Risk kalibrator (HRC) drie keer met de High-Risk HPV-probemix. Test vervolgens de samples van QC1-LR en QC2-HR afzonderlijk, eveneens met de High-Risk HPV-probemix. Plaats de NC-replica's in A7, B7, C7; de HRC-replica's in D7, E7, F7; QC1-LR in G7; QC2-HR in H7; en de samples beginnen in A8. Zie de voorbeeldindeling hierboven.

Raadpleeg de betreffende gebruikershandleiding hoe u kalibrators/kwaliteitscontroles/samples in de software moet instellen.
- Als alternatief kunnen twee aparte microtiterplaten worden gebruikt voor de kalibrators, kwaliteitscontroles en de met de Low-Risk en High-Risk HPV-probe geteste samples. NC en LRC worden drievoudig getest en QC1-LR en QC2-HR worden afzonderlijk getest met Low-Risk HPV-probemix in één microtiterplaat, en NC en HRC worden drievoudig getest en QC1-LR en QC2-HR worden afzonderlijk getest met de High-Risk HPV-probemix in een tweede microtiterplaat. Gebruik respectievelijk wells A1, B1 en C1 voor de NC en wells D1, E1 en F1 voor LRC of HRC. Gebruik respectievelijk wells G1 en H1 voor de QC1-LR- en QC2-HR-kwaliteitscontroles.
- De samples mogen afzonderlijk worden getest met de gecombineerde-probecocktail bij gebruik van de CPC-methode, of afzonderlijk met de Low-Risk HPV-probemix en de High-Risk HPV-probemix bij gebruik van de dubbele-probemethode.

DENATURATIE

Opmerkingen:

- Waarschuwing:** Denaturatiereagens is corrosief. Wees voorzichtig en draag tijdens het werk poedervrije handschoenen.
- Belangrijk:** Sommige cervix-samples kunnen bloed of ander biologisch materiaal bevatten die de kleurveranderingen na toevoeging van denaturatiereagens kunnen maskeren. Het is mogelijk dat samples die vóór de toevoeging van het denaturatiereagens een donkere kleur tonen niet de juiste kleurveranderingen aangeven tijdens deze stappen. In zulke gevallen zal het niet tonen van

de juiste kleurverandering geen invloed hebben op de resultaten van de assay. De juiste menging kan worden vastgesteld door de kleurverandering van de kalibrators en kwaliteitscontroles waar te nemen.

- Tijdens de denaturatie- en hybridisatiestappen dient men ervoor te zorgen dat het waterniveau in het waterbad toereikend is om het gehele samplevolume in de buis onder te dompelen.
- Kalibrators, kwaliteitscontroles en samples kunnen gedurende de denaturatiestap worden bereid en één nacht bij 2-8°C, of maximaal 3 maanden bij -20°C worden bewaard. Er mogen maximaal 3 invries-/ontdooicycli worden uitgevoerd met tijdens elke ontdooicyclus een incubatiestap van maximaal 2 uur bij kamertemperatuur. Vóór gebruik goed mengen.
- Na denaturatie en incubatie worden de samples niet langer als infectueus beschouwd.²⁶ Laboratoriumpersoneel dient echter toch nog de nationale/plaatselijke voorzorgsmaatregelen in acht te nemen.
- Verwijder het sampleafnamehulpmiddel niet vóór denaturatie.
- Ter voorkoming van fout-positieve resultaten is het essentieel dat al het kalibrator-, kwaliteitscontrole- en STM-saplemateriaal in contact komt met denaturatiereagens. Mengen na toevoeging van het denaturatiereagens is een essentiële stap: **Zorg ervoor dat de Multi-Specimen Tube Vortexer 2 op 100 staat (maximale snelheid) en dat er tijdens het mengen een zichtbare werveling in de vloeistof te zien is, zodat de vloeistof het hele binnenoppervlak van de buis spoelt. Zorg ervoor dat alle kalibrators, kwaliteitscontroles en samples elk afzonderlijk worden gemengd als er handmatig wordt gevortext, door ze gedurende minstens 5 seconden op volle snelheid te vortexen, zodat de vloeistofwerveling het hele binnenoppervlak van de buis spoelt. Keer de buis daarna eenmaal om.**

Bereidingsprocedure van kalibrators, kwaliteitscontroles en STM-samples

1. Verwijder de doppen van de kalibrator-, kwaliteitscontrole- en STM-samplebuizen en gooi ze weg.

Opmerking: De doppen van de samplebuizen worden als potentieel besmettelijk beschouwd. Verwerk dit afval conform nationale/lokale reguleringen.

2. Pipetteer denaturatiereagens met indicatorkleurstof in alle kalibrators, kwaliteitscontroles of STM-samples met behulp van een repeterende of verstelbare pipet. Zorg ervoor dat u de zijkanten van de buizen niet aanraakt, omdat anders kruiscontaminatie van samples kan optreden. Het benodigde volume denaturatiereagens is gelijk aan de helft van het samplevolume. Het exacte volume voor elk type kalibrator, kwaliteitscontrole en sample staat vermeld in de onderstaande tabel.

Verdun het resterende denaturatiereagens in het flesje, voordat het volgens nationale/plaatselijke laboratoriumprocedures wordt afgevoerd.

Kalibrator, kwaliteitscontrole of sample	Vereiste volumes denaturatiereagens
Negatieve kalibrator	1000 µl
Low-Risk of High-Risk HPV-kalibrator	500 µl
Low-Risk of High-Risk kwaliteitscontroles	500 µl
Cervix-sample	500 µl

3. Meng de samples volgens een van de twee onderstaande methoden.

Methode Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2

Opmerking: Met het *digene* HC2 DNA sampleafnamehulpmiddel genomen samples die met de MST Vortexer 2 zijn gemengd **moeten** met behulp van de hybridisatie-microtiterplaat en de Microplate Heater I-methode gehybridiseerd worden.

- a) Dek de buizen met kalibrator, kwaliteitscontrole en STM-sample af met DuraSeal-afdekkfolie door de folie over de buizen in het rek te trekken.
- b) Plaats het deksel van het rek over de met folie afgedekte buizen en vergrendel het met de tweezijdige clips. Snijd de folie af met het snijapparaat.

- c) Plaats het rek op de Multi-Specimen Tube Vortexer 2 en zet het rek vast met de klem. Zorg ervoor dat de snelheid staat ingesteld op 100 (maximale snelheid) en zet de vortexer aan ("ON"). Vortex de buizen gedurende 10 seconden.

Methode voor handmatig vortexen van afzonderlijke buizen

- a) Sluit de buizen met kalibrator, kwaliteitscontrole en STM-sample opnieuw af met schone schroefdoppen voor sampleafnamebuizen.
 b) Meng elke buis grondig door de buizen één voor één gedurende 5 seconden bij hoge snelheid te vortexen.
 c) Draai elke buis één keer ondersteboven om de binnenkant van de buis, dop en rand te spoelen.
 d) Zet de buis terug in het rek.

Ongeacht de gebruikte vortex-methode, **moet er tijdens het mengen in elke buis een zichtbare werveling in de vloeistof te zien zijn, zodat de vloeistof het hele binnenoppervlak van de buis spoelt.** De kalibrators, kwaliteitscontroles en samples moeten paars kleuren.

4. Incubeer de buizen in het rek gedurende 45 ± 5 minuten in een waterbad van $65 \pm 2^\circ\text{C}$ (gedenatureerde kalibrators, kwaliteitscontroles en samples mogen onmiddellijk worden getest of kunnen worden opgeslagen volgens de beschrijving bij Opmerkingen hierboven). HPV-probemix(en) moet(en) tijdens deze incubatie worden bereid. Zie het hoofdstuk *Vorbereiden en bewaren van reagentia*.

Bereidingsprocedure voor samples in PreservCyt-oplossing

Opmerkingen:

- Raadpleeg voor details de gebruiksaanwijzing bij de *digene* HC2 Sample Conversion Kit.
- Verwerking van een aliquot PreservCyt-oplossing van 4 ml levert bij handmatig testen genoeg materiaal op voor 2 tests. Het minimale volume dat verwerkt kan worden is 4 ml.
- Bereid samples in PreservCyt-oplossing in series van maximaal 36 samples; anders kunnen de pellets losraken als het supernatant wordt afgegoten. Dit is van belang om de integriteit van de celpellets tijdens het afgieten te waarborgen. Wacht met de bereiding van extra flacons PreservCyt-oplossing totdat de bereiding van de eerste serie is voltooid.

Bereiding van reagens

Gebruik ofwel het denaturatiereagens (DNR) dat is meegeleverd met de *digene* HC2 HPV DNA Test (zie *Vorbereiden en bewaren van reagentia*) of het DNR dat is meegeleverd met de *digene* HC2 Sample Conversion Kit. Voeg voor het bereiden van het met de *digene* HC2 Sample Conversion Kit meegeleverde DNR 3 druppels indicatorvloeistof toe aan de fles met DNR en meng goed. De oplossing dient een egale donkerpaarse kleur te hebben. Raadpleeg tabel 1 om het benodigde volume te bepalen.

Tabel 1

Benodigde Volume: Bereiding van reagens

Aantal tests	Volume PreservCyt-oplossing	Volume conversiebuffer
1-2	4 ml	0,4 ml
3	6 ml	0,6 ml
4	8 ml	0,8 ml
5	10 ml	1,0 ml
6	12 ml	1,2 ml

1. Noteer het betreffende sample-identificatienummer op een *digene* HC2 sampleconversiebuis, een conische Sarstedt-buis van 10 ml, of een conische buis van 15 ml van het merk VWR of Corning.
2. De verwerking van één sample tegelijkertijd:
 - a. Schud de flacon met PreservCyt grondig met de hand, totdat de cellen homogeen verdeeld zijn.
 - b. Pipetteer onmiddellijk, aangezien de cellen zeer snel bezinken, het passende volume van de PreservCyt-sample in de gelabelde buis. Laat de oplossing met PreservCyt naar de bodem van de conische buis zinken om te voorkomen dat celmateriaal aan de binnenkant van de buis blijft kleven.
3. Voeg de juiste hoeveelheid sampleconversiebuffer toe aan elke buis (zie tabel 1).
4. Doe de dop er weer op en meng de inhoud van elke buis grondig met een vortexmixer met cupbevestiging.

Opmerking: De MST Vortexer 2-procedure is niet goedgekeurd voor het vortexen van samples in PreservCyt-oplossing met sampleconversiebuffer voorafgaand aan het centrifugeren, en dient daarom niet toegepast te worden.
5. Centrifugeer de buizen in een centrifuge met uitzwaairotor gedurende 15 ± 2 minuten bij $2.900 \pm 150 \times g$.
6. Bereid tijdens het centrifugeren het mengsel van sampletransportmedium en denaturatiereagens (STM/DNR) in de verhouding 2:1 volgens tabel 2.

Opmerking: het STM/DNR-mengsel dient altijd op de dag waarop de test wordt uitgevoerd, vers te worden bereid.

- a. Gebruik voor bepaling van de totale benodigde hoeveelheid STM/DNR-mengsel het startvolume van de sample in de PreservCyt-oplossing als richtlijn en vermenigvuldig dan het volume STM en DNR "per buisje" met het aantal te verwerken samples (zie tabel 2).

Tabel 2
Benodigd volume: STM/DNR

Aantal tests	Volume PreservCyt-oplossing	STM-volume per buis voor uiteindelijk STM/DNR-mengsel*	DNR-volume per buis voor uiteindelijk STM/DNR-mengsel*	STM/DNR-mengsel toegevoegd aan buis
1-2	4 ml	120 µl	60 µl	150 µl
3	6 ml	170 µl	85 µl	225 µl
4	8 ml	220 µl	110 µl	300 µl
5	10 ml	270 µl	135 µl	375 µl
6	12 ml	320 µl	160 µl	450 µl

* De volumes in deze tabel mogen niet direct aan het samplebuisje worden toegevoegd.

- b. Meng de oplossing goed door te vortexen.
7. Verwijder de buisjes één voor één uit de centrifuge en zet ze in een rek of conversierek. Op de bodem van elke buis moet een roze/oranje pellet te zien zijn.

Opmerking: Samples die na het centrifugeren geen zichtbare pellet bevatten zijn niet geschikt voor de test en moeten worden weggegooid.
 8. Elk buisje afzonderlijk verwerken:
 - a. Verwijder de dop en leg deze apart op een schone pluisvrije papieren doek.
 - b. Giet het supernatant zorgvuldig af.

- c. Houd het buisje omgekeerd en laat het voorzichtig afvloeien (ongeveer 6 keer) op absorberende pluisvrije papieren doekjes, totdat er geen vloeistof meer uit het buisje drupt. Gebruik telkens een schoon stuk van de papieren doek. Zorg ervoor dat de celpellet tijdens het afvloeien **niet** langs de buis naar beneden glijdt.

Opmerkingen:

- Dep niet meer dan één keer op dezelfde plaats op de absorberende pluisvrije papieren doek.
 - Het is belangrijk zoveel mogelijk PreservCyt-oplossing te verwijderen door deze te laten afvloeien. Het is echter normaal dat u na het afvloeien een restje PreservCyt-oplossing ziet.
- d. Zet het buisje in een rek of in het conversierek.

VORTEXEN EN DENATURATIE

Handmatige vortexprocedure

1. Voeg de passende hoeveelheid STM/DNR toe aan elke pellet (zie tabel 2). Doe weer een dop op elk buisje en resuspendeer de pellets door elk buisje afzonderlijk ten minste 30 seconden op de hoogste stand te vortexen. Als een pellet moeilijk te resuspenderen is, vortex dan 10-30 seconden langer of totdat de pellet loskomt van de bodem van het buisje. Als een pellet na het extra vortexen (in totaal maximaal 2 minuten) nog steeds niet is opgelost, noteer dan het identificatienummer van de sample en ga verder met de volgende stap.
2. Zet de buisjes in een rek.
3. Plaats het rek gedurende 15 ± 2 minuten in het waterbad van $65 \pm 2^\circ\text{C}$. Zorg ervoor dat het waterniveau in het bad hoog genoeg is om het hele vloeistofvolume in de buizen onder te dompelen.
4. Neem het rek met samples uit het waterbad en vortex de samples afzonderlijk gedurende 15-30 seconden.
Opmerking: Zorg ervoor dat alle pellets op dit punt volledig geresuspendeerd zijn. Samples die nog zichtbare pellets bevatten zijn niet geschikt voor de test en moeten worden weggegooid.
5. Zet het rek terug in het waterbad van $65 \pm 2^\circ\text{C}$ en ga nog eens 30 ± 3 minuten door met denaturatie.
6. Ga verder met de stap *Hybridisatie* of raadpleeg *Optioneel stoppunt* voor opslag en behandeling van gedenatureerde samples.

Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 -procedure

Opmerkingen:

- De Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2-methode is goedgekeurd voor het verwerken van samples in PreservCyt-oplossing na het centrifugeren en afgieten van het supernatant.
 - Alleen de MST Vortexer 2 is ontworpen voor de verwerking van samples in PreservCyt-oplossing.
 - Het conversierek met deksel is speciaal ontworpen voor de *digene* HC2 sampleconversiebuisen (conische buizen van 15 ml van het merk VWR of Corning). De gebruiker dient per keer slechts één type buis in het conversierek te gebruiken. Andere merken zijn niet goedgekeurd voor gebruik.
 - Het is noodzakelijk dat de gespecificeerde vortextijden van het conversierek met deksel strikt in acht worden genomen.
 - Het conversierek met deksel kan niet worden gebruikt bij het vortexen van de kalibrators of kwaliteitscontroles van de *digene* HC2 DNA Test-kit. Door de hoogte van de STM-buisjes kan niet goed gevortext worden als het conversierek met deksel wordt gebruikt.
1. Plaats elke gelabelde conische buis van 15 ml, nadat deze is afgevoeid, op de juiste plaats in het conversierek.
 2. Voeg de passende hoeveelheid STM/DNR-mengsel toe aan elke pellet (zie tabel 2).
 3. Bedek de conische buisjes van 15 ml met DuraSeal Tube Sealer afdekfolie door de folie over de buisjes in het rek te trekken.

4. Plaats het deksel van het rek over de met afdekfolie bedekte buisjes en klik het deksel dicht met de twee klembeugels. Snijd de afdekfolie af met het snijapparaat, nadat het deksel stevig vastgezet is.
5. Beweeg de rode hendel van de klembeugel omhoog, zodat deze horizontaal komt te staan.
6. Plaats het conversierek en het deksel zodanig op de MST Vortexer 2 dat de hoek met de grootste uitsparing van het conversierek zich in de hoek rechtsvoor bevindt. Plaats het rek met deksel zodanig op het platform van de MST Vortexer 2 dat het goed tussen de geleiders past. Zet het rek stevig op zijn plaats vast door de rode hendel van de klembeugel naar beneden in verticale stand te duwen. Hierdoor wordt het rek vastgezet.
7. Zorg ervoor dat de snelheid is ingesteld op 100 (maximale snelheid) en dat de pulsschakelaar in de stand "OFF" staat.
8. Zet de schakelaar van de vortexer op ON. **Vortex de buizen gedurende 30 seconden.**
9. Zet de schakelaar van de vortexer op OFF.
10. Verwijder het conversierek met deksel van de MST Vortexer 2 door de rode hendel van de klembeugel omhoog te duwen.
11. Plaats het rek gedurende 15 ± 2 minuten in het waterbad van $65 \pm 2^\circ\text{C}$. Zorg ervoor dat het waterniveau in het bad hoog genoeg is om alle vloeistof in alle buizen onder te dompelen.
12. Neem het rek met samples na een incubatietijd van 15 minuten uit het waterbad.
13. Verwijder het overtollige water van het rek om spatten te voorkomen voordat u het rek op de MST Vortexer 2 zet.
14. Zet het conversierek met deksel vast op de MST Vortexer 2 zoals beschreven in *stap 6*.
15. Zorg ervoor dat de snelheid staat ingesteld op 100 en zet de schakelaar van de vortexer op ON. **Vortex de buisjes gedurende 1 minuut.**
16. Zet de schakelaar van de vortexer op OFF.
Opmerking: Met de MST Vortexer 2-procedure worden de mengsnelheid, de tijden en het proces gestandaardiseerd, waardoor het niet meer nodig is om celpelletts met het blote oog op te sporen, zoals noodzakelijk is bij de handmatige vortexprocedure.
17. Zet het rek terug in het waterbad van $65 \pm 2^\circ\text{C}$ en ga nog eens 30 ± 3 minuten door met denaturatie.
18. Neem het rek uit het waterbad, droog het rek en zet het vast op de vortexer.
19. Zet de schakelaar van de vortexer op ON. **Vortex gedurende 10 seconden bij de maximale instelling.**
20. Zet de schakelaar van de vortexer op OFF. Verwijder het rek.
21. Verwijder onmiddellijk het deksel en de DuraSeal Tube Sealer afdekfolie van de samples.
22. Ga verder met de stap *Hybridisatie* of raadpleeg *Optioneel stoppunt* voor opslag en behandeling van gedenatureerde samples.

SurePath samplebereidingsprocedure (ALLEEN voor High-Risk HPV-DNA-tests)

Ga na de cytologische verwerking als volgt te werk:

1. Controleer of het waargenomen vloeistofvolume gelijk is aan 2,8 ml.
LET OP: Als blijkt dat de resterende cellpellet minder dan 1 ml vloeistof bevat, dan is het mogelijk dat na cytologie geen SurePath-conserveervloeistof is toegevoegd en dat de sample NIET geschikt is voor High-Risk HPV DNA-tests.
2. Zorg ervoor dat de samples op kamertemperatuur zijn gekomen.
3. Centrifugeer de sample in een centrifuge met uitzwaairotor gedurende 10 ± 1 minuten op $800 \pm 15 \times g$.
4. Neem de buisjes uit de centrifuge.

5. Giet het supernatant direct na het centrifugeren voorzichtig af en dep elke buis (~3 keer) op absorberende papieren doekjes om overtollige vloeistof te verwijderen. Observeer de pellets in de buisjes. **Zorg ervoor dat de celpellets tijdens het deppen niet langs de buis naar beneden glijden.**
6. Plaats de buisjes in het rek.
7. Voeg aan elke pellet 200 µl STM toe met een repeteerpijet of instelbare pijet.
Opmerking: Buisjes kunnen zonder dop worden gemengd.
8. Resuspendeer elke pellet door elk buisje afzonderlijk gedurende 15 seconden op hoge snelheid te vortexen. Als de pellet moeilijk te resuspendieren is, vortex dan nogmaals 5 tot 30 seconden, of totdat de pellet loskomt van de bodem van de buis en lijkt op te lossen.
9. Pipetteer met een repeteerpijet of een verstelbare pijet 100 µl geprepareerd denaturatiereagens (met indicatorkleurstof) in elke sample.
LET OP: Zorg ervoor dat u de zijkanten van de buizen niet aanraakt, omdat anders kruiscontaminatie van samples kan optreden.
Neem bij afvoer van overblijvend denaturatiereagens de toepasselijke plaatselijke en nationale voorschriften voor het afvoeren van bijtende stoffen in acht.
10. Meng elke buis afzonderlijk grondig door hem 5 seconden op hoge snelheid te vortexen.
Opmerking: Buisjes kunnen zonder dop worden gemengd.
Label de conische buizen van 15 ml met de juiste naam en type van de sample (bijvoorbeeld "SP" voor een sample van het type SurePath) en plaats ze in een rek.
Opmerking: Als het Rapid Capture System voor de semi-automatische verwerking van assays wordt gebruikt, moeten conische buizen van 15 ml van het merk VWR of Corning worden gebruikt voor een juiste plaatsing in het *digene* Conversion Rack (zilveren rek).
11. Breng het hele buisvolume met een wegwerp-transferpijet van 7 ml met standaard punt of een gelijkwaardige pijet over in een conische buis van 15 ml met schroefdop¹.
12. Sluit de conische buizen van 15 ml af met doppen.
13. Incubeer gedurende 90 ± 5 minuten in een waterbad van 65 ± 2°C.
LET OP: Deze incubatietijd is langer dan de tijd die nodig is voor andere goedgekeurde sampletypen.
14. Als de HPV-tests op dezelfde dag worden uitgevoerd, denatureer dan de kalibrators van de *digene* HC2 DNA Test volgens deze gebruiksaanwijzing.
15. Neem het samplerek uit het waterbad.

Optioneel stoppunt

Na denaturatie kunnen STM-samples en geconverteerde PreservCyt- en SurePath-samples bij 2–8°C een nacht lang of bij -20°C gedurende maximaal 3 maanden worden bewaard. Voor koeling gedurende de nacht kunnen de samples met de DuraSeal-afdekfolie en het rekdeksel teruggeplaatst in het conversierek blijven staan. Voordat de samples bij -20°C worden opgeslagen, moeten het rekdeksel en de DuraSeal-afdekfolie worden verwijderd en moeten de buisjes worden voorzien van doppen. In beide gevallen moeten de samples op kamertemperatuur (20 - ;25°C) gebracht en grondig gevortext worden voordat u verder gaat met de hybridisatiestap.

Opmerking: Gedenatureerde samples mogen niet op droogijs worden bewaard of verzonden.

¹ Bij verificatietests zijn door QIAGEN conische buizen van 15 ml van het merk VWR gebruikt.

Er mogen maximaal 3 invries-/ontdooicycli worden uitgevoerd met tijdens elke ontdooicyclus een incubatiestap van maximaal 2 uur bij kamertemperatuur.

HYBRIDISATIE: GECOMBINEERDE-PROBECOCKTAIL- (CPC) EN DUBBELE-PROBEMETHODE

Opmerkingen:

- HPV-probemengsels zijn viskeus. Zorg ervoor dat de probemix goed wordt gemengd en dat de benodigde hoeveelheid volledig in elke microtiterplaatwell wordt gepipetteerd. Zie hoofdstuk *Vorbereiden en bewaren van reagentia*.
- Indien de gedenatureerde sample bij -20°C is bewaard, laat de sample dan tot 20-25°C ontdooien en vortex de sample grondig voordat u verder gaat met de hybridisatie.
- Vóór het gebruik moet de Microplate Heater I gedurende ten minste 60 minuten tot 65 ± 2°C worden voorverwarmd. Raadpleeg de *Gebruikershandleiding Microplate Heater I* indien nodig voor verdere instructies.

Hybridisatiemethode met gebruik van de hybridisatieplaat en Microplate Heater I

Opmerking: Met het *digene* HC2 DNA sampleafnamehulpmiddel genomen samples in STM die verwerkt zijn met de MST Vortexer 2-methode kunnen **alleen** met behulp van de Microplate Heater I-methode worden gehybridiseerd.

1. Neem een hybridisatie-microtiterplaat en noteer er een identificatie op.
2. Verwijder de kalibrators, kwaliteitscontroles en samples na de incubatie uit het waterbad. Als de Multi-Specimen Tube Vortexer 2 wordt gebruikt, vortex dan het hele rek met STM-samples minimaal 5 seconden op de maximale snelheid. Vortex het gehele conversierek gedurende minimaal 10 seconden op maximale snelheid bij samples in PreservCyt-oplossing of SurePath. In andere gevallen moet elke buis minstens 5 seconden afzonderlijk worden gevortext.
3. Pipetteer 75 µl van elke kalibrator, kwaliteitscontrole of sample in de **bodem** van een lege well van de hybridisatie-microtiterplaat, waarbij u de plaatindeling aanhoudt die u onder *Setup* heeft gemaakt. Raak de zijkanten van de wells niet aan en beperk de vorming van luchtballen. Gebruik voor elke transfer een schone extra lange pipetpunt om kruiscontaminatie van kalibrators, kwaliteitscontroles of samples te voorkomen. Verwijder het sampleafnamehulpmiddel niet uit de sampletransportbuis. Gedenatureerde samples mogen met schroefdoppen voor sampleafnamebuizen worden afgesloten en met sampleafnamehulpmiddelen in de buizen worden bewaard. Gedenatureerde PreservCyt-samples mogen weer worden voorzien van de originele doppen.

Opmerking: Er kunnen fout-positieve resultaten optreden als sample-aliquots niet zorgvuldig worden overgebracht. Tijdens het overbrengen van de sample mag de pipetpunt de binnenkant van de buis niet aanraken bij het verwijderen van het 75 µl-aliquot.

4. Bedek de plaat met een deksel na het overbrengen van de laatste sample en **incubeer de hybridisatie-microtiterplaat gedurende 10 minuten bij 20-25°C**.
5. Breng de bereide en grondig gevortexte probemix over naar een wegwerpreagensreservoir. Pipetteer met behulp van een 8-kanaalspipet en verse punten voor elke rij zorgvuldig 25 µl probemix in alle wells die kalibrators, kwaliteitscontroles en samples bevatten. Doseer het volume probe in elke hybridisatie-well, waarbij opspatten dient te worden vermeden. Raak de zijkanten van de wells niet aan. Dek de microtiterplaat tijdens de denaturatie-incubatie met het deksel af.
6. Bedek de hybridisatie-microtiterplaat met een plaatdeksel en schud gedurende 3 ± 2 minuten op de Hybrid Capture System Rotary Shaker I op 1100 ± 100 rpm. *De kalibrators, kwaliteitscontroles en samples moeten na het schudden geel kleuren*. Wells die paars blijven, hebben wellicht niet de juiste hoeveelheid probemix gehad. Voeg nogmaals 25 µl probemix toe aan de samples die

paars zijn gebleven en schud opnieuw. Indien na deze procedure nog steeds wells paars zijn gebleven, moeten de betreffende samples opnieuw worden getest.

Opmerkingen:

- Na het schudden moeten de samples in PreservCyt-oplossing roze kleuren in plaats van geel.
- Wanneer u de hybridisatie-microtiterplaat in de Microplate Heater I plaatst, zorg er dan voor dat u daarbij geen spatten veroorzaakt.

7. Incubeer gedurende 60 ± 5 minuten in een voorverwarmde en op een temperatuur van $65 \pm 2^\circ\text{C}$ gebrachte Microplate Heater I.

Hybridisatiemethode met behulp van microbuizen en waterbad

Opmerkingen:

- De verwerking van samples in STM die genomen zijn met het *digene* HC2 DNA sampleafnamehulpmiddel met de MST Vortexer 2-methode voor mengen en de waterbadmethode voor hybridisatie **is niet gevalideerd**. Samples in STM die genomen zijn met het *digene* HC2 DNA sampleafnamehulpmiddel en verwerkt met behulp van de MST Vortexer 2-methode kunnen **alleen** met behulp van de Microplate Heater I-methode gehybridiseerd worden.
- Indien de gedenatureerde sample bij -20°C is bewaard, laat de sample dan tot $20-25^\circ\text{C}$ ontdooien en vortex grondig voordat u verder gaat met de hybridisatie.

1. Label het vereiste aantal schone hybridisatie-microbuizen en plaats ze in het microbuizenrek.
2. Verwijder de kalibrators, kwaliteitscontroles en samples na de incubatie uit het waterbad. Vortex elke buis net voordat de aliquots worden verwijderd minstens 5 seconden afzonderlijk.
3. Pipetteer 75 μl van elke kalibrator, kwaliteitscontrole of sample in de **bodem** van een lege hybridisatie-microbuis, waarbij u de plaatindeling aanhoudt die u onder Setup heeft gemaakt. Raak de zijkanten van de microbuizen niet aan en beperk de vorming van luchtbellen. Gebruik voor elke transfer een schone, extra lange pipetpunt om kruiscontaminatie van kalibrators, kwaliteitscontroles of samples te voorkomen. Het sampleafnamehulpmiddel hoeft niet uit de sampletransportbuis te worden verwijderd. Gedenatureerde samples mogen met schroefdoppen voor sampleafnamebuizen worden afgesloten en met sampleafnamehulpmiddelen in de buizen worden bewaard.

Opmerking: Er kunnen fout-positieve resultaten optreden als sample-aliquots niet zorgvuldig worden overgebracht. Tijdens het overbrengen van sample mag de pipetpunt de binnenkant van de buis niet aanraken bij het verwijderen van het 75 μl -aliquot.

4. Nadat de laatste sample is overgebracht, **incubeert u de hybridisatie-microbuisjes gedurende 10 minuten bij $20-25^\circ\text{C}$.**
5. Breng de bereide en grondig gevortexte probemix over naar een wegwerpreagensreservoir. Pipetteer met behulp van een 8-kanaalspipet en verse punten voor elke rij zorgvuldig 25 μl probemix in alle microbuisjes die kalibrators, kwaliteitscontroles en samples bevatten. Doseer het volume probe in elke hybridisatiemicrobuis, waarbij opspatten dient te worden vermeden. Raak de zijkanten van de buizen niet aan. Bekijk het rek aan de onderkant om u ervan te verzekeren dat in alle buisjes de juiste hoeveelheid probemix is toegevoegd.
6. Dek de microbuisjes af met plaatafdekfolie. Plaats het rekdeksel op het rek. Schud het microbuizenrek gedurende 3 ± 2 minuten in de Rotary Shaker I op 1100 ± 100 rpm. *De kalibrators, kwaliteitscontroles en samples moeten na het schudden geel kleuren.* Buizen die paars blijven, hebben wellicht niet de juiste hoeveelheid probemix gehad. Voeg nogmaals 25 μl probemix toe aan de samples die paars zijn gebleven en schud opnieuw. Indien er na deze procedure nog buizen paars gebleven zijn, moeten de samples opnieuw worden getest.

Opmerking: Na het schudden moeten samples in PreservCyt-oplossing roze kleuren in plaats van geel.

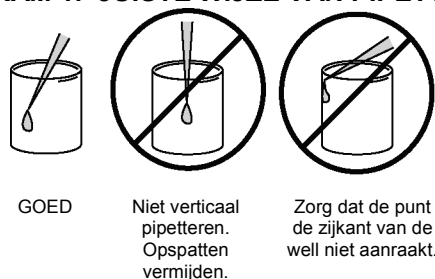
7. Incubeer gedurende 60 ± 5 minuten in een waterbad van $65 \pm 2^\circ\text{C}$. Zorg ervoor dat het waterniveau in het bad hoog genoeg is om het hele volume hybridisatiemengsel onder te dompelen. Het microbuizenrek zal in het waterbad drijven.

Opmerking: Maak een plaatindeling met behulp van de *digene* assay-analysesoftware als u dit niet al eerder heeft gedaan.

HYBRIDEN-CAPTURING

1. Verwijder alle behalve het benodigde aantal capture-microtiterplaatwells van het plaatframe. Stop de ongebruikte microtiterplaatwells in de originele zak en hersluit deze. Nummer elke kolom met een markeerstift 1, 2, 3. . . . Noteer een geschikte identificatie op de microtiterplaat. De samples worden aan de wells toegevoegd volgens de voorbeeldindeling onder Setup.
2. Verwijder de hybridisatie-microtiterplaat met de kalibrators, controles en samples zorgvuldig uit de Microplate Heater I. Verwijder onmiddellijk het plaatdeksel en leg het op een schoon oppervlak. Als alternatief kunt u het microbuizenrek uit het waterbad verwijderen. Verwijder onmiddellijk het rekdeksel en trek de plaatafdekfolie langzaam omhoog en over het rek heen.
3. Breng de gehele inhoud (circa 100 μl) van de kalibrators, kwaliteitscontroles en samples van de hybridisatie-microtiterplaatwells of microbuizen met behulp van een 8-kanaalspipet over naar de bodem van de overeenkomstige capture-microtiterplaatwell. Gebruik voor elke overgebrachte kolom nieuwe pipetpunten op de 8-kanaals pipet en laat elke pipetpunt goed uitdruipen om ervoor te zorgen dat de sample volledig wordt overgebracht. Desgewenst kan de pipet worden gestabiliseerd door het **midden** van de pipetpunten op de bovenste rand van de capture-microtiterplaatwells te laten rusten (zie *diagram 1*).

DIAGRAM 1: JUISTE WIJZE VAN PIPETEREN



4. Dek de capture-microtiterplaat af met het plaatdeksel of plaatafdekfolie en schud gedurende 60 ± 5 minuten op de Rotary Shaker I op 1100 ± 100 rpm bij $20\text{-}25^\circ\text{C}$.
5. Bereid wasbuffer en controleer het spoel- en afvalreservoir van de Automated Plate Washer tijdens deze incubatie. Zie het hoofdstuk Voorbereiden en bewaren van reagentia.
6. Neem de capture-microtiterplaat na afloop van de capturing-stap van de Rotary Shaker I en verwijder voorzichtig het plaatdeksel of de plaatafdekfolie. Verwijder de vloeistof uit de wells door deze in een gootsteen leeg te gieten; draai de plaat boven de gootsteen helemaal om en schud flink met een neerwaartse beweging. Doe dit voorzichtig zodat de vloeistof niet opspat wanneer deze te dicht bij de bodem van de gootsteen wordt afgegoten. **Draai de plaat niet terug;** verwijder de laatste vloeistof door stevig 2-3 keer met de plaat op een schoon Kimtowels-doekje of een gelijkwaardig pluisvrij papieren doekje te kloppen. Zorg ervoor dat alle vloeistof uit de wells is verwijderd en dat de bovenkant van de plaat droog is.

HYBRIDEN-DETECTIE

Opmerkingen:

- Voeg de reagentia met een 8-kanaalspipet toe aan de plaat en werk daarbij van links naar rechts.
 - Geadviseerd wordt om de omgekeerde pipetteertechniek toe te passen voor een consistentere afgifte van reagens. Met deze techniek worden de pipetpunten aanvankelijk overvuld door de tweede stop op de aspiratie-/doseerinrichting (zuiger) van de pipet te gebruiken. Zie de onderstaande procedure. Veeg de punten af in het wegwerpreagensreservoir om overtollig reagens te verwijderen voordat het in de plaat wordt gepipetteerd.
 - Desgewenst kan de pipet stabiel worden gehouden door het midden van de pipetpunten op de bovenste rand van de microtiterplaatwells te laten rusten. Zorg dat de zijkanten van de microtiterplaatwells niet worden aangeraakt, omdat er anders kruiscontaminatie van de samples kan optreden. Raadpleeg het eerder afgebeelde diagram 1.
1. Breng het passende volume detectiereagens 1 over naar een wegwerpreagensreservoir (zie het hoofdstuk *Voorbereiden en bewaren van reagentia* voor instructies). Pipetteer met behulp van een 8-kanaalspipet en de omgekeerde pipetteertechniek zorgvuldig 75 µl detectiereagens 1 in alle wells van de capture-microtiterplaat.

Omgekeerde pipetteertechniek:

- a) Bevestig punten op een 8-kanaalspipet; zorg ervoor dat alle punten goed vast zitten.
 - b) Duw de zuiger van de pipet voorbij de eerste stop door tot de tweede stop.
 - c) Dompel de punten in de detectiereagens 1-oplossing.
 - d) Laat de zuiger langzaam omhoogkomen, waarbij de oplossing in de punten stroomt.
 - e) Pipetteer de oplossing in de microtiterplaatwells (75 µl) door de zuiger tot de eerste stop in te drukken. Laat de zuiger pas los wanneer de pipetpunten weer in de detectiereagens 1-oplossing zijn ondergedompeld.
 - f) Vul de punten opnieuw en ga zo door met pipetteren totdat alle wells gevuld zijn. Vul de wells van de microtiterplaat van links naar rechts. Zorg ervoor dat alle wells gevuld zijn door de intensiteit van de roze kleur te bekijken. Alle wells moeten een soortgelijke intensiteit hebben.
2. Dek de platen af met een plaatdeksel of schone Parafilm (of iets vergelijkbaars) en incubeer 30-45 minuten bij 20-25°C.

WASSEN

Was de capture-plaat met behulp van een van de twee onderstaande methoden.

Methode met de Automated Plate Washer

Opmerking: Laat de Automated Plate Washer altijd **AAN** staan. Zorg ervoor dat het spoelreservoir gevuld is en het afvalreservoir leeg. De Automated Plate Washer zal het systeem regelmatig spoelen om het te reinigen. Raadpleeg de Gebruikershandleiding Automated Plate Washer indien nodig voor verdere instructies.

VOOR ELK GEBRUIK:

- Zorg ervoor dat het wasreservoir ten minste tot de 1 liter-markering gevuld is met wasbuffer-oplossing. Als dat niet het geval is, bereid dan de wasbuffer-oplossing. Zie het hoofdstuk *Voorbereiden en bewaren van reagentia*.
 - Zorg ervoor dat het spoelreservoir gevuld is met gedeïoniseerd of gedestilleerd water.
 - Zorg ervoor dat het afvalreservoir leeg is en dat de dop van het reservoir goed dicht zit.
 - De Automated Plate Washer wordt vóór elke wasstap automatisch geprimed en na elke wasstap automatisch gespoeld.
1. Verwijder het plaatdeksel en plaats de plaat op het platform van de Automated Plate Washer.

2. Controleer of het apparaat is ingeschakeld en er “Digene Wash Ready” (Digene klaar met wassen) of “P1” op het display staat.
Opmerking: Als er maar een deel van de strip capture-wells wordt gebruikt, moeten er lege microtiterplaatwells in de capture-plaat worden geplaatst om de kolom aan te vullen voordat het wassen begint.
3. Kies het aantal te wassen strips door op de toets “Rows” (Rijen) te drukken en daarna op “+” of “-” om in te stellen. Druk nogmaals op de toets “Rows” om terug te keren naar “Digene Wash Ready” of “P1”.
4. Druk op “Start/Stop” om te beginnen.
5. De wasser verricht zes vul- en aspiratiecycli, wat circa 10 minuten duurt. Tijdens het programma is er een korte pauze, dus zorg dat u de plaat niet te vroeg verwijdert. Wanneer de Automated Plate Washer klaar is met wassen, geeft hij “Digene Wash Ready” of “P1” aan.
6. Verwijder de microtiterplaat uit de wasser wanneer het programma is afgelopen. De plaat dient er wit uit te zien en er mag geen roze vloeistof in de wells van de microtiterplaat achterblijven.

Methode handmatig wassen

1. Verwijder detectiereagens 1 uit de wells door schone Kimtowels-doekjes of gelijkwaardige pluivrije papieren doekjes boven op de plaat te leggen en deze voorzichtig om te keren. Zorg ervoor dat het papier contact maakt met het hele oppervlak van de plaat voordat u de plaat omkeert. Laat de plaat gedurende 1-2 minuten afdruipe. Droog goed na met schone Kimtowels-doekjes of gelijkwaardige pluivrije papieren doekjes. Werp de gebruikte papieren doekjes voorzichtig weg om contaminatie met alkalische fosfatase tijdens de latere stappen te voorkomen.
2. Was de plaat 6 keer met de hand met behulp van het wasapparaat. Elke well wordt overstroomd om detectiereagens 1 uit de bovenkant van de wells te verwijderen. Het wassen begint bij well A1 en gaat daarna kronkelend naar rechts en naar beneden. Nadat alle wells gevuld zijn, moet de vloeistof met een sterke neerwaartse beweging in de gootsteen worden afgegoten. De tweede was begint bij well H12 en volgt een kronkelbeweging naar links en naar boven. Deze volgorde van 2 wasbeurten wordt nog 2 keer herhaald tot in totaal 6 wasbeurten per well.
3. Na het wassen moet de plaat worden nagedroogd door hem om te keren op schone Kimtowels-doekjes of gelijkwaardige pluivrije papieren doekjes en stevig 3-4 keer te kloppen. Vervang de papieren doekjes en herhaal het deppen. Laat de plaat omgekeerd liggen en gedurende 5 minuten afdruipe. Droog de plaat nog een keer na.
4. De plaat dient er wit uit te zien en er mag geen roze restantvloeistof in de microtiterplaatwells achterblijven.

SIGNAALAMPLIFICATIE

OPMERKINGEN:

- Gebruik een nieuw paar handschoenen voor het hanteren van detectiereagens 2.
 - Breng **alleen** de hoeveelheid reagens die nodig is voor het uitvoeren van de assay over in het wegwerpreagensreservoir om contaminatie van detectiereagens 2 te voorkomen. Zie het hoofdstuk Voorbereiden van reagentia. **Detectiereagens 2 niet terug doen in de originele fles. Gebruikt materiaal moet na afloop worden weggegooid.**
 - Detectiereagens 2 moet zonder onderbrekingen worden toegevoegd. De incubatietijd van alle wells moet zo gelijk mogelijk zijn.
 - Zorg ervoor dat u de wanden van de microtiterplaatwells niet aanraakt en dat u geen reagens op de pipetpunten laat spatten, omdat daardoor kruiscontaminatie van samples kan optreden (zie *Diagram 1*).
1. Pipetteer met behulp van een 8-kanaalspipet zoals eerder beschreven zorgvuldig 75 µl detectiereagens 2 in alle wells van de capture-microtiterplaat. *Alle microtiterplaatwells moeten*

een gele kleur krijgen. Controleer of alle wells gevuld zijn door de intensiteit van de kleur te bekijken. Alle wells moeten een soortgelijke intensiteit hebben.

2. Dek de microtiterplaten af met een plaatdeksel of schone Parafilm (of iets vergelijkbaars) en incubeer 15 minuten bij 20-25°C. Vermijd direct zonlicht.
3. Meet de microtiterplaat na 15 minuten incubatie (en niet later dan na 30 minuten incubatie) op het DML-instrument.
4. Met het assay-specifieke softwareprotocol kunt u relevante assay-informatie direct in de software invoeren.
5. Als een volle microtiterplaat niet gebruikt is, verwijder dan de gebruikte microtiterplaatwells uit de microtiterplaathouder en spoel de houder grondig met gedestilleerd of gedeïoniseerd water, droog hem en leg hem klaar voor de volgende assay.

VERIFICATIECRITERIA VOOR DE ASSAYKALIBRATIE

Verificatie van de assaykalibratie wordt uitgevoerd om ervoor te zorgen dat de reagentia en de geleverde kalibrator- en kwaliteitscontrolematerialen goed werken, zodat de cut-off-waarde van de assay nauwkeurig kan worden bepaald. Voor de *digene* HC2 HPV DNA Test moet elke assay worden gekalibreerd, daarom moet elke assay worden geverifieerd met behulp van de volgende criteria. Deze verificatieprocedure is niet bedoeld ter vervanging van interne kwaliteitscontroles. De assay-protocollen van de *digene* assay-analysesoftware verifiëren de onderstaande criteria automatisch.

1. Negatieve kalibrator

De negatieve kalibrator moet bij elke assay in drievoud worden getest. Het gemiddelde van de negatieve kalibrator moet ≥ 10 en ≤ 250 RLE's zijn om verder te kunnen gaan. De resultaten voor de negatieve kalibrator moeten een variatiecoëfficiënt (%VC) van $\leq 25\%$ laten zien. Als de %VC >25 is, moet de waarde met een RLE-waarde die het verste van het gemiddelde ligt als uitschieter worden genegeerd en moet het gemiddelde opnieuw worden berekend aan de hand van de twee overige waarden. Ga verder met stap 2 als het verschil tussen het gemiddelde en elk van de twee waarden $\leq 25\%$ is. Anders is de verificatie van de assaykalibratie ongeldig en moet de assay voor alle patiëntensamples worden herhaald. In dergelijke gevallen mogen de resultaten van patiëntensamples niet worden gerapporteerd.

2. Kalibrators

De kalibrator(s) moet(en) bij elke assay in drievoud worden getest. Voor CPC moeten beide kalibrators in drievoud worden getest. De resultaten voor de kalibrator moeten een variatiecoëfficiënt (%VC) van $\leq 15\%$ laten zien. Voor CPC moeten de %VC van LRC, HRC en LRC-HRC gecombineerd een %VC van $\leq 15\%$ laten zien. Als de %VC >15 is, moet de kalibratorwaarde met een RLE-waarde die het verste van het gemiddelde ligt als uitschieter worden genegeerd en moet het gemiddelde opnieuw worden berekend aan de hand van de twee overige kalibratorwaarden. Er mag slechts 1 LRC- en 1 HRC-replica worden gewist. Ga verder met stap 3 als de %VC van de kalibrators $\leq 15\%$ is. Anders is de verificatie van de assaykalibratie ongeldig en moet de assay voor alle patiëntensamples worden herhaald. In dergelijke gevallen mogen de resultaten van patiëntensamples niet worden gerapporteerd.

De hierboven beschreven verificatie van de assaykalibratie voor de kalibrators wordt automatisch uitgevoerd door de *digene* assay-analysesoftware en afgedrukt in het data-analyserapport. **De *digene* assay-analyseprotocollen voor HPV verifiëren automatisch of de %VC van de Low-Risk en High-Risk HPV-kalibrators $\leq 15\%$ is.** De versies v1.0.2 en v1.0.3 van de *digene* assay-analysesoftware zullen de assay echter NIET ongeldig verklaren, tenzij de %VC voor de kalibrators $>25\%$ is. Daarom moet u handmatig controleren of de door de *digene* assay-analysesoftware berekende %VC $\leq 15\%$ is en verder gaan zoals aangegeven voor situatie 1 in onderstaande tabel. Raadpleeg de instructies in situatie 2 of 3 in de onderstaande tabel en ga door met de aangegeven "maatregelen door de gebruiker" als de %VC van de kalibratorreplica's tussen 15 en 25 ligt.

Situatie	Rapportage %VC voor de LRC- en/of HRC-replica's	Ondernomen actie door <i>digene</i> assay-analysesoftware	Maatregelen door de gebruiker
1	≤ 15%	Assay als "geldig" gerapporteerd	Resultaten mogen worden gerapporteerd; geen verdere actie vereist.
2	Tussen 15% en 25%	Geen uitschieters geschrapd en assay als "geldig" gerapporteerd	Schrap de kalibrator-RLE-waarde die het verste van het gemiddelde ligt. Bereken de %VC van de kalibrator opnieuw met de twee overige waarden. Als de %VC van de overige RLE-waarden > 15% is, is de assay ongeldig. De resultaten mogen niet worden gerapporteerd. Als de %VC van de resterende RLE-waarden ≤ 15% is, herbereken dan de cut-off van de assay, en herbereken vervolgens met behulp van deze cut-off de RLE/cut-off-verhouding van elke sample. Deze berekende waarden mogen worden gerapporteerd.
3	Tussen 15% en 25%	Eén uitschieter per kalibrator geschrapd en assay als "geldig" gerapporteerd	Assay is ongeldig. Resultaten mogen niet worden gerapporteerd. Assay moet worden herhaald.
4	> 25%	Eén uitschieter geschrapd en assay als "ongeldig" gerapporteerd	Assay is ongeldig. Resultaten mogen niet worden gerapporteerd. Assay moet worden herhaald.

Om de %VC met de hand te berekenen, zoals hierboven in situatie 2 noodzakelijk is, moet u de standaarddeviatie (STDEV) (n-1) van de resterende RLE-waarden van de replica's delen door het gemiddelde van de resterende RLE-waarden van de replica's (LRC of HRC of allebei) en die uitkomst vermenigvuldigen met 100.

Om de %VC te berekenen met behulp van Microsoft® Excel® (meegeleverd met de vorige versie van de *digene* assay-analysesoftware), kunt u de standaarddeviatie van de kalibratorreplica's berekenen met de formule *STDEV* en de gemiddelde RLE van de kalibrator bepalen met de formule *AVERAGE*. Zodra deze twee waarden zijn verkregen, deelt u de *STDEV* door de *AVERAGE* en vermenigvuldigt het resultaat met 100 om de %VC te verkrijgen.

$$(STDEV/AVERAGE) * 100 = \%VC$$

Bij vragen over de berekening van %VC's, de herberekening van de cut-off van de assay of de herberekening van de RLE/cut-off van de samples kunt u contact opnemen met uw plaatselijke QIAGEN vertegenwoordiger.

Om de reproduceerbaarheid van de kalibrator te bepalen en een schatting te maken hoe vaak er handmatige herberekeningen nodig zijn, zijn de resultaten van drie klinische evaluaties verzameld, waarbij 152 assay-runs betrokken waren die met de *digene* HC2 HPV DNA Test waren uitgevoerd. Uit de resultaten bleek dat de gemiddelde %VC voor deze 152 runs 8,1 bedroeg. Rekening houdend met alle triplo's van de kalibrator per testrun werd er een reproduceerbaarheid van >15%VC van de kalibrator geconstateerd voor slechts 17 van 152 runs (11,2%), waarbij 10 van deze 17 testruns resulteerden in een %VC tussen 15-25 (situatie 2). Voor de 17 testruns die een %VC opleverden van >15 werd een enkele uitschieter geschrapd en werd de %VC opnieuw berekend. Na de maatregelen door de gebruiker voor situatie 2 bleef slechts één %VC van de testruns >15, waardoor de testrun ongeldig was. De %VC's van de overige 151 testruns werden berekend voor een gemiddelde %VC van 6,0.

3. De gemiddelde resultaten van de kalibrator (LRC of HRC) en van de negatieve kalibrator (NC) worden gebruikt voor het berekenen van de LRC/NC- of HRC/NC-verhouding voor elke probe. Eerdere versies (V1.0.2 en V1.0.3) van protocollen van de *digene* assay-analysesoftware berekenen de aanvaardbare bereiken niet correct. Deze verhoudingen moeten aan de volgende criteria voldoen om de assaykalibratie te verifiëren voordat de sampleresultaten geïnterpreteerd kunnen worden:

CPC-METHODE	DUBBELE-PROBE-METHODE
Verificatie van de assaykalibratie Aanvaardbare bereiken	Verificatie van de assaykalibratie Aanvaardbare bereiken
$2,0 \leq \text{LRC}\bar{x} / \text{NC}\bar{x} \leq 15$	$2,0 \leq \text{LRC}\bar{x} / \text{NCLR}\bar{x} \leq 15$ (LR-zijde)
$2,0 \leq \text{HRC}\bar{x} / \text{NC}\bar{x} \leq 15$	$2,0 \leq \text{HRC}\bar{x} / \text{NCHR}\bar{x} \leq 15$ (HR-zijde)
$2,0 \leq (\text{LRC en HRC}) \bar{x} / \text{NC}\bar{x} \leq 15$	

4. Bereken de juiste LRC \bar{x} /NC \bar{x} - of HRC \bar{x} /NC \bar{x} -verhouding voor elke probe-set. Ga verder met de volgende stap als de verhoudingen $\geq 2,0$ en ≤ 15 zijn. Als er verhoudingen $< 2,0$ of > 15 zijn, **is de assay voor die specifieke probe ongeldig en moet worden herhaald**. Herhaal alle patiëntensamples in de run.

Opmerking: Aanvaardbare bereiken voor de negatieve kalibrator en positieve kalibrators zijn alleen vastgesteld voor een DML-instrument.

BEREKENING VAN DE CUT-OFF

Zodra een assay overeenkomstig de hierboven vermelde criteria is gevalideerd, zijn de cut-off-waarden voor het bepalen van positieve samples als volgt:

1) Gecombineerde-probecocktail-methode:
$$\frac{(\text{LRC-replica's} + \text{HRC-replica's})}{\text{aantal replica's}}$$

2) Dubbele-probe-methode:
$$\begin{aligned} \text{Low-Risk HPV-probe cut-off} &= \text{LRC}\bar{x} \\ \text{High-Risk HPV-probe cut-off} &= \text{HRC}\bar{x} \end{aligned}$$

Voorbeeld cut-off-berekeningen					
voor:		Low-Risk of High-Risk HPV-probe Dubbele-probe-methode	CPC-methode met Low-Risk HPV-probe	High-Risk HPV-probe CPC-methode	Gecombineerde HPV-probe CPC-methode
	NC RLE-waarden	LRC of HRC RLE-waarden	LRC RLE-waarden	HRC RLE-waarden	LRC en HRC RLE-waarden
	97	312	330	235*	330
	101	335	305	295	305
	91	307	385	279	385
					295
					235*
					279
Gemiddelde RLE-waarde	96	318	340	287*	318,8*
%VC	4,9	4,7	12,0	3,9*	13,0
LRC \bar{x} /NC \bar{x}	n.v.t.	3,31	3,54	3,00	3,32

De gemiddelde RLE-waarde voor de positieve kalibrator bepaalt de cut-off-waarde van de assay. Zodoende is de positieve cut-off-waarde (LRC \bar{x}) = 318.

* Gemiddelde %VC van alle 6 replica's was 16,8. De replica met een waarde van 235 werd geschrapt als uitschieter. De %VC van de overige replica's was 13,0 met een gemiddelde van 318,8. De initiële %VC van HRC was 11,5.

Alle RLE-waarden van de samples moeten worden omgezet in een verhoudingsgetal ten opzichte van de juiste cut-off-waarde. Alle assays die getest zijn met de Low-Risk HPV-probe moeten bijvoorbeeld worden uitgedrukt als RLE/Low-Risk cut-off-waarde van de sample. Hetzelfde kan worden gedaan met samples die met de High-Risk HPV-probe of de CPC-probe zijn getest.

Opmerkingen: RLE/CO-waarden en positieve/negatieve resultaten voor alle samples worden gerapporteerd in het *Data Analysis Report* (data-analyserapport) van het DML-instrument.

Bij gebruik van het Rapid Capture System apparaat is het RCS HPV softwareprotocol geprogrammeerd om een kalibratie-aanpassingsfactor (CAF, calibration adjustment factor) van 0,8 toe te passen op de gemiddelde RLE-waarde van de geldige replica's van de positieve kalibrator. Deze CAF is noodzakelijk om de werkingseigenschappen van de assay gelijkwaardig te houden aan die van de handmatige testprocedure. Deze correctie geldt alleen voor assays die worden uitgevoerd met het Rapid Capture System apparaat. Het is daarom van groot belang dat voor elke specifieke testmethode het juiste softwareprotocol wordt geselecteerd om nauwkeurige testresultaten te genereren. Alle RLE-waarden van de samples moeten worden omgezet in een verhoudingsgetal ten opzichte van de juiste cut-off-waarde (CO). Alle assays moeten bijvoorbeeld worden uitgedrukt als RLE/CO-waarde van de sample.

KWALITEITSCONTROLE

Kwaliteitscontrole-samples worden meegeleverd met de *digene* HC2 HPV DNA Test. Raadpleeg de desbetreffende gebruiksaanwijzing voor instructies over het invoeren van de lotnummers en uiterste houdbaarheidsdatums van de kwaliteitscontroles. Deze kwaliteitscontroles moeten in iedere testrun worden vermeld en de RLE/CO van elke kwaliteitscontrole moet binnen het onderstaande aanvaardbare bereik liggen om de run als geldig te kunnen beschouwen. **Als de kwaliteitscontroles niet binnen deze bereiken liggen, is de assay ongeldig en moet worden herhaald.** Zodoende mogen er geen patiëntenresultaten worden gerapporteerd voor een ongeldige run.

Kwaliteits- controle	HPV-type	Verwacht resultaat (RLE/cut-off-waarde) Low-Risk HPV-probe			
		Minimum	Maximum	Gemiddeld	%VC
QC1-LR	Low-Risk (HPV 6)	2	8	5,0	25
QC2-HR	High-Risk (HPV 16)	0,001	0,999	0,5	25

Kwaliteits- controle	HPV-type	Verwacht resultaat (RLE/cut-off-waarde) High-Risk HPV-probe			
		Minimum	Maximum	Gemiddeld	%VC
QC1-LR	Low-Risk (HPV 6)	0,001	0,999	0,5	25
QC2-HR	High-Risk (HPV 16)	2	8	5,0	25

Kwaliteits- controle	HPV-type	Verwacht resultaat (RLE/cut-off-waarde) CPC HPV-probe			
		Minimum	Maximum	Gemiddeld	%VC
QC1-LR	Low-Risk (HPV 6)	2	8	5,0	25
QC2-HR	High-Risk (HPV 16)	2	8	5,0	25

1. De in de kit geleverde kwaliteitscontrolematerialen zijn gekloneerde HPV-DNA-targets en zijn niet afkomstig van wild-type HPV. Dit is hetzelfde type materiaal dat gebruikt wordt voor de met de *digene* HC2 HPV DNA Test meegeleverde kalibrators.
2. Dit kwaliteitscontrole materiaal werkt niet als geschikte controle voor het verwerken van PreservCyt-oplossing of SurePath-conserveervloeistof.
3. De met deze testkit meegeleverde kwaliteitscontroles moeten worden gebruikt voor interne kwaliteitscontrole. Extra kwaliteitscontroles kunnen worden getest volgens de richtlijnen of vereisten van de plaatselijke en/of landelijke voorschriften of accrediterende organisaties.

INTERPRETATIE VAN SAMPLERESULTATEN

Opmerking: De cut-off van 1 pg/ml van de *digene* HC2 HPV DNA Test is gelijk aan 100.000 HPV-kopieën/ml of 5.000 HPV-kopieën per assay.

1. STM-samples met een verhouding RLE/cut-off-waarde $\geq 1,0$ **met alleen Low-Risk HPV-probe** worden als “positief” beschouwd voor 1 of meer van de HPV-typen 6, 11, 42, 43 of 44.
2. STM-samples met een verhouding RLE/cut-off-waarde $\geq 1,0$ **met alleen High-Risk HPV-probe** worden als “positief” beschouwd voor 1 of meer van de HPV-typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 en 68.
3. Als de verhouding RLE:CO van een sample bij het testen van PreservCyt-samples $\geq 1,0$ en $< 2,5$ is, adviseert QIAGEN de sample opnieuw te testen. Als de eerste hertest positief is (RLE:CO $\geq 1,0$), mag de sample als positief gerapporteerd worden en zijn meer hertests niet noodzakelijk. Als echter het resultaat van de eerste hertest negatief is ($< 1,0$), moet er een tweede hertest (derde resultaat) worden gedaan om een eindresultaat te genereren. Het resultaat van de tweede hertest wordt beschouwd als het eindresultaat dat gerapporteerd dient te worden.
4. Als de verhouding RLE:cut-off van een sample in de buurt ligt van, maar minder is dan 1,0, en een hoogrisico-HPV-infectie vermoed wordt, dient er een andere testmethode en/of een herhalingsample te worden overwogen.
5. STM-samples met een verhouding RLE:cut-off-waarde van $\geq 1,0$ voor zowel de Low-Risk HPV-probe als de High-Risk HPV-probe worden als “positief” beschouwd voor 1 of meer HPV-typen uit iedere groep probes.
6. STM-samples met een verhouding RLE:cut-off-waarde van $\geq 1,0$ met de gecombineerde-probecocktail worden als “positief” beschouwd voor 1 of meer van de HPV-typen 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 en 68.
7. Samples met een verhouding RLE/cut-off-waarde van $< 1,0$ voor de gecombineerde-probecocktail of voor zowel de Low-Risk HPV-probe als de High-Risk HPV-probe worden beschouwd als “negatief” of “geen HPV-DNA aangetoond” voor de geteste 18 HPV-typen. In dat geval ontbreken HPV-DNA-sequenties of ligt de HPV-DNA-concentratie beneden de detectiegrens van de assay.

WERKINGSEIGENSCHAPPEN

GEGEVENS DIE DE INDICATIE LAAGRISICO-; EN HOOGRISICO-HPV ONDERSTEUNEN

Klinische screening van patiënten met de Pap-uitslag ASC-US ter bepaling van de noodzaak van doorverwijzing voor een colposcopie

In Amerika is in 1996 onder leiding van het onderzoeksinstituut Kaiser Foundation Research Institute en de Kaiser Permanente Medical Group een studie verricht getiteld "Utility of HPV DNA Testing for Triage of Women with Borderline Pap Smears". Bij vrouwen die gebruikmaakten van verschillende faciliteiten van de Kaiser-klinieken, werden cervicale samples afgenomen voor een standaard cervixuitstrijkje en voor de *digene* HC2 HPV DNA Test. De initiële cervixuitstrijkjes werden geëvalueerd volgens de Bethesda-classificatie. Raadpleeg voor terminologie die overeenkomt met baarmoederhalskankerscreening in de Europese Gemeenschap de "European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening"⁴⁰. Vrouwen (15 jaar of ouder) met de Pap-uitslag ASC-US (atypische cellen waarvan de significantie niet is vastgesteld) kwamen terug voor een colposcopie en biopsie. Colposcopisch gestuurde histologische samples werden door pathologen bestudeerd en er werd een initiële diagnose gesteld. Elke histologische sample werd tevens beoordeeld door een onafhankelijke patholoog en een derde patholoog oordeelde over eventuele discrepanties tussen de eerste beoordeling en de onafhankelijke beoordeling.

Op de initiële sample werd een HPV DNA-test gedaan en er werd uitsluitend High-Risk HPV-probe gebruikt. De HPV DNA-test werd gedaan met een prototype van de *digene* HC2 HPV DNA Test, die in de High-Risk HPV-probe probes tegen 11 van de 13 HPV-typen bevatte, maar geen probes tegen de HPV-typen 59 en 68 bevatte. Verwacht werd dat dit verschil niet zou resulteren in significant verschillende werkingsprofielen voor de twee assays.

Van 885 vrouwen met ASC-US Pap-uitstrijkjes waren de HPV-testresultaten en histologische diagnoses beschikbaar. Bij de meeste patiënten werden de tests uitgevoerd met samples die na afname zowel in STM als in PreservCyt-oplossing waren opgenomen. Vanwege de overeenkomsten in de werkingseigenschappen van de *digene* HC2 HPV DNA Test bij gebruik van STM en PreservCyt-oplossing, zijn alleen de prestaties van de assay met PreservCyt-oplossing vermeld.

Tabel 3 laat zien dat onder patiënten met een ASC-US Pap-testuitslag met doorverwijzing de negatieve voorspellende waarde van de *digene* HC2 HPV DNA Test voor het hebben van CIN-2 of CIN-3 of ernstigere pathologie bij colposcopie 99% bedraagt.

Tabel 3
Vergelijking van de *digene* HC2 HPV DNA Test versus consensus-histologie:
Pap-populatie met doorverwijzing wegens ASC-US
Kaiser-studie, samples in PreservCyt-oplossing

	CIN-2 of CIN-3 of ernstiger op het moment van colposcopie			Totaal
		+	-	
High-Risk HPV	+	66	317	383
	-	5	497	502
Totaal		71	814	885

Sensitiviteit $[TP/(TP+FN)] = 93,0\%$ (66/71)

95% CI = 84,3 tot 97,7

Specificiteit $[TN/(TN+FP)] = 61,1\%$ (497/814)

95% CI = 57,7 tot 64,4

Ziekteprevalentie = 8,0% (71/885)

Positief voorspellende waarde van assay = 17,2% (66/383)

Negatief voorspellende waarde van assay = 99,0% (497/502)

Tabel 4 toont de theoretische positief en negatief voorspellende waarden op basis van diverse prevalenties voor een initiële ASC-US die CIN-2 of CIN-3 of hoger blijkt te zijn op basis van High-Risk HPV-probe-resultaten.

Tabel 4
Theoretische positief en negatief voorspellende waarde
High-Risk HPV-probe
ASC-US Pap-uitslagen

Theoretische prevalentie voor CIN-2 en CIN-3	Initiële ASC-US Pap-uitslag	
	Positief voorspellende waarde van assay	Negatief voorspellende waarde van assay
5	11,2	99,4
10	21,0	98,7
15	29,7	98,0
20	37,4	97,2
25	44,3	96,3
30	50,6	95,3

Tabel 5 illustreert de variatie tussen de diverse leeftijdsgroepen die in dit onderzoek zijn opgenomen.

Tabel 5
Gegevens Kaiser-onderzoek
***digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test versus consensus-histologie**
Resultaten (CIN-2, CIN-3)
Leeftijdspecifieke kenmerken

	Leeftijd < 30 jaar	Leeftijd 30-39 jaar	Leeftijd > 39 jaar
n	287	233	365
Ziekteprevalentie (%)	12,2	11,2	2,7
Sensitiviteit (%)	100,00 (35/35)	88,46 (23/26)	80,00 (8/10)
95% betrouwbaarheidsinterval	90,0-100	69,9-97,6	44,4-97,5
Specificiteit (%)	31,4 (79/252)	66,2 (137/207)	79,15 (281/355)
95% betrouwbaarheidsinterval	25,7-37,5	59,3-72,6	74,6-83,3
Negatief voorspellende waarde (%)	100 (79/79)	97,86 (137/140)	99,29 (281/283)
Positief voorspellende waarde (%)	16,83 (35/208)	24,73 (23/93)	9,76 (8/82)

Klinische sensitiviteit en specificiteit voor de bepaling van het risico van een hooggradige aandoening bij vrouwen met CIN-1 of CIN-2 / CIN-3 Pap-uitstrijkjes

Een multicenter klinisch onderzoek met de *digene* HC2 HPV DNA Test werd verricht met samples die verzameld waren in poliklinieken voor colposcopie van enkele grote ziekenhuizen en medische centra (3 locaties) in het westen en zuiden van de Verenigde Staten met een hoge prevalentie aan ernstige cervixpathologie en HPV. Op 3 onderzoekslocaties die geen connecties hadden met de poliklinieken waar de samples waren afgenomen werden HPV-tests verricht. De populatie voor dit klinisch onderzoek bestond uit vrouwen bij wie ofwel CIN-1 ofwel CIN-2 / CIN-3 was geconstateerd op basis van een recent cervixuitstrijkje en die doorverwezen waren voor een vervolgcoposcopie. Van 702 geïncludeerde patiënten hadden er 327 Pap-uitslagen hoger dan ASC-US en was adequate informatie beschikbaar; van deze patiënten hadden 96 een uiteindelijke ziektestatus van CIN-2 / CIN-3 of hoger. Uitgestreken cervicale celsamples werden ofwel met behulp van het *digene* HC2 DNA sampleafnamehulpmiddel verkregen en vervolgens in STM gebracht, ofwel met behulp van een cervixborstel verkregen en met PreservCyt-oplossing gespoeld. De samples werden afgenomen bij de colposcopie. De samples werden

getest met de *digene* HC2 HPV DNA Test, en de resultaten werden vergeleken met de voor elke patiënt vastgestelde ziektestatus. De ziektestatus was gebaseerd op de resultaten van de histologische evaluatie. Wanneer de histologie echter negatief was, of bij het ontbreken van een histologische uitslag, werd de ziektestatus bepaald aan de hand van de cytologie bij het colposcopisch onderzoek (zie *Tabel 6*). De *digene* HC2 HPV DNA Test werd uitgevoerd in 3 grote, hoofdstedelijke medische centra die geen connecties hadden met de centra waar de samples bij de colposcopie waren afgenomen. De cytologie werd in een pathologisch referentielaboratorium verricht en de histologie in de instellingen die de colposcopie verrichtten. De testresultaten werden vergeleken met de ziektestatus ter beoordeling van de sensitiviteit, specificiteit en negatieve en positieve voorspellende waarden van de test voor het aantonen van hooggradige cervicale neoplasie. Vanwege de overeenkomsten in de werkingseigenschappen van de *digene* HC2 HPV DNA Test bij gebruik van STM en PreservCyt-oplossing, zijn alleen de prestaties van de assay met PreservCyt vermeld.

Er werden bij de resultaten van de High-Risk HPV-probe geen verschillen waargenomen tussen de STM-samples en de samples in PreservCyt-oplossing. De onderstaande tabel toont de resultaten van de High-Risk HPV-probe in deze populatie:

Tabel 6
Algoritme ziektestatus van patiënt

Cytologische uitslag	Histologische uitslag	Ziektestatus
NEG	NEG of niet verricht*	NEG
CIN-1	NEG	CIN-1
CIN-2 of CIN-3	NEG	CIN-2 of CIN-3
Kanker	NEG	CIN-2 of CIN-3 +
NEG	CIN-1	CIN-1
CIN-1	Niet verricht*	CIN-1
CIN-1	CIN-1	CIN-1
CIN-2 of CIN-3	CIN-1	CIN-1
Kanker	CIN-1	CIN-1
NEG	CIN-2 of CIN-3	CIN-2 of CIN-3
CIN-1	CIN-2 of CIN-3	CIN-2 of CIN-3
CIN-2 of CIN-3	CIN-2 of CIN-3	CIN-2 of CIN-3
CIN-2 of CIN-3	Niet verricht*	CIN-2 of CIN-3
Kanker	CIN-2 of CIN-3	CIN-2 of CIN-3
NEG	Kanker	CIN-2 of CIN-3 +
CIN-1	Kanker	CIN-2 of CIN-3 +
CIN-2 of CIN-3	Kanker	CIN-2 of CIN-3 +
Kanker	Niet verricht*	CIN-2 of CIN-3 +
Kanker	Kanker	CIN-2 of CIN-3 +

* Biopsie en/of endocervicale curettage (ECC) werden niet uitgevoerd omdat er geen afwijkingen werden waargenomen bij colposcopie, of het resultaat van histologie niet beschikbaar was.

Tabel 7 en 8 tonen de prestaties van de *digene* HC2 HPV DNA Test, bepaald met 327 PreservCyt-samples, waarvan er 96 waren afgenomen bij vrouwen met een diagnose van cervixziekte met hoge graad. De vergelijkingen werden uitgevoerd met alle onderzochtpatiënten met afwijkende Pap-testresultaten en doorverwijzing. Vergelijkingen worden getoond voor PreservCyt-samples getest met High-Risk HPV-probe.

Tabel 7
Resultaten van de High-Risk HPV-probe

Pap-uitslag voor doorverwijzing	Uiteindelijke ziektestatus						Totaal
	CIN-2 of CIN-3		CIN-1		Negatief		
	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	
Resultaten High-Risk HPV							
CIN-1	44	4	78	33	28	37	224
CIN-2 of CIN-3	45	3	29	14	5	7	103
Totaal	89	7	107	47	33	44	327
	96		154		77		

Tabel 8 laat zien dat de *digene* HC2 HPV DNA Test met behulp van de High-Risk HPV-probe een overall sensitiviteit van ongeveer 93% vertoonde voor het identificeren van vrouwen met neoplasie met hoge graad in een groep die was doorverwezen voor colposcopie op basis van een diagnose van CIN-1, CIN-2 of CIN-3 of gelijkwaardig in een Pap-test. De test toonde ook een negatieve voorspellende waarde van bijna 93% aan in deze populatie.

Tabel 8
Werkingseigenschappen
***digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test onder patiënten met een doorverwijzing Pap-test met CIN-1 of hoger en een uiteindelijke ziektestatus van CIN-2 of CIN-3**

Resultaat High-Risk HPV-probe	Pap-verwijzing CIN-1 of CIN-2 / CIN-3 → CIN-2 / CIN-3 ziekte			Totaal
		+	-	
+		89	140	229
-		7	91	98
Totaal		96	231	327

Sensitiviteit [TP/(TP+FN)] = 92,7% (89/96)
95% CI = 85,6 tot 97,0

Specificiteit [TN/(TN+FP)] = 39,4% (91/231)
95% CI = 33,1 tot 46,0

Ziekteprevalentie voor CIN-1 met verwijzing tot uiteindelijk CIN-2 of CIN-3 = 21,4%
Ziekteprevalentie voor CIN-2 of CIN-3 met verwijzing tot uiteindelijk CIN-2 of CIN-3 = 46,6%
Overall positieve voorspellende waarde = 38,9% (89/229)
Overall negatieve voorspellende waarde = 92,8% (91/98)

De specificiteit van de *digene* HC2 HPV DNA Test bleek wat aan de lage kant te zijn, maar een strikte correlatie tussen afwezigheid van neoplasie en een negatief HPV-resultaat is niet te verwachten. HPV-DNA kan aanwezig zijn bij vrouwen bij wie de ziekte niet naar een hogere graad is voortgeschreden. Wanneer HPV werd getest met PCR (Polymerase Chain Reaction, een assay die alleen voor onderzoeksdoeleinden mag worden gebruikt) in samples met een positief HPV-resultaat en waarvan de corresponderende ziektestatus minder ernstig was dan neoplasie met lage graad, was in feite bijna 75% positief.

Tabel 9 geeft de theoretische positief en negatief voorspellende waarden van een High-Risk HPV-probe voor een initiële CIN-1 of CIN-2 / CIN-3 aan die na een colposcopie CIN-2 / CIN-3 of een ernstigere ziekte blijkt te zijn.

Tabel 9
Theoretische positief en negatief voorspellende waarde
High-Risk HPV-probe
Aanvankelijk Pap-testresultaat CIN-1, CIN-2 of CIN-3

Theoretische prevalentie voor CIN-2 en CIN-3	Aanvankelijk Pap-testresultaat CIN-1, CIN-2 of CIN-3	
	Assay positief	Assay negatief
	voorspellende waarde	voorspellende waarde
5	7,4	99,0
10	14,5	97,9
15	21,2	96,8
20	27,6	95,5
25	33,7	94,1
30	39,6	92,6
35	45,1	90,9
40	50,4	89,0
45	55,5	86,8
50	60,4	84,3

GEGEVENS DIE DE INDICATIE PRIMAIRE SCREENING HIGH-RISK HPV ONDERSTEUNEN

Klinische werking bij het screenen van patiënten met een normale Pap-uitslag als hulpmiddel bij de beoordeling van het risico ten behoeve van de patiëntenbehandeling

Hieronder worden de resultaten beschreven van acht onafhankelijke klinische onderzoeken die werden uitgevoerd door prominente medische, academische en overheidsinstellingen in centra in de Verenigde Staten en in andere landen. Bij de onderzoeken werden de gevestigde Pap-methoden toegepast die in gebruik zijn in de landen waar het onderzoek werd verricht. In alle gevallen op twee na werd het Bethesda gradiëringssysteem toegepast bij de interpretatie van de Pap-uitslagen. Daarnaast is hooggradige cervixziekte voor elk onderzoek gediagnosticeerd met onder colposcopie afgenomen biopten. In deze studies is de klinische bruikbaarheid van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test beoordeeld in vergelijking met het cervixuitstrijkje voor oudere vrouwen (over het algemeen ouder dan 30-35 jaar). In alle studies op één na is ook prospectief HPV getest met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

De studies bestonden uit screeningsonderzoeken van een dwarsdoorsnede van de algemene populatie waarbij de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test werd gebruikt, tenzij hieronder anders staat vermeld. Zoals aangegeven, werden 2 van de 8 screeningsonderzoeken verricht in de Verenigde Staten, 2 in Europa, 2 in Latijns-Amerika, 1 in Afrika en 1 in Azië.

De prestaties van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, zoals die in zes dwarsdoorsnedestudies zijn waargenomen, zijn samengevat in tabel 10 en 11 voor vrouwen van 30 jaar en ouder met een histologisch bevestigde diagnose van cervicale neoplasie van hoge graad (gedefinieerd als CIN-3 of ernstiger).

Tabel 10
Geschatte prestaties van *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test
Sensitiviteit en specificiteit

Populatie	n	Sensitiviteit (%)			Specificiteit (%)		
		alleen PAP	alleen HPV	HPV + PAP	alleen PAP	alleen HPV	HPV + PAP
West-Europa 1	7592	51,6 (14/27)	96,3 (26/27)	100 (27/27)	98,5 (7453/7565)	96,2 (275/7565)	95,1 (7193/7565)
		95% CI	32,0-71,3	81,0-99,9	87,2-100	98,2-98,8	95,7-96,6
Latijns-Amerika 1	6115	58,4 (45/77)	94,8 (73/77)	97,4 (75/77)	98,7 (5962/6038)	93,9 (5669/6038)	93,4 (5637/6038)
		95% CI	46,68-69,6	87,2-98,6	90,9-99,7	98,4-99,0	93,3-94,5
Latijns-Amerika 2 [†]	6176	77,9 (53/68)	89,7 (61/68)	94,1 (64/68)	94,1 (5745/6108)	94,0 (5742/6108)	89,9 (5490/6108)
		95% CI	66,2-87,1	79,9-95,8	85,6-98,4	93,4-94,6	93,4-94,6
Afrika	2925	84,1 (90/107)	89,7 (96/107)	92,5 (99/107)	86,4 (2436/2818)	80,0 (2253/2818)	76,4 (2152/2818)
		95% CI	75,8-90,5	82,4-94,8	85,8-96,7	85,1-87,7	78,4-81,4
Azië	1936	97,6 (41/42)	100 (42/42)	100 (42/42)	76,3 (1445/1894)	83,0 (1572/1894)	68,0 (1287/1894)
		95% CI	87,4-99,9	91,6-100,0	91,6-100,0	74,3-78,2	81,2-85,0
VS 1	1040	50,0 (1/2)	100 (2/2)	100 (2/2)	97,6 (1013/1038)	96,2 (999/1038)	95,5 (991/1038)
		95% CI	1,26-98,7	15,8-100,0	15,8-100,0	96,5-98,4	94,9-97,3

[†] HC2-gegevens voor zover beschikbaar, anders HCS-gegevens gebruikt; gegevens gecombineerd.

Tabel 11
Geschatte prestaties van *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test
Positief en negatief voorspellende waarde

Populatie	n	Prevalentie (%)	Positief voorspellende waarde (%)			Negatief voorspellende waarde (%)		
			alleen PAP	alleen HPV	HPV + PAP	alleen PAP	alleen HPV	HPV + PAP
West-Europa 1	7592	0,36 (27/7592)	11,1 (14/126)	8,23 (26/316)	6,77 (27/399)	99,83 (7453/7466)	99,99 (7275/7276)	100,0 (7193/7193)
		95% CI	0,23-0,52	6,21-17,9	5,45-11,8	4,51-9,69	99,70-99,91	99,92-100,0
Latijns-Amerika 1	6115	1,26 (77/6115)	37,2 (45/121)	16,5 (73/442)	15,8 (75/476)	99,47 (5962/5994)	99,93 (5669/5673)	99,96 (5637/5639)
		95% CI	0,99-1,57	28,6-46,4	13,2-20,3	12,6-19,4	99,25-99,63	99,82-99,98
Latijns-Amerika 2 [†]	6176	1,10 (68/6176)	12,7 (53/416)	14,3 (61/427)	9,4 (64/682)	99,74 (5745/5760)	99,88 (5742/5749)	99,93 (5490/5494)
		95% CI	0,86-1,39	9,69-16,3	11,1-18,0	7,30-11,8	99,57-99,85	99,75-99,95
Afrika	2925	3,66 (107/2925)	19,1 (90/472)	14,5 (96/661)	12,9 (99/765)	99,31 (2436/2453)	99,51 (2253/2264)	99,63 (2152/2160)
		95% CI	3,01-4,40	15,6-22,9	11,9-17,4	10,6-15,5	98,89-99,60	99,13-99,76
Azië	1936	2,17 (42/1936)	8,37 (41/490)	11,5 (42/364)	6,47 (42/649)	99,93 (1445/1446)	100,0 (1572/1572)	100,0 (1287/1287)
		95% CI	1,57-2,92	6,07-11,2	8,44-15,3	4,70-8,65	99,62-100,0	99,77-100,0
VS 1	1040	0,19 (2/1040)	3,85 (1/26)	4,88 (2/41)	4,08 (2/49)	99,90 (1013/1014)	100,0 (999/999)	100,0 (991/991)
		95% CI	0,02-0,69	0,10-19,6	0,60-16,5	0,50-14,0	99,45-100,0	99,63-100,0

[†] HC2-gegevens voor zover beschikbaar, anders HCS-gegevens gebruikt; gegevens gecombineerd.

Over alle studies samen is er een uniforme, en vaak sterk significante, verbetering in de sensitiviteit voor de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test ten opzichte van alleen Pap. Zoals ook geldt voor de sensitiviteit, overstijgt de negatief voorspellende waarde (NPV) van HPV in alle gevallen die van de Pap-test alleen, en bedraagt bijna 100%. Deze NPV toont de hoge mate van waarschijnlijkheid aan van het ontbreken van een hooggradige cervicale aandoening of kanker bij cytologisch normale vrouwen die vrij zijn van een HPV-infectie.

Hoewel de specificiteit van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test lager is dan die voor alleen Pap, heeft likelihood-ratio-analyse aangetoond dat de waargenomen daling van de specificiteit niet voldoende significant is om afbreuk te doen aan de klinische bruikbaarheid van de test voor het identificeren van

vrouwen die weinig of geen kans hebben om cervixziekte te hebben of te ontwikkelen. Desalniettemin is het belangrijk dat de beslissing om een patiënt door te verwijzen voor colposcopie wordt gebaseerd op alle klinische en risicogerelateerde informatie en de anamnese van de patiënt die de arts ter beschikking heeft. Belangrijke variabelen zijn een voorgeschiedenis van HPV-infectie en/of afwijkend cervixuitstrijkje, leeftijd bij eerste geslachtsgemeenschap, aantal sekspartners en concomitante seksueel overdraagbare aandoeningen.^{27,28}

Hoewel de prevalentie van een hooggradige aandoening niet significant verschilt tussen de onderzoeken waarop de bepaling van de werking gebaseerd is, kan de prevalentie van HPV-infectie in een populatie de werking beïnvloeden en zal deze doorgaans variëren naargelang de patiëntenpopulatie. Bovendien is aangetoond dat de prevalentie van HPV-infectie zeer sterk afneemt bij stijgende leeftijd.^{28, 30-37, 41} Positieve voorspellende waarden dalen wanneer populaties met een lage prevalentie of personen met een laag risico van infectie worden getest.

Longitudinale analyses zijn uitgevoerd door de resultaten van twee studies te gebruiken; één daarvan is uitgevoerd in de VS door het National Cancer Institute (NCI) in Portland, Oregon, en de andere in Frankrijk, in het Laboratoire Pol Bouin C.H.U. in Reims. Deze longitudinale analyses werden verricht om aan te tonen dat Pap-negatieve/HPV-negatieve patiënten een lager risico hebben op de aanwezigheid van een cervicale aandoening in vergelijking met traditioneel gedefinieerde vrouwen met een laag risico van wie de HPV-status onbekend is en vergeleken met Pap-negatieve/HPV-positieve patiënten.

De resultaten van deze longitudinale analyses zijn hieronder weergegeven in tabel 12 en 13.

Tabel 12
Overzicht van de resultaten: Studies bij NCI en in Frankrijk
Relatief risico van hooggradige ziekte

Studiegroep	Leeftijd	Categorie laag risico	n	Gevallen van CIN 3+	Percentage (per 100 patiëntjaren)	Relatief risico (95% CI)
NCI	30 jaar en ouder	Pap normaal, HPV-negatief	12.054	28	0,043	0,897 (0,596, 1,348)
		Opeenvolgende normale Paps*	9.429	19	0,048	1,000
	Alle	Pap normaal, HPV-negatief	17.594	48	0,056	0,678 (0,514, 0,894)
		Opeenvolgende normale Paps*	13.392	44	0,082	1,000
Frankrijk	30 jaar en ouder	Pap normaal, HPV-negatief	1.690	3	0,084	0,849 (0,307, 2,35)
		Opeenvolgende normale Paps*	2.026	4	0,099	1,000
	Alle	Pap normaal, HPV-negatief	2.180	3	0,066	0,491 (0,221, 1,09)
		Opeenvolgende normale Paps*	2.650	7	0,136	1,000

*Drie normale jaarlijkse Paps over circa 2 jaar

Tabel 13
Overzicht van de resultaten: Studies bij NCI en in Frankrijk
Ziektepercentages, bij aanvang gestratificeerd op basis van HPV-status

Studiegroep	Leeftijd	Status bij aanvang	n	Gevallen van CIN 3+	Percentage (per 100 patiëntjaren)	Relatief risico (95% CI)
NCI	30 jaar en ouder	Pap normaal, HPV-positief	1.078	24	0,451	10,50 (6,13, 18,0)
		Pap normaal, HPV-negatief	12.054	28	0,043	1,00
	Alle	Pap normaal, HPV-positief	2.561	63	0,096	10,64 (7,33 – 15,5)
		Pap normaal, HPV-negatief	17.594	48	0,056	1,00
Frankrijk	30 jaar en ouder	Pap normaal, HPV-positief	419	14	2,346	27,3 (8,41, 88,3)
		Pap normaal, HPV-negatief	1696	3	0,084	1,00
	Alle	Pap normaal, HPV-positief	619	22	2,520	37,0 (11,8, 116)
		Pap normaal, HPV-negatief	2180	3	0,066	1,00

De klinische bruikbaarheid van de HPV-testuitslag wordt nog meer bevestigd door het verhoogde risico van een cervicale aandoening bij HPV-positieve vrouwen ten opzichte van HPV-negatieve vrouwen.

ANALYTISCHE SENSITIVITEIT

Een niet-klinisch panel van gekloneerd HPV-plasmide-DNA werd getest om te bepalen of alle 18 HPV-typen aantoonbaar zijn met de *digene* HC2 HPV DNA Test en om de analytische sensitiviteit van de assay te bepalen voor elk van de HPV-typen. Elke HPV-targetconcentratie (100 pg/ml, 10 pg/ml, 2,5 pg/ml, 1 pg/ml, 0,5 pg/ml en 0,2 pg/ml) van alle 18 HPV-DNA-typen (6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 en 68) werd in drievoud getest met een Low-Risk HPV-probe of High-Risk HPV-probe, al naar gelang wat toepasselijk was. Het gemiddelde signaal in RLE werd voor elke concentratie van elk HPV-type berekend en vergeleken met de positieve kalibrator voor de passende zijde van de assay.

De aantoonbare limiet van elk HPV-type in STM is afgebeeld in tabel 14. De aantoonbare limieten varieerden van 0,62 pg/ml tot 1,39 pg/ml afhankelijk van het geteste HPV-type. Alle HPV-typen waren aantoonbaar bij een geschatte concentratie van 1,09 pg van het HPV-DNA-target per 1 ml STM-sample. De gemiddelde aantoonbare limiet van alle 18 HPV-DNA-typen was 1,09 pg/ml met een standaarddeviatie van 0,05.

Tabel 14
Overzicht aantoonbare limieten van de *digene* HC2 HPV DNA Test
van de sensitiviteit voor elk HPV-DNA-type in STM

HPV-DNA-type	Aantoonbare HPV-DNA-concentratie (pg/ml)	Standaard-deviatie	95% betrouwbaarheids-bereik
6	1,33	0,03	1,22-1,46
11	1,13	0,05	1,00-1,29
16	1,09	0,06	0,94-1,29
18	1,05	0,05	0,88-1,29
31	1,01	0,05	0,91-1,15
33	1,35	0,02	1,26-1,45
35	1,11	0,05	0,95-1,31
39	1,39	0,09	1,16-1,71
42	1,20	0,05	1,02-1,44
43	0,85	0,03	0,86-1,07
44	1,17	0,04	1,02-1,36
45	1,14	0,04	0,99-1,35
51	0,78	0,10	0,70-0,88
52	1,37	0,06	1,21-1,58
56	0,62	0,04	0,58-0,67
58	0,82	0,04	0,73-0,94
59	1,10	0,06	1,00-1,21
68	1,19	0,04	1,03-1,39
Gemiddelde (alle typen)	1,09	0,05	0,97-1,27

WERKING VAN DE GECOMBINEERDE-PROBECOCTAIL (CPC)

Hetzelfde niet-klinische HPV-plasmide-DNA-panel zoals hierboven beschreven werd getest om de analytische sensitiviteit van alle 18 HPV-typen in de *digene* HC2 HPV DNA Test te bepalen volgens het Gecombineerde-probecocktail- (CPC) protocol zoals beschreven in deze bijsluiter. De analytische sensitiviteit van het CPC-protocol varieerde van 0,58 pg/ml tot 1,39 pg/ml en alle HPV-typen waren aantoonbaar bij een geschatte concentratie van 0,95 pg/ml HPV-DNA-target per 1 ml sample. De gemiddelde aantoonbare limiet voor alle 18 HPV-typen was 0,95 pg/ml met een standaarddeviatie van 0,07. Deze sensitiviteit is gelijkwaardig aan de analytische sensitiviteit die gevonden is voor de Dubbele-probe-methode van de *digene* HC2 HPV DNA Test.

GELIJKWAARDIGHEID VAN SAMPLES IN STM EN PRESERVCYT-OPLOSSING

Van ongeveer 10⁶ positieve HeLa-cellen met geïntegreerde HPV 18-genomen, toegevoegd aan STM en aan een negatieve celpool in PreservCyt-oplossing, is de gelijkwaardigheid van samples in STM en PreservCyt-oplossing onderzocht op gelijke opbrengst van HPV 18-DNA. Elk samplotype werd verwerkt volgens de bijbehorende verwerkings-/denaturatieprocedures zoals beschreven in deze gebruiksaanwijzing en getest met de *digene* HC2 HPV DNA Test met behulp van High-Risk HPV-probe. Uit de resultaten bleek dat de opbrengst aan HPV 18-DNA uit humane carcinoomcellen voor de twee media gelijk is, en dat de bereidingsprocedure met PreservCyt-oplossing niet van invloed is op de analytische sensitiviteit van de *digene* HC2 HPV DNA Test.

CORRELATIE RESULTAAT SUREPATH-SAMPLES MET STM-SAMPLES IN EEN KLINISCHE POPULATIE

Er is een tweefasig klinisch evaluatieonderzoek uitgevoerd met medewerking van 6 afdelingscentra en 3 onderzoekslocaties in de Verenigde Staten. Patiënten die in behandeling waren bij standaard klinieken, verloskundige/gynaecologische klinieken, colposcopieklinieken, algemene ziekenhuizen of

gezinsplanningscentra kwamen in aanmerking voor deelname, volgens vooraf gedefinieerde inclusie- en exclusiecriteria. Voor de haalbaarheidsfase, die was bedoeld om een geschikte cut-off-waarde vast te stellen voor de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA assay voor gebruik met SurePath-samples, werden ongeveer 400 patiënten in de studie opgenomen. De klinische valideringsfase, waarbij ongeveer 1.500 patiënten werden opgenomen om de gekozen cut-off-waarde voor de assay te valideren, begon nadat een tussentijdse analyse van de haalbaarheid had aangetoond dat een cut-off-waarde voor de assay van 1,0 RLE/CO bij gebruik van SurePath-samples een aanvaardbare overeenkomst met de resultaten van STM-samples gaf.

In beide evaluatiefasen werden bij alle deelnemers die daarmee instemden paarsgewijs SurePath- en STM-baarmoederhalsamples afgenomen. De SurePath-sample werd vervolgens voor bewerking op een objectglasje naar een cytologielaboratorium gestuurd. Na de cytologische bereiding werd de overgebleven SurePath-sample en de corresponderende STM-sample getest met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, waarbij een cut-off-waarde voor de assay van 1,0 RLE/CO werd gebruikt.

In tabel 15 wordt de correlatie weergegeven tussen de resultaten van SurePath-samples en de daarmee gepaarde STM-samples, zoals die werden geobserveerd in de voor data-analyse in aanmerking komende eindresultaten afkomstig van de gehele geïncludeerde populatie.

Tabel 15
Overeenstemming SurePath-resultaat met STM
(alle leeftijden en cytologische classificaties)
(n = 1490)

Positieve overeenstemming % 95% CI (n/N)		Negatieve overeenstemming % 95% CI (n/N)	
Alle positief	Hoge positieve subset (RLE/CO ≥ 2,5)	Alle negatief	Lage negatieve subset (RLE/CO < 0,80)
93,5 90,7, 95,6 (401/429)	96,4 94,1, 98,0 (378/392)	95,3 93,8, 96,5 (1011/1061)	96,0 94,6, 97,1 (1002/1044)

Deze resultaten voorspellen dat de relatieve sensitiviteit en specificiteit van de assay bij gebruik van SurePath samples een sterke correlatie vertonen met de resultaten die worden verkregen bij gebruik van STM-samples. Dit wordt aangetoond door de onderlimiet van het 95% betrouwbaarheidsinterval voor zowel positieve als negatieve overeenkomsten.

REPRODUCEERBAARHEID

Er is een multicenter reproduceerbaarheidsonderzoek uitgevoerd om de reproduceerbaarheid tussen dagen en tussen instellingen, en de totale reproduceerbaarheid van de *digene* HC2 HPV DNA Test te bepalen. Hierbij werd gebruikgemaakt van een panel van HPV-DNA-targets en HPV-positieve en HPV-negatieve klinische samples.

De tests werden uitgevoerd door drie externe laboratoria, met *digene* HC2 HPV DNA Test-kits van dezelfde batch. De tests werden op 3 verschillende dagen uitgevoerd met een identiek reproduceerbaarheidspanel. Het reproduceerbaarheidspanel bestond uit de volgende samples: 12 gedenatureerde klinische STM-samplepools, 3 ongedenatureerde klinische PreservCyt-oplossing samplepools, negatieve kalibrator, en positieve kalibrators Low-Risk en High-Risk in concentraties van 0,5 pg/ml, 1 pg/ml, 2,5 pg/ml, 5 pg/ml en 10 pg/ml. Alle panelcomponenten werden dagelijks in drievoud getest met behulp van zowel de High-Risk HPV-probe- als de CPC-methode. De resultaten zijn weergegeven in tabel 16.

Tabel 16
Overzicht van de totale statistieken voor
multicenter-reproduceerbaarheid van de *digene* HC2 HPV DNA Test

Statistische maatstaf	HIGH-RISK HPV-PROBE	Gecombineerde-probecocktail (CPC)	Gecombineerde resultaten van High-Risk HPV-probe en CPC^a
Aandeel verwachte positieven met een waargenomen positief resultaat	100% (99,0-100,0)	99,8% (98,92-100,0)	99,9% (99,38-100,0)
Aandeel verwachte negatieven met een waargenomen negatief resultaat	99,0% (97,49-99,73)	98,9% (96,79-99,77)	99,0% (97,88-99,58)
Overeenstemming	99,5% (98,70-99,86)	99,5% (98,70-99,86)	99,5% (99,0-99,78)
Kappa	0,990	0,989	0,990

^aGetallen tussen haakjes geven een betrouwbaarheidsinterval van 95% aan. De totale gegevens zijn een combinatie van alle runs in alle centra.

Dit geeft aan dat de reproduceerbaarheid van de *digene* HC2 HPV DNA Test met klinische samples die na afname in STM zijn gedaan zeer goed is.

KRUISREACTIVITEIT

KRUISREACTIVITEITSPANEL

Er werd een reeks bacteriën, virussen en plasmiden die gewoonlijk voorkomen in de anogenitale regio bij de vrouw onderzocht, alsook een verzameling cutaneotrope HPV-typen waarvan klonen beschikbaar waren, om te bepalen of er kruisreactiviteit optreedt met de HPV-proben die gebruikt worden in de *digene* HC2 HPV DNA Test. Alle micro-organismen werden getest in concentraties tussen de 1×10^5 en 1×10^7 organismen per ml. Gezuiverd DNA van virussen en plasmiden werd onderzocht in een concentratie van 4 ng/ml.

Hieronder volgt een lijst van de geteste bacteriën. Alle bacteriën leverden een negatief testresultaat op in de *digene* HC2 HPV DNA Test.

<i>Acinetobacter anitratus</i>	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>
<i>Acinetobacter lwoffii</i> (ATCC 17908)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (ATCC 19424)
<i>Bacteroides fragilis</i> (ATCC 25285)	<i>Neisseria lactamica</i> (NRL 2118)
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> (ATCC 13077)
<i>Candida albicans</i> (ATCC 14053 or 10231)	<i>Neisseria sicca</i> (ATCC 29256)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 21117, 8427, 33420)
<i>Escherichia coli</i> (HB101)*	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (Cowan-stam)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Streptococcus faecalis</i> (ATCC 14508)
<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC27762)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Treponema pallidum</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
<i>Mobiluncus curtisii</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
<i>Mobiluncus mulieris</i>	
<i>Mycoplasma hominis</i>	

* Zowel de *E. coli*-stam die werd gebruikt om de plasmiden in op te kweken (HB101) als een klinisch *E. coli*-isolaat werden getest.

Hieronder volgt een lijst van het geteste virale of plasmide DNA of menselijk serum:

Adenovirus 2	Humaan Papillomavirus type 1
Cytomegalovirus	Humaan Papillomavirus type 2
Epstein-Barr-virus	Humaan Papillomavirus type 3
Hepatitis B surface antigeen-positief serum	Humaan Papillomavirus type 4
Herpes Simplex I	Humaan Papillomavirus type 5
Herpes Simplex II	Humaan Papillomavirus type 8
Humaan immunodeficiëntievirus (hiv, RT-DNA)	Humaan Papillomavirus type 13
Simian-Virus type 40 (SV40)	Humaan Papillomavirus type 30
	pBR322

De enige virussen of plasmiden die in de *digene* HC2 HPV DNA Test kruisreactiviteit vertoonden waren HPV type 13 en plasmide pBR322. HPV 13-DNA reageerde alleen met de Low-Risk HPV-probe. HPV 13 wordt vaak aangetroffen in liplaesies bij bepaalde etnische groepen, maar is niet aangetroffen in de anogenitale regio.²⁹ Daarom valt niet te verwachten dat de waargenomen kruisreactiviteit tussen HPV 13 en de Low-Risk HPV-probe van de *digene* HC2 HPV DNA Test een klinisch verwarrend resultaat voor anogenitale samples zal veroorzaken. Kruisreactiviteit tussen pBR322 en de Low-Risk en High-Risk HPV-probes van de *digene* HC2 HPV DNA Test is niet onverwacht, omdat het moeilijk is om al het vector-pBR322-DNA te verwijderen bij het isoleren van het HPV-insert. De aanwezigheid van sequenties die homoloog zijn aan pBR322 is gerapporteerd bij humane genitale samples en er kunnen fout-positieve resultaten worden verkregen in aanwezigheid van hoge concentraties bacterie-plasmide. Uit 298 klinische

samples die positief testten met de Low-Risk en High-Risk HPV-probes van de *digene* HC2 HPV DNA Test bleek echter dat er geen positieve resultaten toe te schrijven waren aan pBR322 bij het testen met een pBR322-probe. De waarschijnlijkheid van een fout-positieve uitslag met de *digene* HC2 HPV DNA Test als gevolg van homologe pBR322-sequenties in klinische samples lijkt derhalve laag te zijn.

KRUIHYBRIDISATIE

Alle 18 HPV-typen werden getest met zowel Low-Risk als High-Risk HPV-probes in concentraties van 4 ng/ml HPV-DNA. Verwacht werd dat alle HPV-targets positief zouden zijn bij de betreffende probegroep, maar niet bij gebruik van de tegenovergestelde probegroep. Dit onderzoek toonde aan dat er een geringe mate van kruishybridisatie optreedt tussen de HPV-typen 6 en 42 (laagrisico-HPV-typen) en de hoogrisico-probegroep (High-Risk HPV-probe). Samples met hoge concentraties (4 ng/ml of hoger) HPV 6 of HPV 42 DNA kunnen positief zijn voor beide probegroepen. De klinische significantie hiervan is dat patiënten met 4 ng/ml of hoger aan HPV 6 of HPV 42 DNA voor een colposcopie doorverwezen kunnen worden.

Daarnaast blijkt de High-Risk HPV-probe kruisreactie te vertonen met HPV-typen 40, 53 en 66. Deze typen zijn zeldzaam en er is onvoldoende bewijs om de precieze correlatie vast te stellen tussen een infectie met deze typen en de ontwikkeling van hooggradige pathologie³⁸. Patiënten van wie de samples hoge concentraties van deze HPV DNA-typen bevatten, kunnen ten onrechte voor een colposcopie worden doorverwezen. In de literatuur is ook beschreven dat soortgelijke als in deze test gebruikte complexe probes fout-positieve resultaten kunnen opleveren als gevolg van kruishybridisatie met de HPV-typen 11, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 of MM9.³⁹ Hoewel verscheidene van deze HPV-typen zeldzame of nieuwe typen zijn die niet vaak voorkomen bij hooggradige pathologie, kunnen patiënten van wie de samples hoge concentraties van deze HPV-DNA-typen bevatten onterecht voor een colposcopie worden doorverwezen.

EFFECT VAN BLOED EN ANDERE STOFFEN OP STM-SAMPLES

Het effect van bloed en andere potentieel storende, gedefinieerde of ongedefinieerde stoffen werd in de *digene* HC2 HPV DNA Test beoordeeld. Volbloed, vaginale spray, antischimmelcrème en zaaddodende gel (middelen die vaak in cervicale samples kunnen worden aangetroffen) werden aan negatieve en positieve STM-samples (pools van klinische samples en niet-klinische samples) toegevoegd in concentraties die in cervicale samples kunnen voorkomen. Bij geen van de vier middelen in welke concentratie ook werden fout-positieve resultaten waargenomen. Bij klinische samples met een HPV-DNA-concentratie die dicht bij de positieve cut-off van de assay ligt (1 pg/ml) kan er echter een fout-negatief resultaat gemeld worden indien er hoge concentraties antischimmelcrème of zaaddodende gel aanwezig waren. Het is echter zeer onwaarschijnlijk dat een klinische sample vrijwel geheel uit een van deze stoffen zal bestaan, aangezien de cervix routinematig gereinigd wordt voordat er samples voor een cervixuitstrijkje en een HPV-test worden afgenomen.

EFFECT VAN BLOED EN ANDERE STOFFEN OP SAMPLES IN PRESERV CYT-OPLOSSING

Het effect van bloed en andere potentieel storende, gedefinieerde of ongedefinieerde stoffen die potentieel aanwezig zijn in klinische samples in PreservCyt-oplossing, werd in de *digene* HC2 HPV DNA Test beoordeeld. Volbloed, vaginale spray, antischimmelcrème en zaaddodende gel (middelen die vaak in cervicale samples kunnen worden aangetroffen) werden aan pools van negatieve en positieve klinische samples in PreservCyt-oplossing toegevoegd, in concentraties die in cervicale samples kunnen voorkomen. Bij geen van de 4 middelen in welke concentratie ook, werden fout-positieve of fout-negatieve resultaten waargenomen. Bovendien wordt de detectie van HPV-DNA door de *digene* HC2 HPV DNA Test niet geremd door stoffen die inherent in sommige klinische samples aanwezig zijn.

REPRODUCEERBAARHEID VAN DE *digene* HC2 HPV DNA TEST MET KLINISCHE SAMPLES DIE NA AFNAME IN STM ZIJN GEDAAN

De reproduceerbaarheid van de *digene* HC2 HPV DNA Test met klinische samples die na afname in STM zijn gedaan is vastgesteld in een studie met 20 klinische pools (10 positieve en 10 negatieve), die bereid zijn door vooraf gedenatureerde en geteste samples met elkaar te combineren die met een cervixborstel zijn afgenomen en na afname in STM zijn gedaan. De samples werden met 4 replica's getest, op

5 dagen, zodat er in totaal per sample 20 replica's werden getest. De test werd verricht met behulp van de gecombineerde-probecocktail-methode. De gemiddelden, de standaarddeviatie en de 95% betrouwbaarheidsintervallen rond het gemiddelde (CI's) werden voor elke sample per dag en over 5 dagen berekend en zijn weergegeven in tabel 17.

Tabel 17
Gemiddelde RLE/CO met betrouwbaarheidsintervallen en percentage positiviteit
(Afnemende volgorde volgens gemiddelde RLE/CO)

Nr.	Sample-ID	Gemiddeld RLE/CO	CI	% positief
1	10	3,18	3,02-3,35	100 (20/20)
2	20	1,43	1,36-1,50	100 (20/20)
3	11	1,25	1,20-1,28	100 (20/20)
4	12	1,21	1,15-1,27	100 (20/20)
5	15	1,20	1,14-1,25	100 (20/20)
6	13	1,07	1,01-1,11	80 (16/20)
7	16	1,06	1,01-1,09	75 (15/20)
8	17	1,04	1,00-1,06	80 (16/20)
9	14	0,98	0,92-1,02	45 (9/20)
10	18	0,92	0,87-0,96	20 (4/20)
11	19	0,72	0,68-0,75	0 (0/20)
12	7	0,40	0,33-0,46	0 (0/20)
13	4	0,38	0,35-0,39	0 (0/20)
14	9	0,37	0,32-0,41	0 (0/20)
15	1	0,35	0,32-0,36	0 (0/20)
16	2	0,35	0,31-0,37	0 (0/20)
17	8	0,32	0,29-0,34	0 (0/20)
18	3	0,30	0,27-0,31	0 (0/20)
19	6	0,27	0,24-0,30	0 (0/20)
20	5	0,26	0,23-0,28	0 (0/20)

Van de 5 samples met een gemiddelde RLE/CO van 20% of meer boven de cut-off (nr.1-5) waren 100 van 100 replica's (100,0%) positief. Van de 5 samples met een gemiddelde RLE/CO binnen 20% boven of onder de cut-off van de assay (nr. 6-10) waren 60 van 100 replica's (60%) positief en 40 van 100 (40%) negatief. Van de 10 samples met een gemiddelde RLE/CO van meer dan 20% onder de cut-off van de assay waren 200 van 200 replica's (100%) negatief.

Bijgevolg waren samples met een gemiddelde RLE/CO van 20% of meer boven de cut-off 100% van de tijd positief, terwijl samples met een gemiddelde RLE/CO van 20% of meer onder de cut-off 100% van de tijd negatief waren, wat aangeeft dat van samples die 20% of meer van de cut-off vandaan liggen kan worden verwacht dat ze consistente resultaten zullen opleveren. Samples met een testresultaat dicht bij de cut-off gaven ongeveer evenveel positieve als negatieve resultaten. Deze gegevens laten zien dat STM-samples reproduceerbare resultaten opleveren met de *digene* HC2 HPV DNA Test.

REPRODUCEERBAARHEID VAN DE *digene* HC2 HPV DNA TEST MET KLINISCHE SAMPLES DIE NA AFNAME IN PRESERVICYT-OPLOSSING ZIJN GEDAAN

De reproduceerbaarheid van de *digene* HC2 HPV DNA Test met klinische samples die na afname in PreservCyt-oplossing zijn gedaan is vastgesteld in een studie met 24 model-samples in een concentratie die een hele serie HPV DNA-concentraties omvat. De samples bestonden uit PreservCyt-oplossing en witte bloedcellen, met en zonder bacteriën die HPV 16-plasmide bevatten.

De samples werden dagelijks in replica's van 4 getest gedurende 5 dagen, wat neerkomt op een totaal van 20 replica's per sample. Op elk van de 5 dagen van de studie werd van elke sample een aliquot van 8 ml verwerkt en getest volgens de gebruiksaanwijzing van de *digene* HC2 Sample Conversion-kit ,

waarbij alleen gebruik werd gemaakt van High-Risk HPV-probe. De gemiddelden, de standaarddeviaties en 95% betrouwbaarheidsintervallen (CI's) werden voor elke sample per dag en voor alle 5 dagen en alle replica's berekend. De gemiddelde RLE/CO, het betrouwbaarheidsinterval rond het gemiddelde en het percentage positieve replica's zijn in tabel 18 voor elke sample weergegeven, in afnemende volgorde op basis van de gemiddelde RLE/CO.

Tabel 18
Gemiddelde RLE/CO met betrouwbaarheidsintervallen en percentage positiviteit
(Afnemende volgorde volgens gemiddelde RLE/CO)

Nr.	Sample- #	Gemiddeld RLE/CO	CI	% positief
1	21	3,51	3,19-3,83	100 (20/20)
2	12	1,58	1,48-1,69	100 (20/20)
3	13	1,42	1,32-1,52	100 (20/20)
4	17	1,38	1,23-1,53	100 (20/20)
5	18	1,36	1,23-1,48	90 (18/20)
6	15	1,32	1,16-1,49	95 (19/20)
7	23	1,17	1,06-1,27	85 (17/20)
8	16	1,14	1,07-1,20	75 (15/20)
9	20	1,10	0,96-1,21	75 (15/20)
10	19	1,06	0,95-1,17	85 (17/20)
11	22	1,05	0,99-1,10	45 (9/19)
12	11	1,04	0,96-1,11	70 (14/20)
13	14	0,94	0,86-1,01	65 (13/20)
14	24	0,77	0,73-0,81	25 (5/20)
15	3	0,28	0,25-0,30	0 (0/20)
16	1	0,27	0,24-0,30	0 (0/20)
17	7	0,27	0,25-0,30	0 (0/20)
18	2	0,27	0,25-0,28	0 (0/20)
19	5	0,26	0,24-0,28	0 (0/20)
20	4	0,24	0,22-0,25	0 (0/20)
21	9	0,23	0,21-0,25	0 (0/20)
22	8	0,22	0,18-0,27	0 (0/20)
23	10	0,22	0,20-0,25	0 (0/20)
24	6	0,19	0,17-0,21	0 (0/20)

Van de 6 samples met een gemiddelde RLE/CO van 20% of meer boven de cut-off (nr. 1-6) waren 114 van 120 replica's (95,0%) positief. Van de 7 samples met een gemiddelde RLE/CO binnen 20% boven of onder de cut-off van de assay (nr. 7-13) waren 88 van 139 replica's (63,3%) positief en 51 van 139 (36,7%) negatief. Van de 4 samples binnen 10% boven of onder de cut-off (nr. 10-13) waren 41 van 79 replica's (51,9%) positief en 38 (48,1%) negatief. Van de 11 samples met een gemiddelde RLE/CO van meer dan 20% onder de cut-off van de assay waren 220 van 220 replica's (100%) negatief.

Bijgevolg waren samples met een gemiddelde RLE/CO van 20% of meer boven de cut-off meer dan 95% van de tijd positief, terwijl samples met een gemiddelde RLE/CO van 20% of meer onder de cut-off 100% van de tijd negatief waren, wat aangeeft dat van samples die 20% of meer van de cut-off vandaan liggen kan worden verwacht dat ze consistente resultaten zullen opleveren. Samples met een testresultaat dicht bij de cut-off gaven ongeveer evenveel positieve als negatieve resultaten. Deze gegevens laten zien dat samples in PreservCyt-oplossing reproduceerbare resultaten opleveren met de *digene* HC2 HPV DNA Test.

REPRODUCEERBAARHEID VAN DE *digene* HC2 HIGH-RISK HPV DNA TEST MET SAMPLES DIE NA AFNAME IN SUREPATH-CONSERVEERVLOEISTOF ZIJN GEDAAN

Er zijn reproduceerbaarheidsevaluaties uitgevoerd om bij 3 verschillende laboratoria het vermogen te bepalen om gelijke diagnostische resultaten te behalen op verschillende dagen en met verschillende runs van een identieke set samples met bekende positieve/negatieve HPV-status bij gebruikmaking van een assay-cutoff van 1,0 RLE/CO. Het sample-panel voor reproduceerbaarheidsbepaling bestond uit 5 HPV-positieve samples, 2 samples met HPV-DNA-concentraties dichtbij de assay-cut-off en 5 negatieve HPV-samples.

De panel-onderdelen werden bereid door het combineren van unieke SurePath-patiënt-samples met bekende negatieve en positieve HPV-status, om de gewenste RLE/CO-doelwaarden te verkrijgen. Elk panel-onderdeel werd in elk van de drie deelnemende laboratoria in duplo getest, tweemaal per dag gedurende vijf dagen.

Tabel 19
Reproduceerbaarheidsonderzoek SurePath-samples
Kwalitatieve resultaten per panel-onderdeel

Panel-onderdeel	Gemidd. RLE/CO	Verwacht resultaat	HPV-positief n (%)	HPV-negatief n (%)
1	0,20	negatief	0 (0)	60 (100)
2	0,21	negatief	0 (0)	60 (100)
3	0,22	negatief	0 (0)	60 (100)
4	0,28	negatief	2 (3,3)	58 (96,7)
5	0,36	negatief	2 (3,3)	58 (96,7)
6	0,83	negatief	13 (21,7)	47 (78,3)
7	1,17	positief	26 (43,3)	34 (56,7)
8	19,47	positief	60 (100)	0 (0)
9	25,65	positief	60 (100)	0 (0)
10	81,52	positief	60 (100)	0 (0)
11	154,18	positief	60 (100)	0 (0)
12	765,29	positief	60 (100)	0 (0)

REPRODUCEERBAARHEID SUREPATH-RESULTAAT BIJ GEBRUIK VAN HET RAPID CAPTURE SYSTEM VOOR HET VERWERKEN VAN ASSAYS

De reproduceerbaarheid van resultaten van SurePath-samples bij gebruikmaking van het Rapid Capture System voor het verwerken van assays werd vergeleken met de resultaten die waren verkregen bij de handmatige assayverwerking. Op afzonderlijke aliquots van dezelfde verwerkte sample werden twee vergelijkende tests uitgevoerd.

Tabel 20
Intra-sample overeenkomst SurePath-resultaat met RCS
(RCS vs. handmatige assayverwerking)

Positieve overeenstemming % 95% CI (n/N)		Negatieve overeenstemming % 95% CI (n/N)	
Alle positief	Hoge positieve subset (RLE/CO \geq 2,5)	Alle negatief	Lage negatieve subset RLE/CO (<0,80)
99,0 417/421 97,6, 99,7	100 375/375 99,0, 100	97,7 1057/1079 96,9, 98,7	98,7 1050/1064 97,8, 99,28

BEPERKINGEN VAN DE PROCEDURE

Voor *in vitro* diagnostisch gebruik

Raadpleeg de *Gebruiksaanwijzing Rapid Capture System* voor meer beperkingen van de procedure die specifiek zijn voor het gebruik van dat systeem voor het testen met een hoog sampledoorvoervolume.

- De *digene* HC2 HPV DNA Test voor humaan papillomavirus typen 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 en 68 wordt niet aanbevolen voor evaluatie bij verdenking van seksueel misbruik.
- De prevalentie van een HPV-infectie in een populatie kan de werking beïnvloeden. Positieve voorspellende waarden dalen bij het testen van populaties met een lage prevalentie of personen zonder risico op infectie.
- Een negatieve uitslag sluit de mogelijkheid van een HPV-infectie niet uit, omdat een zeer lage infectiegraad of een sampling-fout een fout-negatief resultaat kan opleveren.
- De *digene* HC2 HPV DNA Test maakt onderscheid tussen 2 groepen HPV-typen: HPV 6/11/42/43/44 en 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68. Er wordt geen onderscheid gemaakt tussen de virale typen binnen deze groepen
- De *digene* HC2 HPV DNA Test kan alleen worden gebruikt met cervicale samples die zijn afgenomen met het *digene* HC2 DNA sampleafnamehulpmiddel of met biopten die na afname in STM zijn gedaan, of cervicale samples die zijn afgenomen met behulp van een cervixborstel of met een endocervicale borstel-/spatelcombinatie en vervolgens in PreservCyt-oplossing zijn gedaan, of cervicale samples die na afname in SurePath-conserveervloeistof zijn gedaan. Biopsie-samples mogen alleen worden getest als ze direct in STM worden gedaan en tot het moment van testen bij -20°C worden bewaard.
- Het *digene* HC2 DNA sampleafnamehulpmiddel mag niet worden gebruikt voor het nemen van samples bij zwangere vrouwen.
- Een infectie met HPV is geen definitieve indicator van de aanwezigheid van een hooggradige cervicale aandoening en impliceert evenmin in alle gevallen dat er een hooggradige aandoening of kanker zal ontstaan.
- Er is sprake van een geringe mate van kruishybridisatie tussen de HPV-typen 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 en MM9 en de High-Risk HPV-probe. Patiënten met samples die hoge concentraties van deze HPV-typen bevatten kunnen onterecht voor een colposcopie worden doorverwezen.³⁸
- De *digene* HC2 HPV DNA Test is bestemd voor het detecteren van laagrisico- en hoogrisico-HPV-typen, waaronder 39, 58, 59 en 68. Uit analytische onderzoeken verricht door QIAGEN, gebruikmakend van gekloneerd HPV plasmide-DNA, blijkt dat deze assay deze typen detecteert in concentraties variërend van 0,62 pg/ml tot 1,39 pg/ml. Dit komt overeen met de detectiekenmerken van de andere HPV-typen waarvoor de *digene* HC2 HPV DNA Test bestemd is. QIAGEN heeft de detectie van deze HPV-typen slechts in een beperkt aantal klinische samples kunnen valideren. Vanwege de lage prevalentie van deze typen in de algemene populatie (zoals aangetoond door Bosch et. Al³⁶), zijn de werkingseigenschappen van de *digene* HC2 HPV DNA Test voor de detectie van HPV-typen 39, 58, 59 en 68 niet statistisch bevestigd.
- Indien er tijdens de afname van een sample voor de HPV-test hoge concentraties antischimmelcrème, zaaddodende gel of vaginale spray aanwezig zijn, bestaat de mogelijkheid van een fout-negatief resultaat als deze samples zodanige concentraties HPV-DNA bevatten dat de RLE/CO-waarden dicht bij de cut-off van de assay liggen.
- Kruisreactiviteit tussen zowel de *digene* HC2 HPV DNA Test-probe als het plasmide-pBR322 kan voorkomen. De aanwezigheid van sequenties die homoloog zijn aan pBR322 is gerapporteerd bij humane genitale samples en er kunnen fout-positieve resultaten worden verkregen in aanwezigheid van hoge concentraties bacterie-plasmide.

REFERENTIES

1. Broker, T. R.; Botchan, M. Papillomaviruses: retrospectives and prospectives. In: *DNA Tumor Viruses*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1986: 17-36. Van de 1985 Cancer Cells Conference in Cold Spring Harbor.
2. Lorincz, A. T.; Reid, R. Association of human papillomavirus with gynecologic cancer. *Current Opinion in Oncology* 1:123-132; 1989.
3. Jenson, A. B.; Kurman, R. J.; Lancaster, W. D. Human papillomaviruses. In: Belshe, R. B. *Textbook of Human Virology*. Littleton, MA: PSG-Wright; 1984: 951-968.
4. Becker, T. M.; Stone, K. M.; Alexander, E. R. Genital human papillomavirus infection: a growing concern. *Obstet Gynecol Clin North Am* 14(2):389-396; 1987.
5. McCance, D. J.; Walker, P. G.; Dyson, J. L.; Coleman, D. V.; Singer, A. Presence of human papillomavirus DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia. *Br Med J* 287:784-788; 1983.
6. Naghashfar, Z.; Sawada, E.; Kutcher, M. J.; Swancar, J.; Gupta, J.; Daniel, R.; Kashima, H.; Woodruff, J. D.; Shah, K. Identification of genital tract papillomaviruses HPV-6 and HPV-16 in warts of the oral cavity. *J Med Virol* 17:313-324; 1985.
7. Gissmann, L.; Wolnik, L.; Ikenberg, H.; Koldovsky, U.; Schnurch, H. G.; zur Hausen, H. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *PNAS USA* 80:560-563; 1983.
8. Munoz, N.; Bosch, F. X.; Shah, K. V.; Meheus, A., Eds. *The Epidemiology of Cervical Cancer and Human Papillomavirus*. Lyon, Frankrijk: International Agency for Research on Cancer; 1992. IARC Scientific Publication No. 119.
9. Reid, R.; Greenberg, M.; Jenson, A. B.; Husain, M.; Willett, J.; Daoud, Y.; Temple, G.; Stanhope, C. R.; Sherman, A. I.; Phibbs, G. D.; Lorincz, A. T. Sexually transmitted papillomaviral infections. I. The anatomic distribution and pathologic grade of neoplastic lesions associated with different viral types. *Am J Obstet Gynecol* 156(1):212-222; 1987.
10. Fuchs, P. G.; Girardi, F.; Pfister, H. Human papillomavirus DNA in normal, metaplastic, preneoplastic and neoplastic epithelia of the cervix uteri. *Int J Cancer* 41:41-45; 1988.
11. Lorincz, A. T.; Temple, G. F.; Kurman, R. J.; Jenson, A. B.; Lancaster, W. D. Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. *JNCI* 79(4):671-677; 1987.
12. Lorincz, A. T.; Lancaster, W. D.; Temple, G. F. Cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus from a woman with dysplasia of the uterine cervix. *J Virol* 58(1):225-229; 1986.
13. Beaudenon, S.; Kremsdorf, D.; Croissant, O.; Jablonska, S.; Wain-Hobson, S.; Orth, G. A novel type of human papillomavirus associated with genital neoplasias. *Nature* 321:246-249; 1986.
14. Lorincz, A. T.; Quinn, A. P.; Lancaster, W. D.; Temple, G. F. A new type of papillomavirus associated with cancer of the uterine cervix. *Virology* 159:187-190; 1987.
15. Naghashfar, Z. S.; Rosenshein, N. B.; Lorincz, A. T.; Buscema, J.; Shah, K. V. Characterization of human papillomavirus type 45, a new type 18-related virus of the genital tract. *J gen Virol* 68:3073-3079; 1987.
16. Nuovo, G. J.; Crum, C. P.; de Villiers, E. M.; Levine, R. U.; Silverstein, S. J. Isolation of a novel human papillomavirus (type 51) from a cervical condyloma. *J Virol* 62(4):1452-1455; 1988.
17. Shimoda, K.; Lorincz, A. T.; Temple, G. F.; Lancaster, W. D. Human papillomavirus type 52: a new virus associated with cervical neoplasia. *J gen Virol* 69:2925-2928; 1988.
18. Lorincz, A. T.; Quinn, A. P.; Goldsborough, M. D.; McAllister, P.; Temple, G. F. Human papillomavirus type 56: a new virus detected in cervical cancers. *J gen Virol* 70:3099-3104; 1989.

19. Lorincz, A. T.; Quinn, A. P.; Goldsborough, M. D.; Schmidt, B. J.; Temple, G. F. Cloning and partial DNA sequencing of two new human papillomavirus types associated with condylomas and low-grade cervical neoplasia. *J Virol* 63(6):2829-2834; 1989.
20. Beaudenon, S.; Kremsdorf, D.; Obalek, S.; Jablonska, S.; Pehau-Arnaudet, G.; Croissant, O.; Orth, G. Plurality of genital human papillomaviruses: characterization of two new types with distinct biological properties. *Virology* 161:374-384; 1987.
21. Lorincz, A. T.; Reid, R.; Jenson, A. B.; Greenberg, M. D.; Lancaster, W.; Kurman, R. J. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 79:328-337; 1992.
22. Koutsky, L. A.; Holmes, K. K.; Critchlow, C. W.; Stevens, C. E.; Paavonen, J.; Beckmann, A. M.; DeRouen, T. A.; Galloway, D. A.; Vernon, D.; Kiviat, N. B. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 327:1272-1278; 1992.
23. Nieminen, P.; Aho, M.; Vesterinen, E.; Stellato, G.; Vaheri, A.; Soares, V. R. X.; Paavonen, J. Natural history of HPV infection: preliminary results of a cohort study [abstract]. In: 1991 Papillomavirus Workshop. Seattle, WA: 1991: 77.
24. Schulster, L. M.; Hollinger, F. B.; Dreesman, G. R.; Melnick, J. L. Immunological and biophysical alteration of hepatitis B virus antigens by sodium hypochlorite disinfection. *Appl Envir Microbiol* 42(5):762-767; 1981.
25. Spire, B.; Barré-Sinoussi, F.; Montagnier, L.; Chermann, J. C. Inactivation of lymphadenopathy associated virus by chemical disinfectants. *Lancet*; 1984 October 20: pp. 899-901.
26. Martin, L. S.; McDougal, J. S.; Loskoski, S. L. Disinfection and inactivation of the human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus. *J Infect Dis* 152(2):400-403; 1985.
27. Lorincz, A. T.; Schiffman, M. H.; Jaffurs, W. J.; Marlow, J.; Quinn, A. P.; Temple, G. F. Temporal associations of human papillomavirus infection with cervical cytologic abnormalities. *Am J Obstet Gynecol* 162(3):645-651; 1990.
28. Morrison, E. A. B.; Ho, G. Y. F.; Vermund, S. H.; Goldberg, G. L.; Kadish, A. S.; Kelley, K. F.; Burk, R. D. Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasia: a case-control study. *Int J Cancer* 49:6-13; 1991.
29. Pfister, H.; Hettich, I.; Runne, U.; Gissmann, L.; Chilf, G. N. Characterization of human papillomavirus type 13 from focal epithelial hyperplasia Heck lesions. *J Virol* 47:363-366; 1983.
30. Kahn, T.; Schwarz, E.; zur Hausen, H. Molecular cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus (HPV 30) from a laryngeal carcinoma. *Int J Cancer* 51:61-65; 1986.
31. Schiffman, M. Latest HPV findings: some clinical implications. *Cont. OB/GYN* 38(10):27-40; 1993.
32. Volpers, C.; Streeck, R. E. Genome organization and nucleotide sequence of human papillomavirus type 39. *Virology* 181:419-423; 1991.
33. Matsukura, T.; Sugase, M. Molecular cloning of a novel human papillomavirus (type 58) from an invasive cervical carcinoma. *Virology* 177:833-836; 1990.
34. Rho, J.; Roy-Burman, A.; Kim, H.; de Villiers, E.M.; Matsukura, T.; Choe, J. Nucleotide sequence and phylogenetic classification of human papillomavirus type 59. *Virology* 203:158-161; 1994.
35. Longuet, M.; Beaudenon, S.; Orth, G. Two novel genital human papillomavirus (HPV) types, HPV68 and HPV70, related to the potentially oncogenic HPV39. *J Clin Microbiol* 34(3):738-744; 1996.
36. Bosch, F.X.; Manos, M.M.; Munoz, N.; Sherman, M.; Jansen, A.M.; Peto, J.; Schiffman, M.H.; Moreno, V.; Kurman, R.; Shah, K.V.; International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *JNCI* 87(11):796-802; 1995.

37. Wheeler, C.M.; Stewart, A.M.; Gravitt, P.E.; Cheng, S. Generation of entire human papillomavirus genomes by long PCR: frequency of errors produced during amplification. *Genome Research* 5(1):79-88; 1995.
38. Meyer, T., et. al., Association of Rare Human Papillomavirus Types with Genital Premalignant and Malignant Lesions, *J. Infectious Diseases*, 178:252-255 (1998).
39. Vernon, S. D.; Unger, E. R.;and Williams, D.; Comparison of Human Papillomavirus Detection and Typing by Cycle Sequencing, Line Blotting, and Hybrid Capture, *JCM*, Feb. 2000, p. 651-655.
40. European Guidelines for the Quality Assurance in Cervical Screening. *The European Journal of Cancer*, ISSN 0944-1947, 29.A supp. 4; 1993
41. RD Burke, P Kelly, J Feldman, et. al., Declining Prevalence of Cervicovaginal Human Papillomavirus Infection With Age Is Independent of Other Risk Factors, *Sexually Transmitted Diseases*, July-August, 1996:333-341).
42. CDC. Recommendations for Prevention of HIV Transmission in Health-Care Settings. *MMWR* 1987;36(2S):3S-18S.
43. Schulster L.M., Hollinger F.B., Dreesman G.R., et al. Immunological and Biophysical Alteration of Hepatitis B Virus Antigens by Sodium Hypochlorite Disinfection. *Appl Envir Microbiol* 1981;42(5):762-7.

OPLOSSEN VAN PROBLEMEN

Waarneming	Waarschijnlijke oorzaken	Oplossingen
<p>Onjuiste of geen kleurverandering waargenomen tijdens denaturatie.</p>	<p>Denaturatiereagens niet goed bereid of</p> <p>Geen denaturatiereagens toegevoegd</p> <p>Sample bevat bloed of andere materialen die de kleurverandering maskeren.</p> <p>De pH van de sample kan ongewoon laag zijn.</p>	<p>Controleer of het denaturatiereagens indicatorkleurstof bevat en een donkerpaarse kleur heeft.</p> <p>Controleer of er denaturatiereagens aan de sample is toegevoegd door het samplevolume te meten (verwacht volume is 1,5 ml). Als uit het volume blijkt dat geen denaturatiereagens is toegevoegd, voeg dan de juiste hoeveelheid toe, meng en ga door met de assay als de juiste kleurverandering vervolgens wordt waargenomen.</p> <p>De exacte kleurverandering die is beschreven, wordt niet verwacht bij deze sampletypes; de resultaten van de <i>digene</i> HC2 HPV DNA Test zouden hierdoor niet negatief mogen worden beïnvloed.</p> <p>Als geen van de andere oorzaken van toepassing is, kan de sample ongewoon zuur zijn waardoor de verwachte kleurverandering niet zal optreden. Neem een nieuwe sample af vóór het aanbrengen van azijnzuur op de cervix, omdat een onjuiste pH van de sample de testresultaten negatief zal beïnvloeden.</p>
<p>Kwaliteitscontroles leveren verkeerde resultaten op</p>	<p>Verkeerd softwareprotocol gekozen voor de test (d.w.z. CPC-protocol gebruikt voor dubbele methode)</p> <p>Keer de plaatsing van QC1-LR en QC2-HR om</p> <p>Omgekeerde plaatsing van de LRC en de QC1-LR en/of van de HRC en de QC1-HR.</p>	<p>Als het softwareprotocol verkeerd is voor de test die verricht wordt, dient de plaat binnen 30 minuten na de toevoeging van detectiereagens 2 opnieuw te worden gemeten met het juiste protocol.</p> <p>Test de samples opnieuw.</p> <p>Test de samples opnieuw.</p>
<p>Onjuiste kleurverandering waargenomen tijdens hybridisatie.</p>	<p>Ontoereikende menging van probemix met gedenatureerde kalibrators, controles en/of samples; of geen probemix toegevoegd; of verkeerd volume reagens toegevoegd.</p> <p>Sample bevat bloed of andere materialen die de kleurverandering maskeren.</p> <p>Sample had <1000 µl STM.</p>	<p>Schud de hybridisatie-microtiterplaat of het rek met microbuisjes nog eens 2 minuten. Als er wells zijn die nog altijd paars zijn, voeg dan nog eens 25 µl van de juiste probemix toe en meng goed. Als de juiste kleurverandering niet optreedt na de toevoeging van de probe en opnieuw mengen en de sample geen bloed of andere materialen bevat, moet de sample opnieuw worden getest.</p> <p>De exacte kleurverandering die is beschreven, wordt niet verwacht bij deze sampletypes; de resultaten van de <i>digene</i> HC2 HPV DNA Test zouden hierdoor niet negatief mogen worden beïnvloed.</p> <p>Controleer het volume van de originele sample. Het volume moet 1350 µl ±20 µl zijn (na verwijdering van 75 µl voor Low-Risk en High-Risk HPV-probes). Als het volume <1350 µl is, bevatte de originele sample <1000 µl STM. Neem een nieuwe sample af.</p>

Waarneming	Waarschijnlijke oorzaken	Oplossingen
<p>Assay voldoet niet aan validatiecriteria. Geen signaal waargenomen bij kalibrator, kwaliteitscontroles of bij de samples.</p>	<p>Geen probe toegevoegd aan probe-verdunningsmiddel.</p> <p>Probe gecontamineerd met RNase tijdens de bereiding.</p> <p>Ontoereikende menging van probe en probe-verdunningsmiddel.</p> <p>Ontoereikende menging van verdunde probe en gedenatureerde sample.</p> <p>Verkeerde tijd of temperatuur tijdens de hybridisatiestap.</p> <p>Ontoereikende menging tijdens de capture-stap.</p> <p>Probes/probemengsels/hybridisatiebuizen verwisseld.</p> <p>Niet de juiste hoeveelheid detectiereagens 1 toegevoegd of niet gedurende de voorgeschreven tijd geïncubeerd.</p> <p>Niet de juiste hoeveelheid detectiereagens 2 toegevoegd of niet gedurende de voorgeschreven tijd geïncubeerd.</p> <p>Storing van luminometer of verkeerde programmering.</p>	<p>Bereid probemix volgens de beschrijving in deze gebruiksaanwijzing. Label de buisjes zorgvuldig.</p> <p>Gebruik pipetpunten met een aërosolfilter om de probe te pipetteren en draag handschoenen. Gebruik alleen schone, nieuwe wegwerpreagensreservoirs.</p> <p>Na toevoeging van de probe aan het probe-verdunningsmiddel moet u zeer grondig mengen door bij hoge snelheid gedurende minstens 5 seconden te vortexen. Er moet een zichtbare werveling ontstaan.</p> <p>Schud na toevoeging van probemix en sample aan elke hybridisatie-microtiterplaatwell of aan elk microbuisje gedurende 3 ± 2 minuten op de Rotary Shaker I bij 1.100 ± 100 rpm. Controleer of de kleur in elk buisje / microtiterplaatwell van paars in geel verandert.</p> <p>Hybridiseer gedurende 60 ± 5 minuten bij 65 ± 2 °C. Controleer de temperatuur van Microplate Heater I of waterbad. Zorg dat de Microplate Heater I of het waterbad is ingesteld om de samples op de juiste temperatuur te verwarmen en vóór gebruik gedurende 60 minuten is voorverwarmd. Zorg dat het waterniveau voldoende hoog is om de samples op de juiste temperatuur te verwarmen. Waterbaden moeten periodiek worden gekalibreerd.</p> <p>Schud gedurende 60 ± 5 minuten bij 20-25°C op de Rotary Shaker I, volgens de beschrijving in deze gebruiksaanwijzing. Controleer de snelheid van de Rotary Shaker I door te kalibreren, zoals beschreven in het hoofdstuk Kalibratie shaker-snelheid van de <i>Gebruikershandleiding Rotary Shaker I</i>.</p> <p>Bereid probemixen zorgvuldig en label de buizen met probemix overeenkomstig. Let erop dat de juiste probe aan de juiste set hybridisatiebuizen wordt toegevoegd. Label buizen met probemix, hybridisatiebuizen en/of rekken om de mogelijkheid van verwisseling te minimaliseren.</p> <p>Pipetteer 75 µl detectiereagens 1 in elke well met behulp van een 8-kanaalspipet. Incubeer gedurende 30-45 minuten bij 20-25°C.</p> <p>Pipetteer 75 µl detectiereagens 2 in elke well met behulp van een 8-kanaalspipet. Incubeer gedurende 15 tot 30 minuten bij 20-25°C.</p> <p>Raadpleeg de betreffende gebruikershandleiding voor verdere instructies of bel uw plaatselijke QIAGEN vertegenwoordiger.</p>

Waarneming	Waarschijnlijke oorzaken	Oplossingen
<p>Verhoogde RLE-waarden voor kalibrators, kwaliteitscontroles en/of samples (≥ 200 RLE's in veel of alle wells). Assay voldoet mogelijk niet aan validatiecriteria.</p>	<p>Geen denaturatiereagens toegevoegd of verkeerd volume reagens toegevoegd of ontoereikende menging van denaturatiereagens met samples of kalibrators.</p> <p>Er lekt licht in de luminometer. Deur niet verzegeld. Verzegeling rond deur kapot.</p> <p>Contaminatie van detectiereagens 2 of capture-microtiterplaatwells met detectiereagens 1 of exogene alkalische fosfatase.</p> <p>Wasbuffer verontreinigd.</p> <p>Automated Plate Washer verontreinigd</p> <p>Ontoereikende wasbeurt van capture-microtiterplaatwells na incubatie van detectiereagens 1.</p> <p>Contaminatie van de microtiterplaatwells met detectiereagens 1.</p> <p>Afvoelen van hybridisatieoplossing op hetzelfde deel van Kimtowels-doekjes of gelijkwaardig pluisvrije papieren doekjes.</p> <p>Verkeerd vloeipapier gebruikt.</p>	<p>Controleer of de repetierpipet nauwkeurig het juiste volume afgeeft voordat u denaturatiereagens toevoegt. Gekalibreerde pipetten zijn essentieel. Voeg een half volume denaturatiereagens toe aan elke buis en meng goed. Controleer of de vloeistof de gehele binnenkant van de buis wast om fout-positieve resultaten te voorkomen. Kalibrators, kwaliteitscontroles en samples moeten paars worden na toevoeging van het denaturatiereagens.</p> <p>Controleer de achtergrondmeting van de luminometer door een lege microtiterplaat te meten. Een meting van meer dan 50 RLE's geeft aan dat er sprake is van een lichtlek. Raadpleeg de betreffende gebruikershandleiding voor verdere instructies of bel uw plaatselijke QIAGEN vertegenwoordiger.</p> <p>Raadpleeg 'Contaminatiecontrole' in dit hoofdstuk 'Problemen oplossen'.</p> <p>Raadpleeg 'Contaminatiecontrole' in dit hoofdstuk 'Problemen oplossen'.</p> <p>Raadpleeg 'Contaminatiecontrole' in dit hoofdstuk 'Problemen oplossen'.</p> <p>Was de microtiterplaatwells 6 keer grondig met wasbuffer, waarbij u de wells telkens laat overlopen of gebruik daarvoor de Automated Plate Washer. Na het wassen mag er geen roze vloeistof in de wells van de microtiterplaat achterblijven. Zie de <i>Gebruikershandleiding Automated Plate Washer</i> voor instructies over het testen op contaminatie of het vaststellen van storingen.</p> <p>Zorg dat alle werkoppervlakken schoon en droog zijn. Wees voorzichtig als u met detectiereagens 1 werkt. Vermijd aërosolvorming.</p> <p>Niet opnieuw afvoelen op reeds gebruikte delen van Kimtowels-doekjes of gelijkwaardige pluisvrije papieren doekjes.</p> <p>Gebruik Kimtowels-doekjes of gelijkwaardige pluisvrije papieren doekjes voor het afvoelen.</p>
<p>Lage PC/NC-verhoudingen of hoog aantal laag-positieve samples met een verhouding $< 2,0$ ($> 20\%$). Assay voldoet mogelijk niet aan validatiecriteria.</p>	<p>Ontoereikende samplebereiding.</p> <p>Probe verkeerd gemengd of onvoldoende probe aan assays toegevoegd.</p> <p>Ontoereikend volume verdunde probe toegevoegd aan elke hybridisatiemicrobuis.</p> <p>Verlies van activiteit van detectiereagens 1.</p> <p>Onvoldoende capture.</p> <p>Wassen onvoldoende.</p> <p>Wasbuffer verontreinigd.</p>	<p>Voeg het juiste volume denaturatiereagens toe en meng grondig door te vortexen. Controleer of de vloeistof de gehele binnenkant van de buis wast om fout-positieve resultaten te voorkomen. Bij samples in PreservCyt-oplossing moet u zorgen voor een goede menging en moet het resuspendieren van de celpellet voltooid zijn voordat de denaturatie-incubatie plaatsvindt. Raadpleeg de gebruiksaanwijzing bij de <i>digene</i> HC2 Sample Conversion Kit voor meer informatie over het protocol. Er moet een duidelijke kleurverandering van helder tot donkerpaars zichtbaar zijn. Incubeer gedurende 45 ± 5 minuten bij een temperatuur van $65 \pm 2^\circ\text{C}$.</p> <p>Bereid probemengsels volgens de beschrijving. Meng grondig door te vortexen en controleer of er een zichtbare werveling ontstaat. Probemixen moeten met een positive-displacement-pipet of met een meerkanaalspipet aan de buisjes worden toegevoegd voor een nauwkeurige afgifte.</p> <p>Controleer of de 8-kanaalspipet nauwkeurig het juiste volume afgeeft voordat u de probemix aan de hybridisatie-microtiterplaat of microbuisjes toevoegt. Voeg 25 μl probemix toe aan elke microtiterplaatwell of microbuis die gedenuceerde kalibrators, kwaliteitscontroles en klinische samples bevat. Controleer of de 8-kanaalspipet nauwkeurig het juiste volume afgeeft voordat u de probemix aan de hybridisatie-microtiterplaatwells toevoegt. De kleur dient na toevoeging en grondige menging van de probemix te veranderen van donkerpaars in geel. Samples in PreservCyt-oplossing moeten roze kleuren in plaats van geel.</p> <p>Bewaar detectiereagens 1 bij $2-8^\circ\text{C}$. Gebruiken voordat de houdbaarheidsdatum op het label op de buitenverpakking van de kit is verstreken.</p> <p>De capture-stap moet worden verricht met behulp van de Rotary Shaker I bij 1100 ± 100 tpm. Controleer de schudsnelheid van het apparaat door te kalibreren.</p> <p>Was de microtiterplaatwells 6 keer grondig met wasbuffer, waarbij u de wells telkens laat overlopen of gebruik daarvoor de Automated Plate Washer.</p> <p>Raadpleeg 'Contaminatiecontrole' in dit hoofdstuk 'Problemen oplossen'.</p>

Waarneming	Waarschijnlijke oorzaken	Oplossingen
<p>Reeksen positieve samples met ongeveer dezelfde RLE-waarden.</p>	<p>Contaminatie van capture-microtiterplaatwells tijdens de assaybewerkingen.</p> <p>Contaminatie van detectiereagens 2.</p> <p>Storing in de Automated Plate Washer.</p>	<p>Dek de capture-microtiterplaat tijdens alle incubaties af. Vermijd blootstelling van de buisjes aan aerosolcontaminatie tijdens het uitvoeren van de assay. Gebruik poedervrije handschoenen tijdens bewerkingen.</p> <p>Zorg dat het materiaal niet wordt gecontamineerd wanneer u detectiereagens 2 in de capture-microtiterplaatwells pipetteert. Vermijd contaminatie van detectiereagens 2 met aerosolen uit detectiereagens 1 of met laboratoriumstof, enz.</p> <p>Zie de <i>Gebruikershandleiding Automated Plate Washer</i> voor instructies over het testen op contaminatie of het vaststellen van storingen.</p>
<p>Brede %VC's tussen replica's.</p>	<p>Onnauwkeurige pipettering.</p> <p>Ontoereikende menging.</p> <p>Onvolledige overdracht van vloeistof vanuit de hybridisatie-microbuizen naar de capture-microtiterplaatwells.</p> <p>Verkeerde wasomstandigheden.</p> <p>Contaminatie van de microtiterplaatwells met detectiereagens 1.</p>	<p>Controleer de pipet om u ervan te verzekeren dat er reproduceerbare volumes worden afgegeven. Kalibreer de pipetten regelmatig.</p> <p>Meng in alle fasen grondig. Vortex voorafgaande aan de denaturatie-incubatie en na toevoeging van probemix. Controleer of er een zichtbare werveling ontstaat.</p> <p>Let op tijdens de overdracht vanuit de hybridisatie-microtiterplaatwells of microbuizen naar de capture-microtiterplaatwells om er zeker van te zijn dat er reproduceerbare volumes worden overgebracht.</p> <p>Was de microtiterplaatwells 6 keer grondig met wasbuffer, waarbij u de wells telkens laat overlopen of gebruik daarvoor de Automated Plate Washer met de passende protocollen.</p> <p>Zorg dat alle werkoppervlakken schoon en droog zijn. Wees voorzichtig als u met detectiereagens 1 werkt. Vermijd aerosolvorming.</p>
<p>Fout-positieve resultaten verkregen van samples waarvan bekend is dat ze negatief zijn.</p>	<p>Detectiereagens 2 gecontamineerd.</p> <p>Contaminatie van de microtiterplaatwells met detectiereagens 1.</p> <p>Meerdere rijen afgevoeld op hetzelfde gedeelte van Kimtowels-doekjes of gelijkwaardige pluisvrije papieren doekjes.</p> <p>Ontoereikende samplebereiding.</p> <p>Verkeerde wasomstandigheden.</p> <p>Met ongedenatureerd materiaal gecontamineerde pipetpunt tijdens overdracht van gedenatureerde sample naar de microbuis of de microtiterplaatwell die voor hybridisatie van de HPV-probe wordt gebruikt.</p>	<p>Zorg dat er geen kruisbesmetting van de samples kan optreden bij het toevoegen van detectiereagens 2 aan de samples. Als u slechts een gedeelte van een kit gebruikt, moet u het vereiste volume voor die assay naar een schoon wegwerpreagensreservoir overbrengen voordat u de pipet vult.</p> <p>Was de microtiterplaatwells 6 keer grondig met wasbuffer, waarbij u de wells telkens laat overlopen, of gebruik daarvoor de Automated Plate Washer. Na het wassen mag er geen roze vloeistof in de wells van de microtiterplaat achterblijven.</p> <p>Niet afvloeien op een gedeelte dat reeds gebruikt is, aangezien dit tot contaminatie kan leiden.</p> <p>Voeg het juiste volume denaturatiereagens toe en meng grondig door te vortexen. Zorg ervoor dat de vloeistof de gehele binnenkant van de buis wast om fout-positieve resultaten te voorkomen. Gebruik hiervoor ofwel de handmatige methode of de MST Vortexer 2-methode (voor de handmatige vortexer-methode keert u de buis eenmaal om). Bij samples in PreservCyt-oplossing moet u zorgen voor een goede menging en moet het resuspendieren van de celpellet voltooid zijn voordat de denaturatie-incubatie plaatsvindt. Raadpleeg de gebruiksaanwijzing bij de <i>digene</i> HC2 Sample Conversion Kit voor meer informatie over het protocol. Bij alle samples moet er een duidelijke kleurverandering naar donkerpaars te zien zijn. Incubeer 45 ± 5 minuten bij $65 \pm 2^\circ\text{C}$. SurePath-samples moeten gedurende 90 ± 5 minuten bij $65 \pm 2^\circ\text{C}$ worden geïncubeerd.</p> <p>Was de microtiterplaatwells 6 keer grondig met wasbuffer, waarbij u de wells telkens laat overlopen, of gebruik daarvoor de Automated Plate Washer met de passende protocollen.</p> <p>De denaturatiestap bij de sampleverwerkingsprocedure dient volgens de instructies in deze gebruiksaanwijzing uitgevoerd te worden. Onjuist vortexen van een sample, verkeerd omkeren en schudden van de buis kunnen leiden tot onvolledige denaturatie van niet-specifieke RNA:DNA-hybriden uit cervicale samples. Met name bij samples in PreservCyt-oplossing of SurePath-conserveervloeistof is de kans groot dat dergelijke hybriden zich aan de binnenzijde van de denaturatiebuis voor de sample bevinden. Om mogelijke carry-over van dit ongedenatureerde celmateriaal te voorkomen mag de micropipetpunt de zijken van de denaturatiebuis van de sample niet raken tijdens de overdracht van de gedenatureerde sample naar de microbuis of microtiterplaatwell die voor de hybridisatie van de HPV-probe wordt gebruikt.</p>

Waarneming	Waarschijnlijke oorzaken	Oplossingen
Verhoogde RLE-waarden van de negatieve kalibrator (> 200 RLE's). Rest van assay verloopt volgens verwachting.	<p>Detectiereagens 2 was bij een hogere temperatuur dan 20-25°C geïncubeerd.</p> <p>Detectiereagens 2 was langer dan 30 minuten geïncubeerd.</p> <p>Detectiereagens 2 of wasbuffer was gecontamineerd met alkalische fosfatase of detectiereagens 1.</p>	<p>Voer de test opnieuw uit en zorg dat in de capturing- en detectiefasen bij een temperatuur van 20-25°C geïncubeerd wordt.</p> <p>Lees de plaat na 15 minuten incubatie (en niet later dan 30 minuten incubatie) bij 20-25°C opnieuw af.</p> <p>Raadpleeg 'Contaminatiecontrole' in dit hoofdstuk 'Problemen oplossen'.</p>
Assay voldoet niet aan validatiecriteria. Verhoogde PC/NC-verhouding.	Omgekeerde plaatsing van de HRC en de QC2-HR en/of van de LRC en de QC1-LR	Test de samples opnieuw. Lees de etiketten van de kalibrator- en kwaliteitscontroleflacons zorgvuldig om te voorkomen dat deze reagentia in verkeerde volgorde worden geplaatst.

CONTAMINATIECONTROLE

Beoordeeld reagens	Procedure contaminatiecontrole	Interpretatie van de resultaten
Opmerking: Ga bij het pipetteren van detectiereagens 2 voorzichtig te werk om contaminatie te voorkomen. Draag handschoenen en vermijd aanraking van werkoppervlakken met de pipetpunten.		
Detectiereagens 2	<ul style="list-style-type: none"> Pipetteer 75 µl uit de uitverdeelde, aangebroken en/of nieuwe flacon detectiereagens 2 in een lege capture-microtiterplaatwell. Incubeer 15 minuten bij 20-25°C. Vermijd direct zonlicht. Lees de microtiterplaatwells in de luminometer in. <p>Opmerking: Analyse van detectiereagens 2 in 3 replicaten levert een optimale werkingsbeoordeling op.</p>	<ul style="list-style-type: none"> De controle van detectiereagens 2 moet <50 RLE's zijn. Als de waarden van detectiereagens 2 <50 RLE's zijn, kan de assay met detectiereagens 2 worden herhaald. Neem bij contaminatie (>50 RLE's) een nieuwe kit in gebruik en herhaal de assay.
Wasbuffer-apparaat en/of waterbron	<ul style="list-style-type: none"> Pipetteer 75 µl detectiereagens 2 in 4 afzonderlijke capture-microtiterplaatwells. Nummer wells van 1-4. Well 1 dient als controle voor detectiereagens 2. Pipetteer 10 µl wasbuffer uit de wasfles in well 2. Laat wasbuffer door de wasleidingen stromen. Pipetteer 10 µl wasbuffer uit de leidingen in well 3. Neem een sample van het water dat is gebruikt om de wasbuffer te bereiden. Pipetteer 10 µl van het water in well 4. Incubeer 15 minuten bij 20-25°C. Vermijd direct zonlicht. Lees de microtiterplaatwells in de luminometer in. 	<ul style="list-style-type: none"> De controle van detectiereagens 2 (well 1) moet <50 RLE's zijn. Vergelijk de RLE-waarde van de wells 2, 3 en 4 met de RLE-waarde van de detectiereagens 2-controle (well 1). De afzonderlijke RLE-waarden van de wells 2, 3 en 4 mogen niet hoger zijn dan de 50 RLE's van de detectiereagens 2-controle (well 1). Overschrijding van de waarde van 50 RLE's van de detectiereagens 2-controle is een teken van contaminatie. Zie Voorbereiden en bewaren van reagentia voor instructies voor reiniging en onderhoud van het wasapparaat.
Automated Plate Washer	<ul style="list-style-type: none"> Pipetteer 75 µl detectiereagens 2 in 5 afzonderlijke capture-microtiterplaatwells. Nummer wells van 1-5. Well 1 dient als controle voor detectiereagens 2. Pipetteer 10 µl wasbuffer uit de fles van de Plate Washer met het etiket <i>Wash</i> in well 2. Pipetteer 10 µl spoelvloeistof uit de fles van de Plate Washer met het etiket <i>Rinse</i> in well 3. Druk op de toets Prime (Primen) op het toetsenpaneel van de Plate Washer, zodat er wasbuffer door de leidingen stroomt. Pipetteer 10 µl wasbuffer uit de bak in well 4. Druk op de toets Rinse (Spoelen) op het toetsenpaneel van de Plate Washer, zodat er spoelvloeistof door de leidingen stroomt. Pipetteer 10 µl wasbuffer uit de bak in well 5. Dek de plaat af en incubeer 15 minuten bij 20-25°C. Vermijd direct zonlicht. Lees de microtiterplaatwells in de luminometer in. 	<ul style="list-style-type: none"> De controle van detectiereagens 2 (well 1) moet <50 RLE's zijn. Vergelijk de RLE-waarde van de wells 2, 3, 4 en 5 met de RLE-waarde van de detectiereagens 2-controle (well 1). De afzonderlijke RLE-waarden van de wells 2, 3, 4 en 5 mogen niet hoger zijn dan de 50 RLE's van de detectiereagens 2-controle (well 1). Waarden die meer dan 50 RLE's hoger zijn dan de DR2-controle geven contaminatie van de Plate Washer aan. Zie de <i>Gebruikershandleiding Automated Plate Washer</i> voor de decontaminatieprocedure.

QIAGEN CONTACTINFORMATIE

Gebruik het bij dit product geleverde contact-informatieblad om contact op te nemen met uw plaatselijke vertegenwoordiger van QIAGEN.

Handelsmerken: QIAGEN®, *digene*®, Hybrid Capture®, Rapid Capture® (QIAGEN Group); CDP-Star® (Tropix, Inc.); Corning® (Corning Incorporated); DuraSeal™ (Diversified Biotech); Eppendorf®, Repeater® (Eppendorf AG); Excel®, Microsoft® (Microsoft Corporation); Kimtowels® (Kimberly-Clark Corporation); Parafilm® (BEMIS Company, Inc.); PrepStain®, SurePath® (Becton, Dickinson and Company); PreservCyt®, ThinPrep® (Hologic, Inc.); VWR® (VWR International, Inc.).

Gedeponeerde namen, handelsmerken, etc. die in dit document worden gebruikt, ook al zijn deze niet specifiek als zodanig aangeduid, mogen niet worden beschouwd als zijnde niet wettelijk beschermd.

Dit product en de bijbehorende methoden van gebruik zijn beschermd door een of meer van de volgende octrooien:

V.S.-octrooinummers HPV

5,643,715 • 5,712,092 • 5,876,922 • 5,952,487 • 5,958,674 • 5,981,173 • 6,107,086

V.S.-octrooinummer Hybrid Capture

6,228,578B1

Samenvatting van de digene HC2 HPV DNA Test

BELANGRIJK: Het is belangrijk dat u goed bekend bent met de uitgebreide procedure voordat u gebruikmaakt van deze samenvatting.

	Procedure	
	Methode voor vortexen met de hand	Methode Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2
DENATURATIE (Raadpleeg voor samples in PreservCyt-oplossing de gebruiksaanwijzing van de digene HC2 Sample Conversion Kit)	<p>Label hybridisatie-microbuizen. Bereid denaturatiereagens. ↓ Pipetteer denaturatiereagens (volume komt overeen met de helft van het samplevolume) in kalibrators, kwaliteitscontroles en samples. Vortex elke sample, kalibrator en kwaliteitscontrole afzonderlijk gedurende 5 seconden op hoge snelheid (zie deze gebruiksaanwijzing voor details). Controleer of alle buizen een paarse kleur tonen. ↓ Incubeer 45 ±5 minuten bij 65 ±2°C. ↓ Bereid HPV-probemix. ↓ ↓ ↓</p>	<p>Label hybridisatieplaat. Bereid denaturatiereagens. ↓ Pipetteer denaturatiereagens (volume komt overeen met de helft van het samplevolume) in kalibrators, kwaliteitscontroles en samples. Controleer of alle buizen een paarse kleur tonen. ↓ Dek het rek af met folie en deksel. ↓ Vortex gedurende 10 seconden. ↓ Incubeer 45 ±5 minuten bij 65 ±2°C. ↓ Bereid HPV-probemix ↓</p>
HYBRIDISATIE Gecombineerde-probecocktail-methode Dubbele-probe-methode	<p>Waterbadmethode Meng gedenatureerde sample goed en pipetteer 75 µl in buizen. ↓ Incubeer gedurende 10 minuten bij 20-25°C ↓ Pipetteer 25 µl gecombineerde-probecocktail in hybridisatie-microbuizen. OF Meng gedenatureerde sample goed en pipetteer 75 µl in "LR" buizen. Meng gedenatureerde sample goed en pipetteer 75 µl in "HR" buizen. ↓ Incubeer gedurende 10 minuten bij 20-25 °C ↓ Pipetteer 25 µl Low-Risk HPV-probemix in "LR" buizen. Pipetteer 25 µl High-Risk HPV-probemix in "HR" buizen. ↓ ↓ Dek microbuizen af met plaatafdekfolie en schud op Rotary Shaker I gedurende 3 ± 2 minuten bij 1100 ± 100 rpm. Controleer of alle buizen een gele kleur tonen. ↓ Incubeer 60 ±5 minuten bij 65 ±2°C. Bereid capture-microtiterplaat. ↓ ↓ ↓</p>	<p>Methode met Microplate Heater I Meng gedenatureerde sample goed en pipetteer 75 µl in microtiterplaatwells. ↓ Incubeer gedurende 10 minuten bij 20-25°C ↓ Pipetteer 25 µl gecombineerde-probecocktail in hybridisatie-microtiterplaatwells. OF Meng gedenatureerde sample goed en pipetteer 75 µl in "LR" microtiterplaatwells en 75 µl in "HR" microtiterplaatwells. ↓ Incubeer gedurende 10 minuten bij 20-25°C ↓ Pipetteer 25 µl Low-Risk HPV-probemix in "LR" microtiterplaatwells. Pipetteer 25 µl High-Risk HPV-probemix in "HR" microtiterplaatwells. ↓ Dek microtiterplaat af met een plaatdeksel en schud op de Rotary Shaker I gedurende 3 ± 2 minuten bij 1100 ± 100 rpm. Controleer of alle buizen een gele kleur tonen. ↓ Incubeer 60 ±5 minuten bij 65 ±2°C. Bereid capture-microtiterplaat. ↓</p>
HYBRIDEN-CAPTURING	<p>Breng inhoud van elke hybridisatie-microtiterplaatwell of microbus over naar de corresponderende capture-microtiterplaatwell met behulp van een 8-kanaalspipet. Dek af met een plaatdeksel of plaatafdekfolie. Schud gedurende 60 ±5 minuten op 1100 ±100 rpm bij 20-25°C. Bereid wasbuffer. ↓ Giet de capture-microtiterplaat af en dep hem droog (zie deze gebruiksaanwijzing voor details). ↓</p>	
HYBRIDEN-DETECTIE	<p>Pipetteer 75 µl detectiereagens 1 in elke well van de capture-microtiterplaat. Dek de capture-microtiterplaat af met plaatdeksel, Parafilm of gelijkwaardig. Incubeer 30 - 45 minuten bij 20-25°C. Was de plaat met de gewenste methode. ↓</p>	
WASSEN	<p>Methode handmatig wassen Giet de capture-microtiterplaat af en dep hem droog (zie deze gebruiksaanwijzing voor details). ↓ Was 6 keer. ↓ Dep droog op pluisvrije papieren doekjes ↓</p>	<p>Methode met de Automated Plate Washer Plaats de plaat op de wasser en druk op "START/STOP" om te beginnen. ↓ Ga naar de volgende stap. ↓ ↓ ↓</p>
SIGNAALAMPLIFICATIE	<p>Pipetteer 75 µl detectiereagens 2 in elke well van de capture-microtiterplaat. Incubeer gedurende 15-30 minuten bij 20-25°C. ↓</p>	
AFLEZING	<p>Lees de capture-microtiterplaat af op DML-instrument. ↓ Valideer de assay en interpreteer de sampleresultaten.</p>	