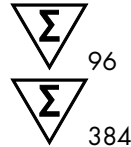


Augusti 2015

Bruksanvisning för *digene*[®] HC2 High-Risk HPV DNA-test



IVD

En in vitro-nukleinsyrahybridiseringsanalys med signalförstärkning och kemiluminescens på mikroplatta för kvalitativ detektion av 13 högrisktyper av humant papillomvirus (HPV)-DNA i cervix- och vaginalprover

För användning med:

- *digene* HC2 DNA Collection Device
- *digene* Specimen Transport Medium
- Hologic PreservCyt[®] Solution
- BD SurePath[®] Preservative Fluid

CE

REF

5197-1330 (kit med 1 platta)
618111 (kit med 4 plattor)



QIAGEN
19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874
USA

EC REP

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
GERMANY

1058538SV Rev. 02

Viktiga ändringar från den föregående versionen av bruksanvisningen

- Tillägg i form av provberedningsproceduren för SurePath-prover med postgradient cellpellet med användning av QIASymphony® DSP HPV Media-satsen tillsammans med tillhörande prestandadata.
- Uppdaterad för att uppfylla "Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals" (GHS).

Contents

Avsedd användning.....	8
Sammanfattning och förklaring.....	9
Information om patogen.....	9
Testprincip.....	10
Provberedning med användning av QIA Symphony DSP HPV Media-kit.....	12
Provberedning med användning av QIA Symphony DSP AXpH DNA-kit.....	12
Testning med användning av Rapid Capture System.....	13
Material som medföljer	15
Sats med 1 platta.....	15
Sats med 4 plattor	15
Kitinnehåll	16
Material som behövs men inte medföljer	17
In vitro-diagnostisk utrustning och material.....	17
Utrustning och material för allmän laboratorieanvändning	18
Ytterligare utrustning och material för PreservCyt-provberedning	20
Ytterligare utrustning och material för SurePath-provberedning.....	20
Varningar och försiktighet	21
Varningar.....	21
Prover.....	21
Natriumazid.....	22
N ₂ -buffert	22
RCS-automatiserad testning	22
Skydds- och riskfraser för komponenter	23
Försiktighetsåtgärder	24
Förvaring och hantering av reagens	25
Kitkomponenter.....	25
Beredda reagenser.....	26

Provinsamling och -beredning	26
Cervix- och vaginalprover i STM	27
Cervixbiopsier	27
Cervixprover i PreservCyt-lösning	27
Automatiserad provberedning av SurePath-prover	28
Automatiserad provberedning av SurePath-prover	29
Automatiserad provberedning av SurePath-prover med postgradient cellpellet.	30
Manuell provberedning av SurePath-prover med postgradient cellpellet	30
Procedur.....	31
Reagensberedning	31
Denatureringsreagens.....	33
Denatureringsreagens 2.....	34
Probblandning.....	35
Tvättbuffert	37
Skapa plattlayouten.....	38
Provberedning	39
Provberedning av PreservCyt-prover med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kit	39
Provberedning av SurePath-prover och SurePath postgradienta cellpelletar med användning av QIASymphony DSP HPV Media-satsen	40
Provberedning av PreservCyt-prover med användning av QIASymphony DSP AXpH DNA-kit.....	41
Manuell provberedning av PreservCyt-prover	41
Manuell provberedning av SurePath postgradienta cellpelletar	41
Denaturering och hybridisering av prover beredda med användning av QIASymphony SP	44
Denaturering av kalibratorer, kvalitetskontroller och DNA-eluat för manuell testning ..	44
Valfri stoppunkt för DNA-eluat	45
Hybridisering av DNA-eluat	46
Denaturering och hybridisering av STM-prover och manuellt beredda PreservCyt- och SurePath-prover med postgradient cellpellet.....	46
Denaturering av kalibratorer, kvalitetskontroller och STM-prover	47

Valfri stoppunkt för beredda STM-prover och manuellt beredda PreservCyt- och SurePath-prover med postgradient cellpellet.....	48
Hybridisering för beredda STM-prover och manuellt beredda PreservCyt- och SurePath-prover med postgradient cellpellet.....	49
Hybridisering med en mikroplatta och Microplate Heater I.....	50
Hybridisering med mikrorör och vattenbad	51
Hybridinfångning	53
Hybriddetektion	55
Tvätt	56
Metod för Automated Plate Washer	56
Manuell tvättmetod.....	57
Signalförstärkning	58
Mäta infångningsmikroplattan och framställa resultat.....	59
Tolkning av resultat.....	60
Resultat av testning av STM-prov	60
Resultat av testning av SurePath-prov	60
Resultat av testning av PreservCyt-prov.....	60
RLU/CO-värde nära 1,0	61
Andra HPV-typer	61
Assay Calibration Verification.....	61
Negativ kalibrator	61
Positiv kalibrator	62
Medelvärde för positiv kalibrator /medelvärde för negativ kalibrator	62
Cutoff-beräkning	62
Kvalitetskontroller	63
Limitations	64
Prestandaegenskaper.....	66
Klinisk prestanda vid screening av patienter med normala pap smear-resultat för att underlätta riskbedömningen för patienthantering.....	66
Klinisk prestanda vid screening av patienter med ASC-US pap smear-resultat för att fastställa behovet av remiss till kolposkopi	70

Klinisk känslighet och specificitet för fastställandet av risken för höggradig sjukdom hos kvinnor med pap smear-resultat med LSIL eller HSIL	72
Prestanda vid vaginal- eller självprovtagning	76
Analytisk känslighet	77
Ekvivalens mellan provtyper.....	78
Ekvivalens mellan STM- och PreservCyt-prover	78
Ekvivalens mellan manuell provberedning av PreservCyt-prover och provberedning av PreservCyt-prover med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kit.....	78
Ekvivalens mellan manuell provberedning av PreservCyt-prover och provberedning av PreservCyt-prover med användning av QIASymphony DSP AXpH-kit.....	79
Ekvivalens mellan STM- och manuell provberedning av SurePath-prover med postgradient cellpellet.....	79
Ekvivalens mellan manuell provberedning av SurePath-prover med postgradient cellpellet och provberedning av SurePath-prover med användning av QIASymphony DSP HPV Media-satsen	80
Ekvivalens mellan manuell provberedning av SurePath-prover med postgradient cellpellet och provberedning av SurePath-prover med postgradient cellpellet med användning av QIASymphony DSP HPV Media-satsen	81
Överensstämmelse mellan testmetoder	82
Reproducerbarhet.....	86
Total reproducerbarhet för manuell testning.....	86
Reproducerbarhet med kliniska STM-prover	86
Reproducerbarhet av kliniska PreservCyt-prov	89
Reproducerbarhet av kliniska SurePath-prov	100
Korsreaktivitet	105
Korshybridisering	107
Effekt av blod och andra substanser på STM-prover	108
Effekt av blod och andra substanser på PreservCyt-prover	108
Manuell provberedning	108
Provberedning med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kit.....	108
Provberedning med användning av QIASymphony DSP AXpH DNA-kit.....	109
Effekt av blod och andra substanser på SurePath-prover	110

Provberedning av SurePath-prover med användning av QIAasymphony DSP HPV Media-satsen	110
Provberedning av SurePath-prover med postgradient cellpellet med användning av QIAasymphony DSP HPV Media-satsen	111
Överföring (carryover)	111
Reagensstabilitet i systemet	113
Litteraturhänvisningar	115
Symboler	120
Felsökningshandbok	121
Kontaminationskontroll av DR2	128
Kontaminationskontroll av tvättanordning och/eller vattenkälla	128
Kontaminationskontroll av Automated Plate Washer	129
Kontaktinformation	130

Avsedd användning

För in vitro-diagnostisk (IVD) användning.

digene HC2 High-Risk HPV DNA-testet som baseras på Hybrid Capture® 2 (HC2)-teknik är en nukleinsyrahybridiseringsanalys med signalförstärkning som använder kemiluminescens på mikroplatta för kvalitativ detektion av 13 högrisktyper av HPV-DNA i cervix- och vaginalprover.

Cervix- och vaginalprover som kan testas med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet inkluderar följande:

- Cervixprover som tagits av en läkaren med *digene* HC2 DNA Collection Device
- Vaginala prover som tagits av patienten med *digene* HC2 DNA Collection Device
- självtagna
- Biopsier som samlats in i *digene* Specimen Transport Medium (STM, provtransportmedium)
- Prover som tagits med en provtagningsanordning av borsttyp eller kombinerad borste/spatel, och sedan placerats i PreservCyt-lösning eller SurePath-konserveringsvätska

Användningen av detta test är indicerat:

- för detektionen av högrisk-HPV-typerna 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 och 68 vilka har visats vara den primära orsaksfaktorn för utveckling av cervixcancer.
- som ett inledande allmänt screeningtest av befolkningen, för användning med eller utan pap smear, för att identifiera kvinnor med ökad risk för att utveckla cervixcancer eller befintlig höggradig cervixsjukdom. HPV-diagnos är i allt högre grad indikativ för cervixsjukdom med stigande ålder.
- som ett uppföljningstest för patienter med avvikande resultat på pap smear eller cervixsjukdom för att fastställa behovet av remiss till kolposkopi eller andra uppföljningsåtgärder.
- som ett uppföljningstest för patienter med pap smear-resultat som visar på LSIL (låggradig skvamös intraepitellesion) eller HSIL (höggradig skvamös intraepitellesion) före kolposkopi. För dessa patienter är ett *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testresultat till hjälp för läkaren i patientvården genom att underlätta riskbedömningen av kvinnor för att utesluta höggradig sjukdom.

Sammanfattning och förklaring

Förekomsten av vissa HPV-typer i kvinnans slida är associerad med ett flertal sjukdomar, inklusive kondylom, Bowenoid papulos samt cervikal, vaginal och vulvär intraepitelcancer och karcinom (1–3). Det är allmänt vedertaget att dessa virus företrädesvis överförs sexuellt och att högrisktyperna av HPV är den största identifierade riskfaktorn för utveckling av cervixcancer (4–8).

Hittills har det inte gått att odla HPV in vitro, och immunologiska tester är otillräckliga när det gäller att fastställa förekomsten av HPV-infektion i cervix. Indirekt evidens för anogenital HPV-infektion kan erhållas via kroppsundersökning och genom förekomsten av karakteristiska cellförändringar som associeras med virusreplikation i pap smear eller biopsiprover. Alternativt kan biopsier analyseras med nukleinsyrahybridisering för att direkt detektera förekomsten av HPV-DNA.

Historiskt sett har HPV-typ 16 och 18 betraktats som HPV-typer förenade med hög risk för cancer (8–10). HPV-typ 31, 33 och 35 har visats ha en intermediär association med cancer (2,11–14). Denna intermediära association beror på det faktum att dessa typer oftare detekteras vid höggradiga skvamösa intraepitellesioner än vid cancer. Därför är det mindre sannolikt att cancersjukdomar induceras på grund av förekomsten av dessa typer än när DNA från högrisk-HPV-typer är närvarande (15). Dessa 5 HPV-typer tillsammans står för cirka 73 % av alla HPV-infektioner (16, 17). Ytterligare HPV-typer, däribland 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 och 68, har identifierats som de huvudsakliga HPV-typerna som kan detekteras i de återstående lesionerna (17–27). Dessa HPV-typer kan också kategoriseras i intermediära och högriskgrupper baserat på deras relativa fördelning i olika histopatologiska diagnoskategorier (16, 17, 24–28).

HPV-DNA har visats förekomma hos cirka 10 % av alla kvinnor med normalt cervixepitel men den faktiska prevalensen i specifika grupper av kvinnor påverkas starkt av ålder och andra demografiska variabler (2, 10, 16, 29). Prospektiva studier har visat att 15–28 % av kvinnor som testats positiva för HPV-DNA utvecklade skvamös intraepitelcancer (SIL) inom 2 år jämfört med endast 1–3 % av kvinnor som testats negativa för HPV-DNA (30, 31). I synnerhet var risken större för progression för HPV-typ 16 och 18 (cirka 40 %) än för andra HPV-typer (30).

Information om patogen

Humana papillomvirus består av en ikosahedral viruspartikel (virion) som innehåller en dubbelsträngad, ringformig DNA-molekyl med 8 000 baspar, omgiven av ett kapsidprotein. När epitelceller infekterats etableras virus-DNA i hela epitelet, men intakta virioner återfinns endast i

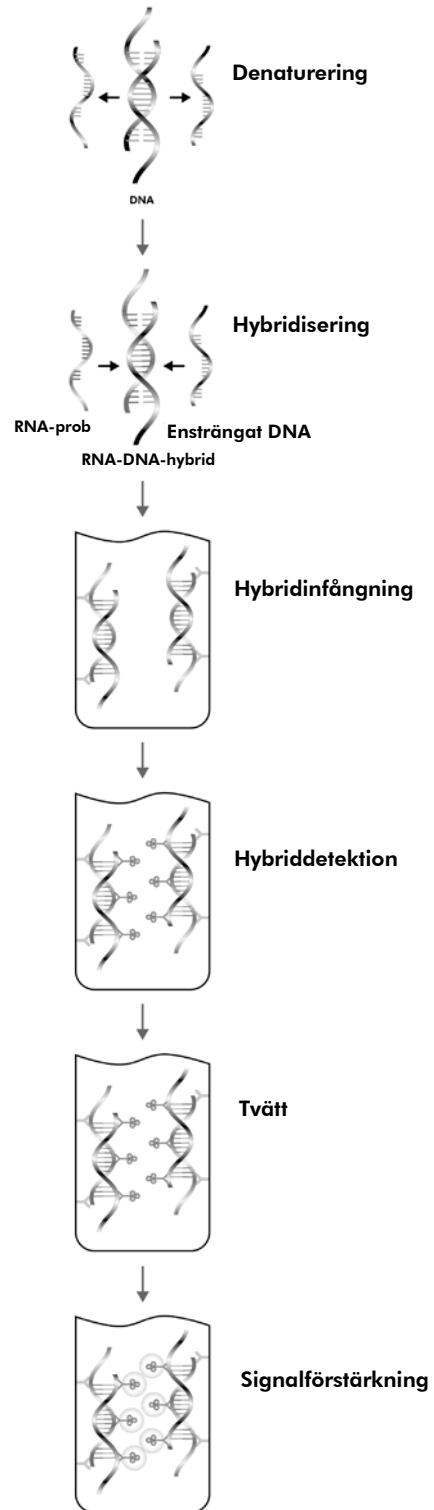
de övre vävnadsskikten. Därför kan virus-DNA hittas antingen i virioner eller som episomala eller integrerade HPV-sekvenser, beroende på lesionstyp och -grad.

Testprincip

digene HC2 High-Risk HPV DNA-testet, med användning av HC2-teknik, är en nukleinsyrahybridiseringsanalys med signalförstärkning som använder kemiluminescens på mikropatta för detektion. Prover som innehåller mål-DNA:t hybridiseras med en specifik HPV-RNA-prob. De resulterade RNA-DNA-hybriderna fångas på ytan av en mikropattbrunn som är belagd med antikroppar som är specifika för RNA-DNA-hybrider. Immobiliserade hybrider får sedan reagera med alkaliskt fosfatas-konjugerade antikroppar som är specifika för RNA-DNA-hybriderna och detekteras med ett kemiluminescenssubstrat. Flera alkaliskt fosfatas-molekyler konjugeras till varje antikropp. Åtskilliga konjugerade antikroppar binds till varje infångad hybrid vilket leder till avsevärd signalförstärkning. När substratet klyvs av det bundna alkaliska fosfatet avges ljus, vilket mäts som relativa ljusenheter (RLU) av ett *digene* Microplate Luminometer (DML)-instrument. Intensiteten i ljuset som avges betecknar förekomsten eller frånvaron av mål-DNA i provet.

En RLU-mätning som är lika med eller större än cutoff-värdet för analysen (assay cutoff, CO) indikerar förekomsten av sekvenser av högrisk-HPV-DNA i provet. En RLU-mätning som är mindre än CO för analysen indikerar frånvaron av de specifika sekvenserna med högrisk-HPV-DNA som testas eller HPV-DNA-nivåer under detektionsgränsen för testet.

Arbetsflöde vid hybridinfångning



Automatiserad provberedning av PreservCyt-prover kan utföras med användning av QIASymphony SP tillsammans med QIASymphony DSP HPV Media-kitet eller QIASymphony DSP AXpH DNA-kitet.

Provberedning med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kit

QIASymphony DSP HPV Media-kitet tillhandahåller provextrakt på hybridiseringsmikroplattan som är klara för automatiserad testning med Rapid Capture® System (RCS) tillsammans med digene HC2 High-Risk HPV DNA-testet. QIASymphony SP utför alla steg i provberedningsproceduren för upp till 88 prover, i batcher på upp till 24, i en enda körning.

QIASymphony SP bearbetar 88 PreservCyt-prover på 2 timmar och 15 minuter utan att det behövs någon åtgärd från användaren när instrumentet väl har laddats med prover.

QIASymphony SP bearbetar 88 SurePath-prover på 1 timme och 45 minuter utan att det behövs någon åtgärd från användaren när instrumentet väl har laddats med prover. Provberedningen med användning av QIASymphony SP följs omedelbart av 90 minuters inkubation av provextrakten i hybridiseringsmikroplattan på en mikroplattvärmare. Under inkubationen av provextrakt denatureras kalibratorerna och kvalitetskontrollerna separat i ett vattenbad för att sedan manuellt pipetteras i den första kolonnen på hybridiseringsmikroplattan så snart provextraktinkubationen är slutförd. Provberedning av SurePath-prover med användning av QIASymphony SP och QIASymphony DSP HPV Media-satsen kan göras antingen innan cytologibearbetningen påbörjas eller när cytologibearbetningen är avslutad.

Viktigt: Provextrakten som producerats som ett resultat av provberedning av PreservCyt- och SurePath-prover med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kitet kan endast testas med RCS. Manuellt utförande av testet med provextrakt är inte validerad.

Vid utförande av automatiserad provberedning med användning av QIASymphony, se relevanta QIASymphony-användarhandböcker och bruksanvisningen till QIASymphony DSP HPV Media-kitet (*QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)*), förutom dessa bruksanvisningar, för nödvändig procedurinformation och beskrivande information.

Provberedning med användning av QIASymphony DSP AXpH DNA-kit

QIASymphony DSP AXpH DNA-kitet tillhandahåller DNA-eluat på hybridiseringsmikroplattan som är klara för manuell eller RCS-automatiserad testning med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet. QIASymphony SP utför alla steg i provberedningsproceduren för upp till 88 prover, i batcher på upp till 24, i en enda körning. QIASymphony SP bearbetar 88 PreservCyt-prover på 4 timmar och

30 minuter utan att det behövs någon åtgärd från användaren när instrumentet väl har laddats med prover.

Vid utförande av automatiserad provberedning med användning av QIASymphony, se relevanta QIASymphony-användarhandböcker och handboken till QIASymphony DSP AXpH DNA-kitet (*QIASymphony DSP AXpH DNA Kit Handbook*), förutom dessa bruksanvisningar, för nödvändig procedurinformation och beskrivande information.

Testning med användning av Rapid Capture System

Det går att testa stora provvolymmer med digene HC2 High-Risk HPV DNA-testet med användning av RCS. Kitet med 4 plattor (kat. nr 618111) kan endast användas med RCS och går inte att använda för manuell testning.

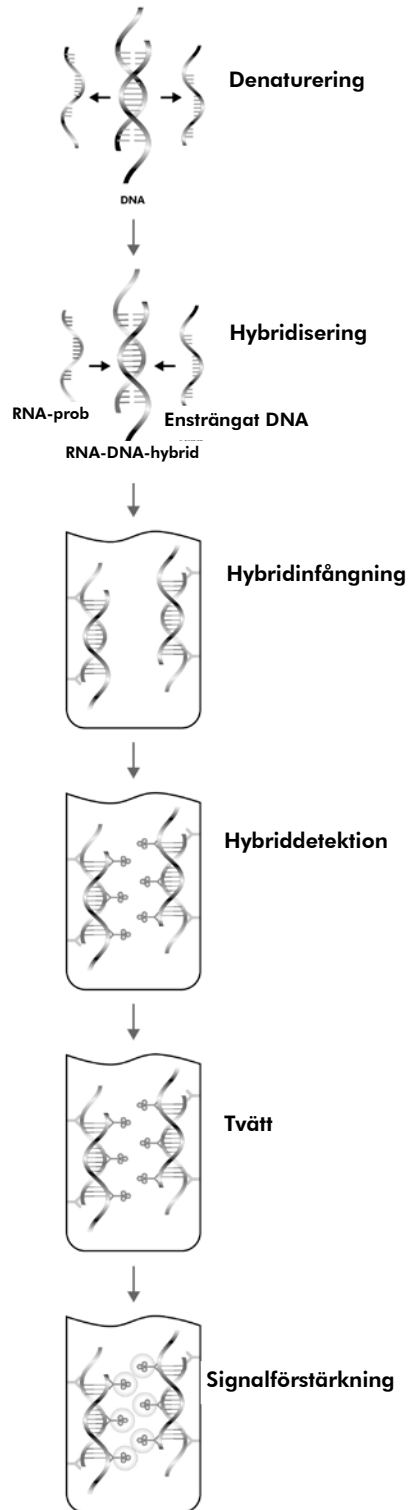
RCS är ett automatiserat pipetterings- och spädningssystem för allmänt bruk som kan användas med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet för testning av stora provvolymmer. Detta system behandlar upp till 352 prover på 8 timmar, inklusive en period på 3,5 timmar under vilken det inte krävs några användaråtgärder; upp till 704 provresultat kan framställas på 13 timmar.

Provberedning utförs oberoende av RCS före placeringen på RCS-däcket. Dessutom utförs kemiluminiscent signaldetektion och resultatrapportering med ett offline-DML-instrument som är gemensamt för både manuell och RCS-automatiserad testning.

Vart och ett av stegen i digene HC2 High-Risk HPV DNA-testet utförs i exakt samma följd som vid manuell testning. RCS gör det möjligt att bearbeta upp till 4 staplade mikropeltor, där varje mikropeltor innehåller prover och den mängd testkalibratorer och kvalitetskontroller som behövs.

Vid utförandet av RCS-automatiserad testning, se Rapid Capture System Användarhandbok (*Rapid Capture System User Manual*) och Rapid Capture System Användarhandbok – Utföra *digene* HC2 DNA-tester med användning av prover som bearbetats i QIASymphony SP (*Rapid Capture System User Manual – Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*), utöver denna bruksanvisning, för nödvändig procedurinformation och beskrivande information.

Arbetsflöde vid hybridinfångning



Manuell proverberedning

Automatiserad i Rapid Capture System

Material som medföljer

Sats med 1 platta

Det finns 96 tester i 1 plate *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test (*digene* HC2 högrisk-HPV-DNA-testet med 1 platta) (kat. nr 5197-1330).

Vid utförandet av manuell testning med kitet med 1 platta är det minsta rekommenderade antalet tester för varje användning 24. Om färre än 24 tester per användning önskas, kan det totala antalet tester per kit minskas beroende på begränsade reagensvolym. Antalet patientresultat varierar, beroende på antalet användningar per kit, så som specificeras nedan:

Antal användningar	Antal patientresultat
1	88
2	80
3	72
4	64

Vid utförandet av RCS-automatiserad testning med kitet med 1 platta, kräver en användning av hela kitet att en hel mikroplatta (88 prover) testas per RCS-körning. Testning av en partiell mikroplatta är acceptabel; hela kitet används dock beroende på den tomma volym som krävs för instrumentets drift.

Sats med 4 plattor

Det finns 384 tester i 4 plate *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test (*digene* HC2 högrisk-HPV-DNA-testet med 4 plattor) (kat. nr 618111).

Satsen med 4 plattor kan endast användas för RCS-automatiserad testning. För att uppnå 384 test måste satsen med 4 plattor användas i en eller två RCS-körningar. Om du önskar köra fler än två körningar ska det totala antalet test per sats minskas på grund av begränsade reagensvolym.

Kitinnehåll

digene HC2 High-Risk HPV DNA Test		
Katalognr	5197-1330	618111
Antal tester	96	384
Indicator Dye (Indikatorfärg) håller 0,05 % (w/v) natriumazid	0.35 ml	2.0 ml
Denaturation Reagent* (Denatureringsreagens*) ädd natriumhydroxidlösning (NaOH)	50 ml	2 x 100 ml
Probe Diluent* (Probspädningsvätska*) rad lösning med 0,05 % (w/v) natriumazid	5 ml	20 ml
High-Risk HPV Probe (Högrisk-HPV-prob) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 och RNA-prob i buffrad lösning (rött lock)	200 µl	3 x 200 µl
Low-Risk HPV Quality Control (Lågrisk-HPV- kvalitetskontroll) µg/ml (500 000 kopior/ml) klonat HPV 6-DNA och bärar- DNA i STM med 0,05 % (w/v) natriumazid.	1 ml	1 ml
High-Risk HPV Quality Control (Högrisk-HPV- kvalitetskontroll) µg/ml (500 000 kopior/ml) klonat HPV 16-DNA och bärar-DNA i STM med 0,05 % (w/v) natriumazid.	1 ml	1 ml
Negative Calibrator (Negativ kalibrator) bärar-DNA i STM med 0,05 % (w/v) natriumazid	2 ml	2 ml
High-Risk HPV Calibrator (Högrisk-HPV-kalibrator) µg/ml klonat HPV 16-DNA och bärar-DNA i STM med 0,05 % (w/v) natriumazid	1 ml	2 ml
Capture Microplate (Infångningsmikroplatta) fyllt med polyklonala anti-RNA-DNA-hybridantikroppar	1	4
Detection Reagent 1 (Detektionsreagens 1) alkaliskt fosfatas-konjugerade antikroppar mot RNA-DNA- hybrider i buffrad lösning med 0,05 % (w/v) natriumazid	12 ml	40 ml
Detection Reagent 2 (Detektionsreagens 2) T-Star® med Emerald II (kemiluminiscenssubstrat)	12 ml	40 ml
Wash Buffer Concentrate* (Tvättbuffertkoncentrat*) håller 1,5% (w/v) natriumazid	100 ml	2 x 100 ml

* Se "Varningar och försiktighet", sida 21, för information om hälsa och säkerhet.

Material som behövs men inte medföljer

Viktigt! Se till att alla instrumentet som används i den här proceduren har kontrollerats och kalibrerats enligt tillverkarens angivelser.

In vitro-diagnostisk utrustning och material

Endast utrustning och material som är validerade med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet är tillgängliga från QIAGEN.

- *digene* Hybrid Capture 2 System ("*digene* HC2 System"), bestående av en QIAGEN-godkänd luminometer ("*DML*-instrument"), en QIAGEN-godkänd persondator med tillbehör (bildskärm, tangentbord, mus, skrivare och skrivarkabel), programvara till *digene* HC2 System ("*digene* analysprogramvara"), analysprotokoll för HPV till *digene* HC2 System, LumiCheck Plate-programvara och användarhandbok till *digene* HC2 System-programvaran (*digene* HC2 System Software User Manual)
- Hybrid Capture System Rotary Shaker I
- Hybrid Capture System Microplate Heater I
- Hybrid Capture System Automated Plate Washer
- Hybrid Capture System Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 (tillval) *
- Konverteringsställ och lock (tillval) *
- *digene* provställ och lock (tillval) *
- EXPAND-4-pipett och ställ (tillval) †
- Rölförlutardispenser och skärinstrument (tillval, används med MST Vortexer 2)
- Rapid Capture System (krävs för användning med kitet med 4 plattor; valfritt för kitet med 1 platta)
- Tvättanordning
- Mikroplattor för hybridisering
- Lock till mikroplattor
- RCS-strips med brunnar för mikroplatta *
- RCS-reagenstråg *
- Lock till RCS-reagenstråg *
- RCS-engångsspetsar *

* Krävs för utförande av RCS-automatiserad testning.

† Specialartikel som används för att överföra STM-prover till hybridiseringsmikroplatta. Andra utvidningsbara specialpipetter med flera kanaler kan användas, förutsatt att mellanrummet mellan spetsarna är 3,2 cm i utvidgat skick.

- RCS "drop-on"-lock*
- Buffert N2†
- Buffert D2†
- Blå RCS-tvättbåt‡
- Extralånga pipettspetsar
- Provtagningsrör
- Ställ till provtagningsrör
- Skruvlock till provtagningsrör
- Reagensbehållare för engångsbruk
- DuraSeal™ rörförseglingsfilm
- Hybridiseringsmikrorör§
- Mikrorörställ§
- Plattförseglare§

Utrustning och material för allmän laboratorieanvändning

- 65 ± 2 °C vattenbad, tillräckligt stort för att rymma ett provställ (bredd 21 cm x djup 32 cm x höjd 18 cm).
- Mikrocentrifug
- Vortexblandare med bägarfastsättning
- Enkanalspipett; olika inställningar för volymer om 20–200 µl och 200–1 000 µl
- Repeterande volymetriska pipetter, t.ex. Eppendorf® Repeater®-pipett
- 8-kanalspipett: olika inställningar för volymer om 25–200 µl
- Timer
- 0,5 % v/v natriumhypokloritlösning
- Parafilm® eller motsvarande
- Pipettspetsar för engångsbruk med aerosolbarriär för enkanalspipett (20–200 µl och 200–1 000 µl)
- Engångsspetsar för repeterande volymetrisk pipett (12,5; 5; 2,5 och 1,25 ml)
- Engångsspetsar för 8-kanalspipett (25–200 µl)
- Kimtowels®-torkar eller motsvarande luddfria pappershanddukar

* Krävs för utförande av RCS-automatiserad testning.


† Krävs för utförande av testning med prover som beretts med användning av QIASymphony DSP AXpH DNA-kitet.


‡ Krävs för RCS-automatiserad testning av prover som bearbetats med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kitet.


§ Krävs för utförande av hybridisering med mikrorör och vattenbad.

-
- Bänkskydd för engångsbruk
 - Puderfria engångshandskar
 - Polypropylenrör på 5 ml och/eller 15 ml med snäpplock och rund botten
 - Rörställ för rör på 10 ml eller 15 ml
 - 50 ml koniska polypropenrör


Ytterligare utrustning och material för PreservCyt-provberedning

 Se bruksanvisningen till QIAasymphony DSP HPV Media-kitet (QIAasymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)) när det gäller automatiserad provberedning med användning av QIAasymphony DSP HPV Media-kitet.

 Se användarhandboken till QIAasymphony DSP AXpH DNA-kitet (QIAasymphony DSP AXpH DNA Kit Handbook) när det gäller automatiserad provberedning med användning av QIAasymphony DSP AXpH DNA-kitet..

 Se bruksanvisningen till *digene* HC2 Sample Conversion kit när det gäller manuell provberedning.

Ytterligare utrustning och material för SurePath-provberedning

 Se bruksanvisningen till QIAasymphony DSP HPV Media-kitet (QIAasymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)) när det gäller automatiserad provberedning med användning av QIAasymphony DSP HPV Media-kitet.

Vid manuell SurePath-provberedning behövs följande extra utrustning och material:

- "Swinging bucket"-centrifug som kan uppnå $800 \pm 15 \times g$ och rymmer koniska centrifugrör på 15 ml av polypropylen
- *digene* HC2 Sample Conversion-rör* eller 15 ml VWR® eller Corning® polypropylenrör
Viktigt! De *digene* HC2-provkonverteringsrör som är tillgängliga från QIAGEN måste användas med MST Vortexer 2 eller RCS.
- 7 ml överföringspipetter med standardspets eller motsvarande
- *digene* Specimen Transport Medium

* De *digene* HC2 Sample Conversion-rör som är tillgängliga från QIAGEN måste användas med MST Vortexer 2 eller RCS.

Varningar och försiktighet

För in vitro-diagnostisk användning.

Läs alla anvisningar noga innan du använder testet.

Varningar

Använd alltid lämplig laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Se lämpligt säkerhetsdatablad (SDS) för mer information. Dessa är tillgängliga online i praktiskt och kompakt PDF-format på www.qiagen.com/safety där du kan hitta, granska och skriva ut datablad för alla kit och kitkomponenter från QIAGEN.

Prover

FÖRSIKTIGHET Risk för smittsamma ämnen



Prover kan innehålla infektiösa agens och ska hanteras i enlighet härmed. Betrakta alla prover som potentiellt smittsamma.

Ingen känd testmetod kan erbjuda en fullständig försäkran om att prover inte överför smitta. Vi rekommenderar att humana prover behandlas i enlighet med relevant nationell och lokal praxis för biosäkerhet. Använd denna biosäkerhetspraxis i samband med material som innehåller eller misstänks innehålla smittämnen.

I dessa säkerhetsåtgärder ingår bland annat:

- Pipettera inte med munnen.
- Undvik att röka, äta och dricka i områden där reagenser eller prover hanteras.
- Använd puderfria engångshandskar medan du hanterar reagenser eller prover. Tvätta händerna noga när testet har utförts.
- Rengör och desinficera allt spill från prover med användning av ett tuberkulocidalt desinfektionsmedel, t.ex. 0,5 % v/v natriumhypoklorit, eller ett annat lämpligt desinfektionsmedel (32,).
- Dekontaminera och kassera alla prov, reagens och andra eventuellt kontaminerade material i enlighet med nationella och lokala föreskrifter.

Efter denaturering och inkubation betraktas proverna inte längre som smittsamma (34); laboratoriepersonal ska dock fortfarande följa nationella och lokala säkerhetsföreskrifter.

Natriumazid

Vissa reagenser innehåller natriumazid. Natriumazid har rapporterats bilda bly- eller kopparazid i avloppsrör i laboratorier. Dessa azider kan explodera vid stötar, t.ex. hamrande. För att förhindra att det bildas bly- eller kopparazid ska avloppsrören spolas noga med vatten efter kassering av lösningar som innehåller natriumazid. För att avlägsna kontamination från gamla avloppsrör där man misstänker att det har ansamlats azider, rekommenderar U.S. Occupational Safety and Health Administration följande:

1. Avlägsna vätska från vattenlåset med en hävert i form av en gummi- eller plastslang.
2. Fyll med 10 % v/v natriumhypokloritlösning.
3. Låt stå i 16 timmar.
4. Spola noga med vatten.

N2-buffert

FÖRSIKTIGHET Risk för starkt reaktiva föreningar



Undvik att tillsätta blekmedel eller sura lösningar direkt till en annan lösning eller avfall som innehåller N2-buffert.

N2-buffert innehåller guanidinhydroklorid som kan bilda starkt reaktiva sammansättningar i kombination med blekmedel.

Om vätska med dessa buffertar spills ut ska den torkas upp med lämpliga laboratorierengöringsmedel och vatten. Om den spillda vätskan innehåller potentiellt smittsamma ämnen ska ytorna först rengöras med laboratorierengöringsmedel och vatten och därefter med 1 % (v/v) natriumhypoklorit.

RCS-automatiserad testning

Se Rapid Capture System Användarhandbok (*Rapid Capture System User Manual*) för ytterligare varningar och försiktighetsåtgärder som är specifika för användningen av det systemet för testning av stora provpolymer.

Skydds- och riskfraser för komponenter

Följande risk- och skyddsfraser gäller för komponenter i *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testkitet:

Wash Buffer Concentrate (Tvättbuffertkoncentrat)



Innehåller: Sodium azide. Varning! Skadligt vid förtäring. Skadliga långtidseffekter för vattenlevande organismer. Undvik utsläpp till miljön. Innehållet/ behållaren lämnas till en godkänd avfallsanläggning.

Denaturation Reagent (Denatureringsreagens)



Innehåller: sodium hydroxide. Fara! Orsakar allvarliga frätskador på hud och ögon. Kan vara korrosivt för metaller. Innehållet/ behållaren lämnas till en godkänd avfallsanläggning. VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja. VID HUDKONTAKT (även håret): Ta omedelbart av alla nedstänkta kläder. Skölj huden med vatten/ duscha. Kontakta genast GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare. Förvaras inlåst. Använd skyddshandskar/ skyddskläder/ ögonskydd/ ansiktsskydd.

Probe Diluent (Probspädningsvätska)



Innehåller: acetic acid; Polyacrylic acid. Fara! Orsakar allvarliga frätskador på hud och ögon. Innehållet/ behållaren lämnas till en godkänd avfallsanläggning. VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja. VID HUDKONTAKT (även håret): Ta omedelbart av alla nedstänkta kläder. Skölj huden med vatten/ duscha. Kontakta genast GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare. Förvaras inlåst. Använd skyddshandskar/ skyddskläder/ ögonskydd/ ansiktsskydd.

High-Risk HPV Calibrator (Högrisk-HPV-kalibrator)

Varning! Orsakar lätt hudirritation. Om hudirritation uppstår: Kontakta läkare.

High-Risk HPV Quality Control (Högrisk-HPV-kvalitetskontroll)

Varning! Orsakar mild hudirritation. Om hudirritation uppstår: Sök läkarvård.

Low-Risk HPV Quality Control (Lågrisk-HPV-kvalitetskontroll)


Varning! Orsakar mild hudirritation. Om hudirritation uppstår: Sök läkarvård.

Negative Calibrator (Negativ kalibrator)

Varning! Orsakar mild hudirritation. Om hudirritation uppstår: Sök läkarvård.

Försiktighetsåtgärder

Användaren måste alltid vidta följande försiktighetsåtgärder vid utförandet av *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet:

- Använd inte reagenserna efter utgångsdatumet som anges bredvid symbolen  på etiketten utan på kartongen eller utgångsdatumet för de beredda reagenserna.
- Om testet utförs utanför angivna tids- och temperaturintervall kan det leda till ogiltiga resultat. Tester som inte hamnar inom de fastställda tids- och temperaturintervallen är ogiltiga och måste göras om.
- Proceduren, analyskalibreringen, kvalitetskontrollen och tolkningen av resultaten för *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet måste följas noga för att man ska få fram pålitliga testresultat.
- Det är viktigt att pipettera exakt den reagensvolym som anges och att blanda väl efter varje reagenstillsats. Om detta inte följs kan det leda till felaktiga testresultat. Genom att kontrollera att de angivna färgförändringarna har skett bekräftas att dessa villkor har uppfyllts.
- Med undantag av tvättbuffertkoncentratet har kitkomponenterna testats som en enhet. Byt inte ut dem mot komponenter från andra källor eller andra loter. Det är dock acceptabelt att

kombinera komponenter från kit med samma lotnummer för att få tillräckligt med reagensvolym för att kunna testa flera mikroplattor i en enda RCS-körning.

- Nukleinsyror är mycket känsliga för miljömässig nukleasnedbrytning. Nukleaser finns på människans hud och på ytor eller material som hanteras av människor. Rengör och täck över arbetsytor med ett bänkskydd för engångsbruk och använd puderfria handskar medan teststegen utförs.
- Se till att kontamination av infångningsmikroplattan och detektionsreagens 2 (DR2) med exogent alkaliskt fosfatas förhindras under utförandet av testet. Substanser som kan innehålla alkaliskt fosfatas är t.ex. detektionsreagens 1 (DR1), bakterier, saliv, hår och fett från huden. Det är särskilt viktigt att täcka över infångningsmikroplattan efter tvättsteget och under DR2-inkubationen eftersom exogent alkaliskt fosfatas kan reagera med DR2, vilket ger falska positiva resultat.
- Skydda DR2 från långvarig exponering för direkt ljus. Använd DR2 omedelbart efter alikvotering och undvik direkt solljus.
- Prima den repeterande pipetten innan reagens tillsätts och kontrollera regelbundet att det inte finns några stora luftbubblor. Alltför stora mängder av stora luftbubblor i spetsen på den repeterande pipetten kan göra att tillförseln blir mindre noggrann. Detta kan undvikas genom att du fyller pipetten, dispenserar all vätska och fyller den på nytt. Se användarhandboken till pipetten när det gäller specifika bruksanvisningar.
- Utför pipettering med flera kanaler med användning av den omvända pipetteringstekniken (se "Hybriddetektion", sida 55) för dispenserering av DR1 och DR2. Kontrollera alla pipettspetsar på pipetten med flera kanaler avseende korrekt passning och fyllning.
- Kontrollera att alla brunnar på infångningsmikroplattan är noga rengjorda (se "Tvätt", sida 56). Otillräcklig rengöring leder till ökad bakgrund och kan ge falska positiva resultat. Rester av tvättbuffert i brunnarna på infångningsmikroplattan kan leda till reducerad signal eller dålig reproducerbarhet.

Förvaring och hantering av reagens

Kitkomponenter

Efter mottagandet ska kitet förvaras vid 2–8 °C. Tvättbuffertkoncentrat, denatureringsreagens och indikatorfärg kan förvaras vid 2–30 °C, efter behov. Alla reagenser tillhandahålls bruksfärdiga, utom denatureringsreagenset (DNR), probblandningarna och tvättbufferten.

Beredda reagenser

I beredd form är DNR stabilt i 3 månader vid 2–8 °C.

I beredd form är tvättbufferten stabil i 3 månader vid 2–30 °C.

Vid testning av PreservCyt-prover som har bearbetats med QIASymphony DSP HPV Media-kitet eller QIASymphony DSP AXpH DNA-kitet, är de öppnade, icke denaturerade kalibratorerna och kvalitetskontrollerna stabila i 3 månader vid 2–8 °C.

Vid testning av prover som har bearbetats med QIASymphony DSP AXpH DNA-kitet är berett denatureringsreagens 2 (DNR2) stabilt i 8 timmar vid 15–30 °C.

Provinsamling och -beredning

Samla in och transportera cervix- och vaginalprover som ska testas med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet med användning av en av följande provtagningsanordningar:

- *digene* HC2 DNA Collection Device (besår av en cervixborste och STM)
- Biopsier insamlade i *digene* STM
- En provtagningsanordning av borsttyp eller kombinerad borste/spatel placerad i PreservCyt-lösning eller SurePath-konserveringsvätska

Prover som har tagits med andra provtagningsanordningar eller har transporterats i andra transportmedia har inte validerats för användning med det här testet. Prestandaegenskaperna för detta test har endast fastställts med de angivna provtagningskiten.

digene HC2 DNA Collection Device får inte användas på gravida kvinnor. Cervixprover måste samlas in innan ättiksyra och jod appliceras om en kolposkopisk undersökning utförs. Se bruksanvisningen till *digene* HC2 DNA Collection Device när det gäller ytterligare procedurer för provtagning och hantering.

Cervix- och vaginalprover som har samlats in i STM behöver inte beredas före testning med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet. PreservCyt- och SurePath-prover måste konverteras före testning med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet.

Cervix- och vaginalprover i STM

Viktigt: Ta inte något STM-cervix- och vaginal prov om det finns höga koncentrationer av svampdödande kräm, spermiedödande medel eller slidsköljningsmedel.

STM-prover kan förvaras i upp till 2 veckor vid rumstemperatur och kan utan nedkylning skickas till testlaboratoriet. Prover ska skickas i en isolerad behållare med en transportör som levererar nästa dag eller efter 2 dagar.

På testlaboratoriet ska proverna förvaras vid 2–8 °C om testet ska utföras inom 1 vecka. Om det dröjer mer än 1 vecka innan testet utförs, ska provrörslocken täckas med Parafilm och förvaras vid –20 °C i högst 3 månader. När du tar ut prover från frysen för test, ska locken omedelbart ersättas med skruvlock för provtagningsrör.

Ett konserveringsmedel har tillsatts till STM för att hämma bakterietillväxt och bevara integriteten hos DNA:t. Det är inte avsett att bevara livsdugligheten hos organismer eller celler.

Cervixbiopsier

Nytagna cervixbiopsier med ett tvärsnitt på 2–5 mm kan testas med digene HC2 High-Risk HPV DNA-testet. Använd inte biopsier som är mindre än 2 mm i diameter. Placera omedelbart biopsiprovet i 1,0 ml STM, täck provrörslocket med Parafilm för att förhindra att locket lossnar, och förvara fryst vid –20 °C. Skicka biopsiprover vid 2–30 °C för leverans nästa dag till testlaboratoriet.

På testlaboratoriet ska proverna förvaras vid –20 °C tills de behandlas. När du tar ut prover från frysen för test, ska locken omedelbart ersättas med skruvlock för provtagningsrör.

Cervixprover i PreservCyt-lösning

Viktigt: Ta inte ett PreservCyt-cervixprov för provberedning med QIASymphony DSP HPV Media-kitet om det finns höga koncentrationer av svampdödande kräm, glidmedel eller blod.

Viktigt: Ta inte ett PreservCyt-cervixprov för provberedning med QIASymphony DSP AXpH DNA-kitet om det finns förekomst av spermiedödande medel..

Utför provtagning på sedvanligt sätt och bered objektglas för ThinPrep®-paptestet enligt tillverkarens bruksanvisning.

Efter provtagning kan PreservCyt-prover sparas i upp till 3 månader vid 2–30 °C före provberedning för *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet. PreservCyt-prover kan inte frysas..

Följande metoder kan användas för provberedning:

- Automatiserad provberedning med användning av QIAasymphony SP och QIAasymphony DSP HPV Media-satsen.

Resultatet är ett provextrakt (som innehåller magnetiska partiklar, STM och DNR) som är klart att gå vidare till denatureringssteget i testet.

- Automatiserad provberedning med användning av QIAasymphony SP och QIAasymphony DSP AXpH DNA-satsen.

Resultatet är ett DNA-eluat som är klart att gå vidare till denatureringssteget i testet.

- Manuell provberedning med *digene* HC2 Sample Conversion-kitet. Resultatet av manuell provberedning är ett denaturerat prov som är klart att gå vidare till hybridiseringssteget i testet.

Hur stor provvolym som krävs beror på provberedningsmetoden enligt följande:

- Automatiserad provberedning med användning av QIAasymphony DSP HPV Media-kit kräver 3 ml prov
- Automatiserad provberedning med användning av QIAasymphony DSP AXpH DNA-kit kräver 4 ml prov
- Manuell provberedning med *digene* HC2 Sample Conversion-kit kräver minst 4 ml prov

Prover med mindre än den erforderliga provvolymen efter beredning av papstestet innehåller för litet material för testning och kan ge ett falskt negativt resultat i *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet.

Automatiserad provberedning av SurePath-prover

Viktigt! Ta inte ett SurePath-cervixprov för provberedning med QIAasymphony DSP HPV Media-satsen om det finns förekomst av spermiedödande medel, svampdödande kräm eller antiinflammatorisk kräm.

Samla in prover i SurePath-konserveringslösning enligt den relevanta bruksanvisningen.

Provberedning av SurePath-prover kan göras antingen innan cytologibearbetningen påbörjas eller när cytologibearbetningen är avslutad.

Om den görs före cytologibearbetningen, ska du använda ett prov från det ursprungliga SurePath-provet som inte har bearbetats med hjälp av någon annan diagnostisk metod, inklusive

BD PrepMate®-systemet och BD PrepStain® Slide Processor. Dessa prover benämns i bruksanvisningen som "SurePath-prover" för att undvika förvirring.

Om den görs efter cytologibearbetningen, ska du använda ett prov från den återstående postgradienta cellpelleten efter beredning av ett SurePath-prov i enlighet med relevanta anvisningar för BD PrepMate-systemet och BD PrepStain Slide Processor. Dessa prover benämns i bruksanvisningen som "SurePath-prover med postgradient cellpellet" för att undvika förvirring.

Följande metoder kan användas för provberedning:

- Automatiserad provberedning av SurePath-prover med användning av QIASymphony SP och QIASymphony DSP HPV Media-satsen.
Resultatet är ett denaturerat provextrakt (som innehåller magnetiska partiklar, STM och DNR) som är klart att gå vidare till hybridiseringssteget i testet.
- Automatiserad provberedning av SurePath-prover med postgradient cellpellet med användning av QIASymphony SP och QIASymphony DSP HPV Media-satsen.
Resultatet är ett denaturerat provextrakt (som innehåller magnetiska partiklar, STM och DNR) som är klart att gå vidare till hybridiseringssteget i testet.
- Manuell provberedning av SurePath-prover med postgradient cellpellet.
Resultatet av manuell provberedning är ett denaturerat prov som är klart att gå vidare till hybridiseringssteget i testet.

Hur stor provvolym som krävs beror på provberedningsmetoden enligt följande:

- Automatiserad provberedning med användning av QIASymphony DSP HPV Media-satsen kräver 950 µl
- Manuell provberedning kräver 2,8 ml av SurePath-prov med postgradient cellpellet

Användning av mindre volym än den erforderliga volymen kan orsaka ett falskt negativt resultat i *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet.

Automatiserad provberedning av SurePath-prover

Efter insamling ska SurePath-prover förvaras i upp till 4 veckor vid 5–25 °C före provberedning med användning av QIASymphony SP och QIASymphony DSP HPV Media-satsen. SurePath-provet som används får inte ha bearbetats med någon annan diagnostisk metod, inklusive BD PrepMate och BD PrepStain Slide Processor. Automatiserad provberedning kräver 950 µl av SurePath-provet.

Automatiserad provberedning av SurePath-prover med postgradient cellpellet.

Viktigt! Omedelbart efter beredning av SurePath-papobjektglas pipetterar du 2,0 ml SurePath-konserveringsvätska i centrifugprovröret med den postgradienta cellpelleten. Detta bevarar pelleten hel så att *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet ska fungera.

Den postgradienta cellpelleten tillsammans med SurePath-konserveringsvätska kan förvaras i högst 4 veckor vid 5–25 °C, före provberedning för *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet. Automatiserad provberedning kräver 950 µl av SurePath med postgradient cellpellet

Manuell provberedning av SurePath-prover med postgradient cellpellet

Viktigt! Omedelbart efter beredning av SurePath-papobjektglas pipetterar du 2,0 ml SurePath-konserveringsvätska i centrifugprovröret med den resterande cellpelleten. Detta bevarar pelleten hel så att *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet ska fungera.

Den postgradienta cellpelleten tillsammans med SurePath-konserveringsvätska kan förvaras i högst 4 veckor vid 2–30 °C, före provberedning för *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet.

SurePath-prover från den postgradienta cellpelleten bereds så som anges i denna bruksanvisning. Resultatet av manuell provberedning är ett denaturerat prov som är klart att gå vidare till hybridiseringssteget i testet.

Procedur

Saker som ska utföras före start

- Vid manuell testning måste det få ta minst 60 minuter för Microplate Heater I att uppnå $65\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ från en kallstart. Om du inte låter denna uppvärmningsperiod ta den tid som behövs kan hybridiseringsmikroplattan smälta. Se ytterligare anvisningar i Microplate Heater I Användarhandbok (*Microplate Heater I User Manual*).
- Om du använder ett vattenbad under denaturerings- och hybridiseringsstegen ska du se till att vattenbadet är 65 °C och att vattennivån är tillräcklig för att täcka hela provmängden i röret.

Reagensberedning

- Ta ut proverna och alla erforderliga reagenser från kylan innan testningen inleds. Låt dem uppnå $20\text{--}25\text{ °C}$ i 15–30 minuter. Bered PreservCyt- och SurePath-prover innan du låter några tidigare denaturerade prover och reagenser utjämnas till rumstemperatur.
- Om du kombinerar de bruksfärdiga reagenserna för en RCS-körning av flera plattor, ska du blanda enskilda flaskor noga och sedan kombinera rätt mängd reagens i ett rent, koniskt engångsrör av polypropylen.
- För manuell testning bereds tvättbufferten och probblandningsreagenser under särskilda steg i testningen. För RCS-automatiserad testning bereds alla reagenser innan RCS-körningen startar och placeras på RCS-däcket.
- Bered DNR och DNR2, beroende på vad som är lämpligt, innan du bereder andra reagenser.
- Kassera alla beredda reagenser (såvida inget annat angetts) och reagensalikvoter när testet är klart.
- Använd tabell 1–5 nedan för att bestämma vilken volym som behövs för varje reagens baserat på antalet tester/mikroplattor och testmetoden. Volymerna för RCS-automatiserad testning innefattar den tomma reagensvolymen som instrumentet behöver.

Tabell 1. Erforderliga volymer av beredda och bruksfärdiga reagenser för manuell testning av STM-prover och manuellt beredda PreservCyt- och SurePath-prover med postgradient cellpellet

Antal tester/strips	Probblandning	Tvättbuffert	DR1	DR2
24/3	1.04 ml	>1 liter	3 ml	3 ml
48/6	2.08 ml	>1 liter	5 ml	5 ml
72/9	3.12 ml	>1 liter	7 ml	7 ml
96/12	4.16 ml	>1 liter	12 ml	12 ml

Tabell 2. Erforderliga volymer av beredda och bruksfärdiga reagenser för RCS-automatiserad testning av STM-prover, manuellt beredda PreservCyt- och SurePath-prover med postgradient cellpellet, och SurePath och SurePath-prover med postgradient cellpellet beredda med användning av QIA Symphony DSP HPV Media-satsen

Antal mikropeltor	Probblandning	Tvättbuffert	DR1	DR2
≤1	5.20 ml	3 liter	10 ml	10 ml
≤1.5	6.24 ml	2. 3 liter	14 ml	14 ml
≤2	8.32 ml	3 liter	18 ml	18 ml
≤2.5	9.36 ml	4. 6 liter	22 ml	22 ml
≤3	10.40 ml	6 liter	26 ml	26 ml
≤3.5	12.48 ml	6. 6 liter	30 ml	30 ml
≤4	13.52 ml	6 liter	34 ml	34 ml

Tabell 3. Erforderliga volymer av beredda och bruksfärdiga reagenser för RCS-automatiserad testning av PreservCyt-prover beredda med användning av QIA Symphony DSP HPV Media-kit

Antal mikropeltor	DNR	Probblandning	Tvättbuffert	DR1	DR2
≤1	2.2 ml	5.20 ml	3 liter	10 ml	10 ml
≤1.5	2.2 ml	6.24 ml	9. 3 liter	14 ml	14 ml
≤2	2.4 ml	8.32 ml	3 liter	18 ml	18 ml
≤2.5	2.4 ml	9.36 ml	11. 6 liter	22 ml	22 ml
≤3	2.6 ml	10.40 ml	6 liter	26 ml	26 ml
≤3.5	2.6 ml	12.48 ml	13. 6 liter	30 ml	30 ml
≤4	2.8 ml	13.52 ml	6 liter	34 ml	34 ml

Tabell 4. Erforderliga volymer av beredda och bruksfärdiga reagenser för manuell testning av PreservCyt-prover beredda med användning av QIASymphony DSP AXpH DNA-kit

Antal tester/strips	DNR	DNR2	Probblandning	Tvättbuffert	DR1	DR2
24/3	0.6 ml	1.0 ml	1.04 ml	> 1 liter	3 ml	3 ml
48/6	0.6 ml	2.0 ml	2.08 ml	6. > 1 liter	5 ml	5 ml
72/9	0.6 ml	2.5 ml	3.12 ml	> 1 liter	7 ml	7 ml
96/12	0.6 ml	5.0 ml	4.16 ml	8. > 1 liter	12 ml	12 ml

Tabell 5. Erforderliga volymer av beredda och bruksfärdiga reagenser för RCS-automatiserad testning av PreservCyt-prover beredda med användning av QIASymphony DSP AXpH DNA-kit

Antal mikroplattor	DNR	DNR2	Probblandning	Tvättbuffert	DR1	DR2
≤1	2.2 ml	5.0 ml	5.20 ml	3 liter	10 ml	10 ml
≤1.5	2.2 ml	5.5 ml	6.24 ml	10. 3 liter	14 ml	14 ml
≤2	2.4 ml	6.5 ml	8.32 ml	3 liter	18 ml	18 ml
≤2.5	2.4 ml	7.7 ml	9.36 ml	12. 6 liter	22 ml	22 ml
≤3	2.6 ml	8.8 ml	10.40 ml	6 liter	26 ml	26 ml
≤3.5	2.6 ml	10.0 ml	12.48 ml	14. 6 liter	30 ml	30 ml
≤4	2.8 ml	11.0 ml	13.52 ml	6 liter	34 ml	34 ml

Denatureringsreagens

Satsen med 1 platta kommer med 50 ml denatureringsreagens och satsen med 4 plattor kommer med 2 x 100 ml denatureringsreagens. Se till att du bereder DNR i enlighet med volymen som tillhandahålls för den relevanta satsen.

Obs!

- beredd form är DNR stabilt i 3 månader vid 2–8 °C.
- Om färgen bleknar, tillsätt ytterligare 3 droppar indikatorfärg och blanda noggrant före användning

50 ml flaska

1. Tillsätt 5 droppar indikatorfärg i flaskan med 50 ml denatureringsreagens.
2. Blanda noggrant.
DNR ska ha en homogen, mörklila färg.
3. Märk DNR med det nya utgångsdatumet.

100 ml flaska

1. Tillsätt 10 droppar indikatorfärg i flaskan med 100 ml denatureringsreagens.
2. Blanda noggrant.
DNR ska ha en homogen, mörklila färg.
3. Märk DNR med det nya utgångsdatumet

Denatureringsreagens 2

Obs! DNR2 krävs bara för testning av PreservCyt-prover som beretts med användning av QIASymphony DSP AXpH DNA-kit.

1. Märk ett rent, koniskt engångsrör av polypropylen med "DNR2".
2. Tillsätt den volym som behövs av N2-buffert (se tabell 6 nedan) till den märkta behållaren.

Tabell 6. Beredning av DNR2

Erforderlig volym av DNR2	Volym av N2-buffert	Volym av D2-buffert	Indikatorfärg
1.0 ml	0.4 ml	0.6 ml	1–2 droppar
2.0 ml	0.8 ml	1.2 ml	27. 1–2 droppar
2.5 ml	1.0 ml	1.5 ml	1–2 droppar
5.0 ml	2.0 ml	3.0 ml	29. 1–2 droppar
5.5 ml	2.2 ml	3.3 ml	1–2 droppar
6.5 ml	2.6 ml	3.9 ml	31. 1–2 droppar
7.7 ml	3.1 ml	4.6 ml	1–2 droppar
8.8 ml	3.5 ml	5.3 ml	33. 1–2 droppar
10.0 ml	4.0 ml	6.0 ml	1–2 droppar
11.0 ml	4.4 ml	6.6 ml	35. 1–2 droppar

3. Tillsätt den volym som behövs av D2-buffert (se tabell 6 ovan) till den märkta behållaren.
4. Tillsätt den volym som behövs av indikatorfärg (se tabell 6 ovan) till den märkta behållaren.
Obs! Använd den indikatorfärg som medföljer *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testkitet.
5. Vortexblanda i minst 10 sekunder.
Obs! Efter beredning är DNR2 stabilt i 8 timmar vid 15–30 °C.

Probblandning

- För manuell testning ska probblandningen beredas under provdenatureringsinkubation (så som är lämpligt, se "Denaturering av kalibratorer, kvalitetskontroller och STM-prover", sida 47, eller "Denaturering av kalibratorer, kvalitetskontroller och DNA-eluat för manuell testning", sida 44).
- Var extremt försiktig för att förhindra RNAs-kontamination. Använd pipettspetsar med aerosolbarriär när proven pipetteras.
- Probspädningsvätska är viskös. Kontrollera att en synlig virvel bildas när probblandningarna bereds; ofullständig blandning kan leda till reducerad signal.
- Om flera flaskor med proven kombineras för RCS-automatiserad testning, ska proven slås ihop i en flaska och blandas med pipettering..

1. För att undvika att proben fastnar i flasklocket ska varje flaska med prob centrifugeras kortvarigt så att vätskan hamnar i flaskans botten.
2. Knacka försiktigt på flaskan för att blanda.
3. Bestäm hur stor mängd av probblandning som behövs:

Rekommendation: Bered litet extra probblandning för att täcka upp för volymen som kan gå förlorad i pipettspetsarna eller på flaskans sidor. Volymerna som anges i tabell 1–5 ovan, innefattar den rekommenderade extra volymen.

Manuell testning. Bestäm vilka volymer som behövs för en probspädning på 1:25 i probspädningsvätska för att bereda probblandningen (25 µl/test). Volymen anges i Tabell 1, sida 31, och Tabell 4, sida **Error! Bookmark not defined.**, så som är tillämpligt.

RCS-automatiserad testning: Använd volymerna som anges i Tabell 2, sida 32, Tabell 3, sida **Error! Bookmark not defined.**, eller Tabell 5, sida **Error! Bookmark not defined.**, så som är tillämpligt.
4. Märk en ny engångsbehållare med "Högrisk-HPV-probblandning".
Beroende på antalet tester rekommenderas ett polypropylenrör på 5 ml eller 15 ml med rund botten och snäpplock.
5. Tillsätt den volym som behövs av probspädningsvätska (se tabell 7 nedan) till det märkta röret.
6. Pipettera den mängd som behövs av högrisk-HPV-proben i probspädningsvätskan (se tabell 7 nedan) genom att placera pipettspetsen mot rörets innervägg strax ovanför menisken och sedan trycka ut innehållet.

Viktigt: Doppa inte spetsen i probspädningsvätskan.

Tabell 7. Beredning av probblandning

Erforderlig volym probblandning	Volym av probspädningsvätska	Volym av högrisk-HPV-prob
1.04 ml	1.0 ml	40 µl
2.08 ml	2.0 ml	80 µl
3.12 ml	3.0 ml	120 µl
4.16 ml	4.0 ml	160 µl
5.20 ml	5.0 ml	200 µl
6.24 ml	6.0 ml	240 µl
8.32 ml	8.0 ml	320 µl
9.36 ml	9.0 ml	360 µl
10.40 ml	10.0 ml	400 µl
12.48 ml	12.0 ml	480 µl
13.52 ml	13.0 ml	520 µl

7. Vortexblanda i minst 5 sekunder vid maximal hastighet för att blanda noggrant.

En synlig virvel måste framställas.

Tvättbuffert

- For manual testing, prepare the Wash Buffer during the hybrid capture step (see "För manuell testning ska du bereda tvättbufferten under hybridinfångningssteget (se "Hybridinfångning", sida 53).
 - Minimera exponering genom att tillsätta vatten till tvättbuffertkoncentratet vid beredning.
 - För den manuella mikropeltvättningmetoden bereds 3 liter tvättbuffert i tvättanordningen.
Rekommendation: Var tredje månad bör tvättanordningen och slangarna rengöras med 0,5 % natriumhypokloritlösning och sköljas noga med destillerat eller avjoniserat vatten för att förhindra möjlig kontamination av alkaliskt fosfatas som finns i bakterier och mögel.
 - För Automated Plate Washer: bered tvättbufferten och förvara den i en övertäckt behållare, eller bered 1 liter och placera den i tvättbehållaren till Automated Plate Washer.
 - För RCS-automatiserad testning, bered den angivna mängden (så som är tillämpligt, se Tabell 2, sida 32, Tabell 3, sida **Error! Bookmark not defined.**, eller Tabell 5, sida **Error! Bookmark not defined.**) i RCS-tvättflaskan
1. Blanda tvättbuffertkoncentratet väl och tillsätt den volym som behövs av tvättbuffertkoncentrat (se tabell 8 nedan) till den specificerade behållaren.
 2. Tillsätt den volym som behövs av destillerat eller avjoniserat vatten (se tabell 8 nedan) till den specificerade behållaren.

Tabell 8. Beredning av tvättbuffert

Volym av tvättbuffert som behövs	Volym tvättbuffertkoncentrat	Volym av destillerat eller avjoniserat vatten
1 liter	33.3 ml	966.7 ml
2 liters	66.6 ml	1933.4 ml
3 liters	100.0 ml	2900.0 ml
6 liters	200.0 ml	5800.0 ml

3. Placera en ren, luddfri pappershandduk över öppningarna på behållaren och blanda väl.
4. Förslut behållaren för att förhindra kontamination eller avdunstning, eller placera den i respektive instrument, beroende på vad som är tillämpligt.
5. Märk tvättbufferten med det nya utgångsdatumet.

Obs! I beredd form är tvättbufferten stabil i 3 månader vid 2–30 °C.

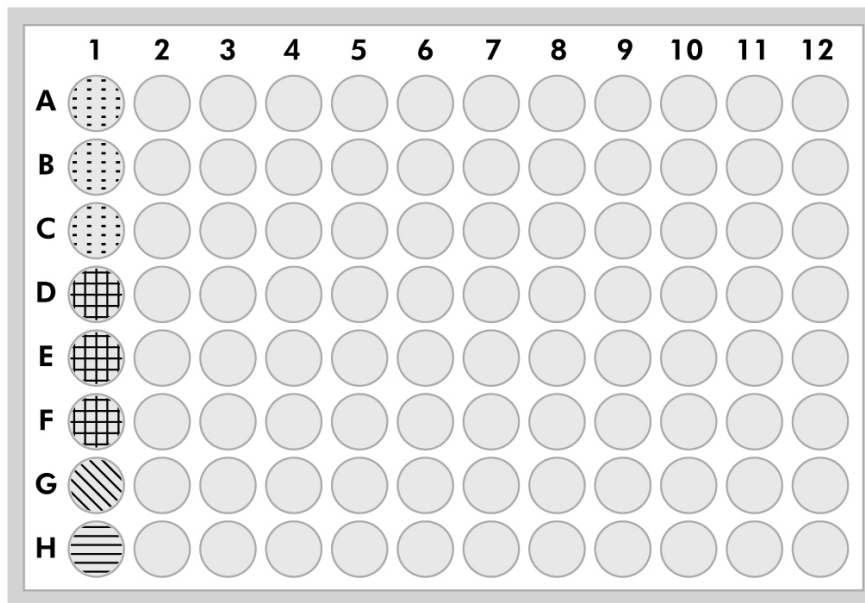
Skapa plattlayouten

1. Skapa en plattlayout med användning av analysprogramvaran för *digene*-analysen med *digene*-analysprotokoll för HPV.

Se den tillämpliga användarhandboken till programvaran för anvisningar om hur man skapar en plattlayout med rätt positioner för kalibratorerna, kvalitetskontrollerna och proven..

Obs!

- Kalibratorerna, kvalitetskontrollerna och proverna körs i en mikroplatta med en 8-brunnars kolonnkonfiguration.
- Testa kalibratorerna och kvalitetskontrollerna i följande positioner på mikroplattan (se Figur 1, sida 39):
 - Replikat av negativ kalibrator (NC) i mikroplattbrunnarna A1, B1, C1
 - Replikat av högrisk-HPV-kalibrator (HRC) i mikroplattbrunnarna D1, E1, F1
 - Lågrisk-HPV-kvalitetskontroll (QC1-LR) i mikroplattbrunn G1
 - Högrisk-HPV-kvalitetskontroll (QC2-HR) i mikroplattbrunn H1



NC



QC2-HR



HRC



Sample



QC1-LR

Figur 1: Position för kalibratorer, kvalitetskontroller och prover på mikroplattan.

Viktigt: Vid utförande av RCS-automatiserad testning ska du använda RCS-specifika analysprotokoll för att skapa plattlayouten och framställa resultat. De definierade parametrarna för de RCS-specifika analysprotokollen skiljer sig från analysprotokollen för manuell testning (se "Cutoff-beräkning", sida 62).

2. Placera kalibratorer, kvalitetskontroller och prover som ska testas i ett ställ för provinsamlingsrör eller provställ i den följd som de ska testas.

Viktigt: Under RCS-automatiserad testning är det mycket viktigt att plattlayouten motsvarar rätt prover som testas för att förhindra rapportering av felaktiga provresultat. För varje provställ och lock som används måste du bekräfta att serienumren matchar varandra och, om tillämpligt, märka varje provställ och lock i enlighet med den ordningsföljd som ska testas i RCS. Använd en penna och etikett som inte tvättas bort i vattenbadet på 65 °C.


Provberedning

PreservCyt- och SurePath-prover måste beredas före testning med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet. Beroende på vilken typ av provberedning som utförs, är de beredda proverna redo för olika steg av *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet.

Följande metoder för provberedning är tillgängliga:


- Automatiserad provberedning av PreservCyt-prover med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kit
- Automatiserad provberedning av SurePath-prover och postgradienta cellpelletar med användning av QIASymphony DSP HPV Media-satsen
- Automatiserad provberedning av PreservCyt-prover med användning av QIASymphony DSP AXpH DNA-kit
- Manuell provberedning av PreservCyt-prover
- Manuell provberedning av SurePath postgradienta cellpelletar

Provberedning av PreservCyt-prover med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kit


 Se bruksanvisningen till QIASymphony DSP HPV Media-kitet (*QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)*) när det gäller anvisningar för beredning av PreservCyt-prover med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kitet.

Important: The sample extracts produced as a result of sample preparation of PreservCyt **Viktigt:** Provextrakten som producerats som ett resultat av provberedning av PreservCyt-prover med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kit kan endast testas med RCS. Manuellt utförande av testet med provextrakt är inte validerad.

Resultatet av provberedning av PreservCyt-prover med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kitet är provextrakt i en hybridiseringsmikroplatta med den första kolonnen tom. Provextrakten innehåller magnetiska partiklar, STM och DNR och är redo för RCS-automatiserad testning vid denatureringssteget. Kalibratorerna, kvalitetskontrollerna och provextrakten denatureras samtidigt i hybridiseringsmikroplattan under RCS-automatiserad testning (se "Denaturering och hybridisering av prover beredda med användning av QIASymphony SP", sida 44).


 När du utför RCS-automatiserad testning av prover som beretts med QIASymphony SP, se Rapid Capture System Användarhandbok – Utföra *digene* HC2 DNA-tester med användning av QIASymphony SP-bearbetade prover (*Rapid Capture System User Manual – Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*) för anvisningar om hur man slutför testning.

Provberedning av SurePath-prover och SurePath postgradienta cellpelletar med användning av QIASymphony DSP HPV Media-satsen

 Se bruksanvisningen till QIASymphony DSP HPV Media-satsen för anvisningar om beredning av SurePath-prover och SurePath-prover med postgradient cellpellet med användning av QIASymphony DSP HPV Media-satsen.


Viktigt: Provextrakten som producerats som ett resultat av provberedning av SurePath-prover med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kit kan endast testas med RCS. Manuellt utförande av testet med provextrakt är inte validerad

Resultatet av provberedning av SurePath-prover och SurePath postgradient cellpellet-prover med användning av QIASymphony DSP HPV Media Kit är kalibratorer, kvalitetskontroller och provextrakt i en hybridiseringsmikroplatta som är klar för RCS-automatiserad testning vid hybridiseringssteget i testet

 När du utför RCS-automatiserad testning av prover som beretts med QIASymphony SP, se Rapid Capture System Användarhandbok – Utföra *digene* HC2 DNA-tester med användning av


QIASymphony SP-bearbetade prover (*Rapid Capture System User Manual – Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*) för anvisningar om hur man slutför testning.

Provberedning av PreservCyt-prover med användning av QIASymphony DSP AXpH DNA-kit

 Se handboken till QIASymphony DSP AXpH DNA-kitet (*QIASymphony DSP AXpH DNA Kit Handbook*) för anvisningar om provberedning av PreservCyt-prover.

Resultatet av provberedning av PreservCyt-prover med användning av QIASymphony DSP AXpH DNA-kitet är DNA-eluat i en hybridiseringsmikroplatta med den första kolonnen tom. DNA-eluatet är redo för denatureringssteget i testet. Kalibratorerna, kvalitetskontrollerna och DNA-eluatet denatureras samtidigt på hybridiseringsmikroplattan (se "Denaturering och hybridisering av prover beredda med användning av QIASymphony SP", sida 44).

Manuell provberedning av PreservCyt-prover

 Se bruksanvisningen till *digene* HC2 Sample Conversion-kit när det gäller manuell provberedning av PreservCyt-prover.

Manuell provberedning av PreservCyt-prover med användning av *digene* HC2 Sample Conversion-kit leder till prover som är redo för hybridiseringssteget i testet. Bered kalibratorerna och kvalitetskontrollerna separat (se "Denaturering av kalibratorer, kvalitetskontroller och STM-prover", sida 47).

Manuell provberedning av SurePath postgradienta cellpelletar

Manuell provberedning av SurePath postgradienta cellpelletar leder till prover som är redo för hybridiseringssteget i testet. Bered kalibratorerna och kvalitetskontrollerna separat (se "Denaturation of calibrators, quality controls and STM specimens", sida **Error! Bookmark not defined.**).

Viktigt! Om cellpelleten för SurePath-provet verkar innehålla mindre än 1 ml efter gradientcentrifugering, är den postgradienta cellpelleten inte lämpligt för testning med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet eftersom SurePath-konserveringsvätskan inte tillsattes efter cytologi.

1. Utjämna SurePath postgradienta cellpelletar till rumstemperatur och bekräfta att den observerade vätskevolymen är lika med cirka 2,8 ml.

2. Centrifugera SurePath postgradienta cellpelletar i en rotor med en svängande bågare vid $800 \pm 15 \times g$ i 10 ± 1 minuter.
3. Avlägsna rören från centrifugen.
4. Omedelbart efter centrifugering ska supernatanten dekanteras försiktigt och varje rör ska försiktigt torkas av cirka 3 gånger på Kimtowels-torkar eller motsvarande luddfria pappershanddukar för att avlägsna överskott på vätska. Observera pelleten i varje rör.
Viktigt: Låt inte cellpelletarna glida ned i röret under torkning.
5. Placera rören i stället.
6. Tillsätt 200 μ l STM till varje pellet med en repeterande eller enkanalig pipett.
7. Resuspendera varje pellet genom att vortexblanda varje rör individuellt i 15 sekunder vid hög hastighet.
Om det är svårt att resuspendera pelleten kan du vortexblanda i ytterligare 5–30 sekunder eller tills pelleten flyter fritt från rörets botten och verkar lösas upp.
Obs! Rör kan blandas utan lock.
8. Pipettera 100 μ l av DNR i varje SurePath-prov med en repeterande eller enkanalig pipett.
Viktigt: Se till att du inte vidrör sidorna i röret för att förhindra korskontaminering av proverna.
9. Blanda varje rör noga genom att vortexblanda dem individuellt, vid hög hastighet, i minst 5 sekunder.
Obs! Rör kan blandas utan lock.
10. Märk *digene* HC2 Sample Conversion-rör eller 15 ml koniska rör med lämplig providentifiering och -typ (t.ex. "SP" för ett SurePath-prov) och sätt rören i ett rörställ.
Obs! Vid RCS-automatiserad testning måste *digene* HC2 Sample Conversion-rör användas.
11. Överför hela volymen till tillämpligt 15 ml koniskt rör med en 7 ml överföringspipett för engångsbruk med standardspets eller motsvarande.
12. Förslut de koniska rören och sätt dem i ett rörställ.
13. Inkubera rören i ett vattenbad på 65 ± 2 °C i 90 ± 5 minuter.
Obs! Denna inkubationstid är längre än vad som behövs för andra godkända provtyper.
Om testning ska slutföras samma dag, ska du denaturera kalibratorer och kvalitetskontroller (se "Denaturering av kalibratorer, kvalitetskontroller och STM-prover", sida 47).
14. Avlägsna rörstället från vattenbadet efter inkubationen.

Om du använder ett provställ får det inte svalna innan du tar bort ställets lock. Fortsätt omedelbart med testningen eller avlägsna ställets lock och DuraSeal-rörförseglingsfilmen.

Obs! Om provstället svalnar kan rören fastna vid ställets lock varefter deras innehåll kan spillas ut.

Beredda SurePath-prover kan:

- Testas omedelbart (gå vidare till "Hybridization of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples," sida 49)
- Förvaras (se "Optional stop point of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples," sida 48)


Denaturering och hybridisering av prover beredda med användning av QIASymphony SP

Resultatet av provberedning i QIASymphony SP är en hybridiseringsmikroplatta som innehåller minst de beredda proven.

Om PreservCyt-prover bereds med användning av QIASymphony SP är den första kolonnen i hybridiseringsmikroplattan tom. Innehållet i mikroplattan är redo för denatureringssteget i testet. Kalibratorerna och kvalitetskontrollerna tillsätts till hybridiseringsmikroplattan antingen manuellt eller under RCS-automatiserad testning, varefter denatureringssteget utförs

Om SurePath-prover eller SurePath-prover med postgradient cellpellet bereds med användning av QIASymphony SP innehåller den första plattan de beredda proverna med de denaturerade kalibratorerna och kvalitetskontrollerna pipetterade i den första kolonnen i hybridiseringsmikroplattan. Innehållet i mikroplattan är redo för RCS-automatiserad testning i hybridiseringssteget i testet.

Viktigt: Provextrakten som producerats som ett resultat av provberedning med användning av QIASymphony DSP HPV Media-satsen kan endast testas med RCS. Manuellt utförande av testet med provextrakt är inte validerad.

 När du utför RCS-automatiserad testning av prover som beretts med QIASymphony SP, se Rapid Capture System Användarhandbok – Utföra *digene* HC2 DNA-tester med användning av QIASymphony SP-bearbetade prover (*Rapid Capture System User Manual – Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*) för anvisningar om hur man slutför testning.

Denaturering av kalibratorer, kvalitetskontroller och DNA-eluat för manuell testning

- Denna procedur är avsedd för manuell testning av PreservCyt-prover beredda med användning av QIASymphony DSP AXpH DNA-kit. Om du utför RCS-automatiserad testning, se Rapid Capture System Användarhandbok – Utföra *digene* HC2 DNA-tester med användning av QIASymphony SP-bearbetade prover (*Rapid Capture System User Manual – Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*) för anvisningar om hur man slutför testning.
- Denaturering av kalibratorer och kvalitetskontroller utförs med användning av DNR, medan denatureringen av DNA-eluat utförs med användning av DNR2.

1. Vortexblanda varje kalibrator och kvalitetskontroll i 10 sekunder på maximal inställning.

2. Vänd varje rör för att få med material från rörlocket.
3. Avlägsna locken från kalibrator- och kvalitetskontrollrören och kassera.
4. Använd en enkanalspipett och tillsätt 50 µl av tillämplig kalibrator eller kvalitetskontroll i botten på en tom brunn på hybridiseringsmikroplattan enligt den skapade plattlayouten.
Om kalibratoren och kvalitetskontrollerna ska användas för ytterligare testning, försluter du rören med nya lock för provtagningsrör, märker dem med ett nytt utgångsdatum och förvarar dem vid 2–8 °C.

Obs! De öppnade, icke denaturerade kalibratorerna och kvalitetskontrollerna är stabila i 3 månader vid 2–8 °C.

5. Vortexblanda de beredda DNR och DNR2 noga, och fördela dem i alikvoter i en lämpligt märkt reagensbehållare för engångsbruk.

Viktigt: Kontrollera att du tillsätter rätt reagens till rätt kolonn på eluatmikroplattan.

6. Använd en 8-kanalspipett och tillsätt 25 µl DNR till den första kolonnen på hybridiseringsmikroplattan som innehåller kalibratorerna och kvalitetskontrollerna.
7. Använd en 8-kanalspipett och tillsätt 25 µl DNR2 till varje brunn på hybridiseringsmikroplattan som innehåller ett DNA-eluat.
8. Täck hybridiseringsmikroplattan med ett mikroplattlock och skaka i 30 sekunder på Rotary Shaker I inställd på 1100 ± 100 rpm.
9. Placera mikroplattan i Microplate Heater I utjämnad till 65 ± 2 °C och se till att undvika stänk. Inkubera hybridiseringsmikroplattan i 45 ± 5 minuter.

Bered probblandningen under denna inkubation (se "Probblandning", sida 35).

10. Ta bort hybridiseringsmikroplattan från Microplate Heater I.

Denaturerade kalibrators, kvalitetskontroller och DNA-eluat kan:

- förvaras (se "Valfri stoppunkt för DNA-eluat", sida 45)
- testas omedelbart (gå vidare till "Hybridisering av DNA-eluat", sida 46)

Valfri stoppunkt för DNA-eluat

Denaturerade DNA-eluat, inklusive kalibrators och kvalitetskontroller, täckta med ett mikroplattlock, kan förvaras vid 2–8 °C i 2 veckor

Hybridisering av DNA-eluat

1. Om hybridiseringsmikroplattan som innehåller de denaturerade kalibratorerna, kvalitetskontrollerna och DNA-eluaten har förvarats, ska du avlägsna mikroplattlocket och låta hybridiseringsmikroplattan utjämna till 20–25 °C.
- 2.
3. Vortexblanda probblandningen noga och fördela i alikvoter i en reagensbehållare för engångsbruk.
4. Pipettera försiktigt 25 µl av probblandningen i varje brunn på hybridiseringsmikroplattan med en 8-kanalspipett och nya spetsar för varje probblandningstilläts.
Undvik stänk och vidrör inte sidorna i brunnarna på hybridiseringsmikroplattan.
5. Täck hybridiseringsmikroplattan med ett mikroplattlock och skaka i 3 ± 2 minuter på Rotary Shaker I inställd på $1\ 100 \pm 100$ rpm (varv per minut).
Efter skakning ska kalibratorerna, kvalitetskontrollerna och DNA-eluaten bli gula.
Prover som fortfarande är lila har eventuellt inte fått rätt mängd probblandning. Tillsätt ytterligare 25 µl probblandning till proverna som fortfarande är lila och skaka igen. Om ett prov fortfarande är lila efter denna procedur ska provet testas igen.
6. Placera mikroplattan i Microplate Heater I utjämnad till 65 ± 2 °C och se till att undvika stänk. Inkubera hybridiseringsmikroplattan i 60 ± 5 minuter.
Fortsätt till "Hybridinfångning", sida 53, för att fortsätta med testningen.

Denaturering och hybridisering av STM-prover och manuellt beredda PreservCyt- och SurePath-prover med postgradient cellpellet

- Vid testning av manuellt beredda PreservCyt- och SurePath-prover med postgradient cellpellet behövs inte något denatureringssteg för proverna. De kalibratörer och kvalitetskontroller som krävs för testet är dock denaturerade i enlighet med anvisningarna nedan.
- Vissa STM-prover kan innehålla blod eller andra biologiska material som kan dölja färgförändringarna vid tillsats av DNR. Prover som har en mörk färg före tillsats av DNR kan leda till att färgförändringen inte blir korrekt i detta steg. I dessa fall påverkar avsaknad av korrekt färgförändring inte testresultaten. Du kan verifiera korrekt blandning genom att observera färgförändringen hos kalibratörer och kontroller.

Denaturering av kalibratorer, kvalitetskontroller och STM-prover

- Avlägsna inte provtagningsinstrumentet från provröret vid något tillfälle.
- Blandning efter tillsats av DNR är ett avgörande steg. Det är viktigt att allt provmaterial kommer i kontakt med DNR för att förhindra falska positiva resultat.
- STM-prover som är denaturerade med MST Vortexer 2-metoden måste man använda metoden "Hybridisering med en mikroplatta och Microplate Heater 1" på sida **Error! Bookmark not defined.** Metoden "Hybridisering med mikrorör och vattenbad" (sida **Error! Bookmark not defined.**) har inte validerats med STM-proverna som är denaturerade med MST Vortexer 2.

1. Avlägsna locken från rören och kassera locken.

Viktigt: Lock som avlägsnats från rör med STM-prover ska betraktas som potentiellt smittsamma (se "Varningar och försiktighet", sida 21, för mer information).

2. Pipettera den specificerade volymen (se tabell 9 nedan) av DNR i rören med en repeterande eller justerbar pipett.

Se till att du inte vidrör sidorna i rören för att förhindra korskontaminering av proverna.

Viktigt: Kiten med 1 respektive 4 plattor har olika volymer av högrisk-HPV-kalibratören. Kontrollera att rätt volym av DNR tillsätts.

Obs! Den volym av DNR som tillsätts motsvarar halva vätskevolymen i röret

Tabell 9. Tillsats av DNR

Kalibrator, kvalitetskontroll eller STM-prov	Erforderlig volym av DNR
Negativ kalibrator, 2 ml	1000 µl
Högrisk-HPV-kalibrator, 1 ml	500 µl
Högrisk-HPV-kalibrator, 2 ml	1000 µl
Lågrisk-HPV- eller högrisk-HPV-kvalitetskontroll, 1 ml	500 µl
STM-prov, 1 ml	500 µl

3. Blanda rören med antingen MST Vortexer 2-metoden eller den manuella vortexblandningsmetoden för enskilda rör.

MST Vortexer 2-metod

- a. Täck rören med DuraSeal-film genom att dra filmen över rören i provstället.
- b. Placera ställets lock över de filmtäckta rören och lås det på plats med de 2 sidoklämmorna. Skär filmen med skärinstrumentet.

- c. Flytta den röda spaken till UPP-läget så att den är vågrät.
- d. Placera provstället säkert inom skenorna på MST Vortexer 2 och med hörnet med störst skåror placerat i det högra, främre hörnet. Säkra provstället genom att flytta den röda spaken till "nedåtläget" så att den är lodrät.
- e. Kontrollera att hastighetsinställningen är vid 100 (maximal hastighet), och sätt PÅ MST Vortexer 2.
- f. Vortexblanda rören i 10 sekunder.
- g. Stäng AV MST Vortexer 2.

Avlägsna provstället från MST Vortexer 2 genom att flytta den röda spaken till uppåtläget.

Manuell vortexblandningsmetod för enskilda rör

- a. Förslut rören igen med nya provrörsskruvlock.
- b. Blanda varje rör noga genom att vortexblanda dem individuellt, vid hög hastighet, i minst 5 sekunder.
Viktigt: Under blandning måste en synlig vätskevirvel observeras som sköljer över hela rörets insida.
- c. Vänd varje rör en gång för att skölja rörets insida, locket och kanten.
- d. Sätt röret i stället igen.

Vätskan i röret ska färgas lila

4. Inkubera rören i ett ställ i ett vattenbad på 65 ± 2 °C i 45 ± 5 minuter.

För manuell testning, bered probblandningen som behövs under denna inkubation (se "Probblandning", sida 35).

5. Avlägsna rören från vattenbadet efter inkubationen.

Om du använder ett provställ får det inte svalna innan du tar bort ställets lock. Fortsätt omedelbart med testningen eller avlägsna ställets lock och DuraSeal-rörförseglingensfilmen.

Note: If the specimen rack cools, tubes may stick to the rack lid and subsequently spill.

Denaturerade kalibratorer, kvalitetskontroller och STM-prover kan:

- Förvaras (se "Optional stop point of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples," sida 48)
- Testas omedelbart (gå vidare till "Hybridization of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples," sida 49)

Valfri stoppunkt för beredda STM-prover och manuellt beredda PreservCyt- och SurePath-prover med postgradient cellpellet


Viktigt: Denaturerade prover får inte förvaras eller transporteras på kolsyreis.

Alla beredda prover, inklusive kalibratorer och kvalitetskontroller, kan förvaras vid 2–8 °C över natten eller vid –20 °C i upp till 3 månader. Prover får frysas och tinas maximalt 3 gånger och förvaras maximalt 2 timmar i rumstemperatur under varje tningscykel.

För förvaring över natten vid 2–8 °C i provstället ska proven täckas med DuraSeal-rörförseglingsfilm och ställets lock ska sättas på.

För förvaring vid –20 °C i provstället ska ställets lock och DuraSeal-filmen avlägsnas och tillämpliga lock ska placeras på rören.

Hybridisering för beredda STM-prover och manuellt beredda PreservCyt- och SurePath-prover med postgradient cellpellet

 Vid utförande av RCS-automatiserad testning av STM-prover eller manuellt beredda PreservCyt- och SurePath-prover med postgradient cellpellet, se *Rapid Capture System Användarhandbok* för anvisningar om hur man slutför testning.

Om de denaturerade kalibratorerna, kvalitetskontrollerna eller proverna har förvarats, måste de få utjämnas till 20–25 °C och, om de förvaras i ett provställ, ska locken avlägsnas från rören och kasseras.

- Två hybridiseringsmetoder är tillgängliga för STM-prover och manuellt beredda PreservCyt- och SurePath-prover med postgradient cellpellet: "Hybridisering med mikroplatta och Microplate Heater I" och "Hybridisering med mikrorör och vattenbad".
- Till STM-prover som är denaturerade med MST Vortexer 2-metoden måste man använda "Hybridisering med en mikroplatta och Microplate Heater I" på sida **Error! Bookmark not defined..** "Hybridisering med mikrorör och vattenbad" (sida **Error! Bookmark not defined.**) har inte validerats med STM-proverna som är denaturerade med MST Vortexer 2.
- Probblandning är viskös. Kontrollera att probblandningen är väl blandad och att den volym som behövs dispenserar fullständigt i varje brunn på hybridiseringsmikroplattan eller i hybridiseringsmikroröret.
- När provet överförs till hybridiseringsmikroplattan eller hybridiseringsmikroröret måste du undvika att vidröra sidorna på brunnarna på hybridiseringsmikroplattan eller hybridiseringsmikrorören eftersom falska positiva resultat kan uppkomma om prover inte överförs försiktigt. Begränsa bildandet av luftbubblor. Använd en ren, extra-lång pipettspets för varje överföring för att undvika korskontamination.

Hybridisering med en mikroplatta och Microplate Heater I

1. Ta fram och märk en hybridiseringsmikroplatta.
2. Vortexblanda med en av följande metoder:

Kalibratörer, kvalitetskontroller eller STM-prover med MST Vortexer 2

- a. Täck rören om så önskas med DuraSeal-rörförseglingsfilm och säkra ställets lock på provstället.
- b. Vortexblanda provstället i minst 5 sekunder med högsta hastighet.
- c. Placera omedelbart provstället på bänken och öppna spärrarna. Lyft ställets lock cirka 1 cm och flytta det försiktigt åt vänster och höger för att frigöra rör som eventuellt har fastnat på DuraSeal-rörförseglingsfilmen. Ta bort ställets lock genom att lyfta det rakt upp tills det släpper från provstället.
- d. Dra försiktigt bort DuraSeal-rörförseglingsfilmen från locket och kasta den.

PreservCyt- eller SurePath-prover med MST Vortexer 2

- a. Täck rören om så önskas med DuraSeal-rörförseglingsfilm och säkra ställets lock på provstället.
- b. Vortexblanda konverteringsstället i minst 10 sekunder med högsta hastighet.
- c. Placera omedelbart provstället på bänken och öppna spärrarna. Lyft ställets lock cirka 1 cm och flytta det försiktigt åt vänster och höger för att frigöra rör som eventuellt har fastnat på DuraSeal-rörförseglingsfilmen. Ta bort ställets lock genom att lyfta det rakt upp tills det släpper från provstället.

Dra försiktigt bort DuraSeal-rörförseglingsfilmen från locket och kasta den.

Alla provtyper med vortexblandare

Vortexblanda varje rör individuellt i minst 5 sekunder.

3. Använd EXPAND-4-pipetten eller en enkanalspipett med en extra lång pipettspets och överför 75 µl av varje kalibrator, kvalitetskontroll eller prov till botten på en tom brunn på en hybridiseringsmikroplatta enligt den skapade plattlayouten.

Om proverna ska sparas försluter du denaturerade kalibratörer, kvalitetskontroller och STM-prover med nya skruvlock till provrör, och placerar originallocket till varje prov på PreservCyt- och SurePath-proverna med postgradient cellpellet.

Obs! Förvara proverna enligt gränsvärdena som anges i "Optional stop point of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples," sida 48

4. När det sista provet har överförts ska hybridiseringsmikroplattan täckas med ett mikroplattlock och inkuberas i 10 minuter vid 20–25 °C.
5. Vortexblanda probblandningen nogga och fördela i alikvoter i en reagensbehållare för engångsbruk.

6. Pipettera försiktigt 25 µl av probblandningen i varje brunn på hybridiseringsmikroplattan med en 8-kanalspipett och nya spetsar för varje probblandningstilläts.

Undvik stänk och vidrör inte sidorna i brunnarna på hybridiseringsmikroplattan.

7. Täck hybridiseringsmikroplattan med ett mikroplattlock och skaka i 3 ± 2 minuter på Rotary Shaker I inställd på 1100 ± 100 rpm (varv per minut).

Efter skakning ska kalibratorerna, kvalitetskontrollerna, STM-proverna och SurePath-proverna bli gula och PreservCyt-proverna ska bli rosa.

Prover som fortfarande är lila har eventuellt inte fått rätt mängd probblandning. Tillsätt ytterligare 25 µl probblandning till proverna som fortfarande är lila och skaka igen. Om ett prov fortfarande är lila efter denna procedur ska provet testas igen.

8. Placera mikroplattan i Microplate Heater I utjämnad till 65 ± 2 °C och se till att undvika stänk. Inkubera hybridiseringsmikroplattan i 60 ± 5 minuter.
9. Fortsätt till "Hybridinfångning", sida 53, för att fortsätta med testningen.

Hybridisering med mikrorör och vattenbad

1. Märk och placera erforderligt antal rena hybridiseringsmikrorör i mikrorörstället.
2. Vortexblanda varje kalibrator, kvalitetskontroll och provrör individuellt i minst 5 sekunder innan du avlägsnar provet.
3. Använd en enkanalspipett med en extra lång pipettspets och överför 75 µl av varje kalibrator, kvalitetskontroll eller prov till botten på det tillämpliga hybridiseringsmikroröret enligt den skapade plattlayouten.

Om proverna ska sparas försluter du denaturerade kalibratorer, kvalitetskontroller och STM-prover med nya skruvlock till provrör, och placerar originallocket till varje prov på PreservCyt- och SurePath-proverna med postgradient cellpellet.

Obs! Förvara proverna enligt gränsvärdena som anges i "Optional stop point of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples," sida 48.

4. När det sista provet har överförts ska hybridiseringsmikrorören inkuberas i 10 minuter vid 20–25 °C.
5. Vortexblanda probblandningen noga och fördela i alikvoter i en reagensbehållare för engångsbruk.
6. Pipettera försiktigt 25 µl av probblandningen i varje hybridiseringsmikrorör med en 8-kanalspipett och nya spetsar för varje rad.

Undvik stänk och vidrör inte sidorna i hybridiseringsmikrorören.

Inspektera stället underifrån för att försäkra dig om att alla hybridiseringsmikrorör har fått rätt mängd probblandning.

7. Täck hybridiseringsmikrorören med en plattförseglare. Placera ställets lock ovanpå stället. Skaka mikrorörstället i 3 ± 2 minuter på Rotary Shaker I inställd på 1100 ± 100 rpm. Efter skakning ska kalibratorerna, kvalitetskontrollerna, STM-proverna och SurePath-proverna med postgradient cellpellet bli gula och PreservCyt-proverna ska bli rosa.. Prover som fortfarande är lila har eventuellt inte fått rätt mängd probblandning. Tillsätt ytterligare 25 μ l probblandning till proverna som fortfarande är lila och skaka igen. Om ett prov fortfarande är lila efter denna procedur ska provet testas igen.
8. Inkubera mikrorörstället i 60 ± 5 minuter i ett vattenbad på 65 ± 2 °C. Kontrollera att vattennivån i vattenbadet räcker för att täcka hela volymen av hybridiseringsmikrorör.
Obs! Mikrorörstället flyter i vattenbadet.
9. Fortsätt till "Hybridinfångning", sida 53, för att fortsätta med testningen.

Hybridinfångning

1. Avlägsna alla utom det erforderliga antalet brunnar på infångningsmikroplattan från plattramen.
2. Lägg tillbaka de oanvända brunnarna till infångningsmikroplattan i originalpåsen och förslut den.
3. Använd en märkpena för att numrera varje kolonn i följd och märk infångningsmikroplattan med en tillämplig identifiering.

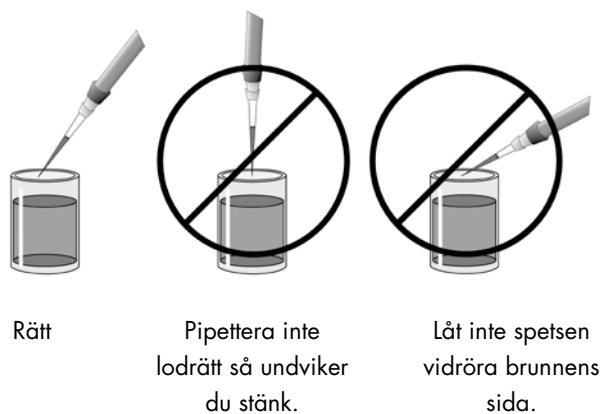
Proverna tillsätts till brunnarna på infångningsmikroplattan enligt den skapade plattlayouten.

4. Avlägsna försiktigt, så som är tillämpligt, hybridiseringsmikroplattan från Microplate Heater I eller mikrorörstället från vattenbadet.

Ta omedelbart av mikroplattlocket och lägg det på en ren yta eller ta av ställets lock och dra sakta plattförseglaren upp och över mikrorörstället.

5. Använd en 8-kanalspipett och överför hela innehållet (cirka 100 µl) i brunnarna på hybridiseringsmikroplattan eller hybridiseringsmikrorören till botten av de motsvarande brunnarna på infångningsmikroplattan.

Använd nya pipettspetsar för varje överföring och låt varje pipettspets tömmas helt för att se till att det sker en fullständig provöverföring. Om så önskas kan pipetten stadgas genom att mitten på pipettspetsarna får vila på den övre kanten av brunnarna på infångningsmikroplattan (se Figur 2, nedan).



Figur 2. Korrekt pipettering.

6. Täck infångningsmikroplattan med mikroplattlocket eller en ny plattförseglare och skaka i 60 ± 5 minuter på Rotary Shaker I med 1100 ± 100 rpm vid 20–25 °C.

Bered tvättbufferten under denna inkubation (se "Tvättbuffert", sida 37).

7. När inkubationen är klar tar du bort infångningsmikroplattan från Rotary Shaker I och avlägsnar försiktigt mikroplattlocket eller plattförseglaren.
8. Avlägsna vätskan från brunnarna på infångningsmikroplattan genom att hälla ut den i en vask; vänd infångningsmikroplattan upp och ner över vasken och skaka hårt med en nedåtriktad rörelse.

Viktigt: Vänd inte tillbaka mikroplattan igen.

Kontrollera att du inte ger upphov till stänk genom att dekantera alltför nära vaskens botten.

9. Torka genom att knacka plattan hårt 2–3 gånger på rena Kimtowels-torkar eller motsvarande luddfria pappershanddukar.

Kontrollera att all vätska har avlägsnats från brunnarna på infångningsmikroplattan och att ovansidan på infångningsmikroplattan är torr.

10. Fortsätt till "Hybriddetektion", sida 55, för att fortsätta med testningen.

Hybriddetektion

- Utför reagenstillsetser över infångningsmikroplattan från vänster till höger med en 8-kanalspipett. Torka av spetsarna på en reagensbehållare för engångsbruk för att avlägsna överskott på reagens före tillförsel till mikroplattan.
 - Om inte en 8-kanalspipett används kan en repeterande pipett användas. Alikvoter DR1 i ett polypropylenrör med tillräcklig storlek för att rymma den volym som behövs.
 - Vi rekommenderar att den omvända pipetteringstekniken används för att förbättra enhetligheten för reagenstillset. Proceduren beskrivs nedan.
 - Om så önskas kan pipetten stadgas genom att mitten på pipettspetsarna får vila på den övre kanten av brunnarna på infångningsmikroplattan. Kontrollera att sidorna på brunnarna på infångningsmikroplattan inte vidrörs eftersom prover då kan korskontamineras (se Figur 2, sida 53).
1. Blanda DR1 noga och överför försiktigt tillämplig volym (om tillämpligt, se Tabell 1, sida 31, eller Tabell 4, sida **Error! Bookmark not defined.**) i en ren reagensbehållare för engångsbruk.
 2. Pipettera försiktigt 75 µl av DR1 i varje brunn på infångningsmikroplattan med den omvända pipetteringstekniken, på följande sätt:
 - a. Sätt fast spetsar på en 8-kanalspipett; kontrollera att alla spetsar sitter säkert.
 - b. Tryck pipettkolven förbi det första stoppet till det andra stoppet.
 - c. Sänk ner spetsarna i reagenset.
 - d. Släpp kolven sakta och låt reagenset fylla spetsarna.
 - e. Dispensera reagenset i brunnarna på mikroplattan genom att trycka ned kolven till det första stoppet. Släpp inte kolven förrän pipettspetsarna har sänkts ner i reagenset.
 - f. Fyll spetsarna igen och upprepa tills alla brunnar på mikroplattan är fyllda.

Se till att alla brunnar på infångningsmikroplattan är fyllda genom att observera den rosa färgens intensitet. Alla brunnar på infångningsmikroplattan ska ha samma rosa färgintensitet.
 3. Täck infångningsmikroplattan med ett mikroplattlock, ren Parafilm eller motsvarande, och inkubera i 30–45 minuter vid 20–25 °C.
 4. Fortsätt till "Tvätt", sida 56, för att fortsätta med testningen.

Tvätt

Tvätta infångningsmikroplattan med en av nedanstående metoder.

Metod för Automated Plate Washer

Automated Plate Washer ska alltid vara PÅ. Kontrollera att sköljbehållaren är fylld och att avfallsbehållaren är tom. Automated Plate Washer sköljer rutinmässigt systemet för rengöring. Se Automated Plate Washer Användarhandbok (*Automated Plate Washer User Manual*) för vidare anvisningar.

- Se till att tvättbehållaren är fylld åtminstone till 1-litersmärket med tvättbuffert. Om inte, bered tvättbufferten (se "Tvättbuffert", sida 37).
 - Se till att sköljbehållaren är fylld med avjoniserat eller destillerat vatten.
 - Se till att avfallsbehållaren är tom och att locket är säkert fastsatt.
 - Automated Plate Washer primas automatiskt före varje tvätt och sköljs efter varje tvätt.
 - Om endast en partiell strip med brunnar används på en infångningsmikroplatta, ska tomma mikroplattbrunnar placeras i infångningsmikroplattan för att komplettera kolonnen före tvätt.
1. Ta av mikroplattlocket och placera infångningsmikroplattan på plattformen till Automated Plate Washer.
 2. Se till att Automated Plate Washer är PÅ, och att displayen visar Digene Wash Ready (Digene-tvätt klar) eller P1.
 3. Välj antalet strips som ska tvättas genom att trycka på knappen Rows (rader) och sedan på + eller – för att justera.
 4. Tryck på knappen Rows för att återgå till Digene Wash Ready eller P1.
 5. Tryck på knappen Start/Stop (starta/stoppa) för att börja.
Automated Plate Washer utför 6 fyllnings- och aspirationsomgångar vilket tar cirka 10 minuter. Det görs en kortvarig paus under programmet; ta inte ut mikroplattan för tidigt.
När Automated Plate Washer är klar med tvätten visar displayen "Digene Wash Ready" eller "P1".
 6. Ta bort infångningsmikroplattan från plattformen i Automated Plate Washer när programmet är slut.
Infångningsmikroplattan ska vara vit, och det ska inte vara några rester av rosa vätska kvar i brunnarna på infångningsmikroplattan.
 7. Fortsätt till "Signalförstärkning", sida 58, för att fortsätta med testningen

Manuell tvättmetod

1. Avlägsna DR1 från brunnarna på infångningsmikroplattan genom att lägga rena Kimtowels-torkar eller motsvarande luddfria pappershanddukar ovanpå infångningsmikroplattan.
2. Se till att pappershanddukarna är i kontakt med hela ytområdet på infångningsmikroplattan, och vänd försiktigt upp och ner.
3. Låt infångningsmikroplattan rinna av i 1–2 minuter.
4. Låt torka väl på rena Kimtowels-torkar eller motsvarande luddfria pappershanddukar.
Kassera noga de använda pappershanddukarna för att undvika kontamination med alkaliskt fosfatas.
5. Använd tvättanordningen för att tvätta infångningsmikroplattan manuellt 6 gånger.
För att få en tillräcklig tvätteffekt ska alla brunnar på infångningsmikroplattan överflödas med tvättbuffert. Detta avlägsnar DR1 från toppen på brunnarna på infångningsmikroplattan. Tvättning börjar med brunn A1 på infångningsmikroplattan och fortsätter på ett slingrande sätt åt höger och nedåt. När alla brunnar på infångningsmikroplattan är fyllda, ska vätskan dekanteras i vasken med en kraftig nedåtriktad rörelse. Den andra tvätten börjar med brunn H12 på infångningsmikroplattan och fortsätter i en slingrande rörelse åt vänster och uppåt. Denna sekvens med 2 tvättar upprepas ytterligare 2 gånger för totalt 6 tvättar per brunn på infångningsmikroplattan.
6. Efter tvätt ska infångningsmikroplattan torkas genom att den vänds upp och ner på rena Kimtowels-torkar eller motsvarande luddfria pappershanddukar. Knacka hårt på den 3–4 gånger. Byt ut pappershanddukarna och gör om proceduren.
7. Låt infångningsmikroplattan ligga upp och ned och rinna av 5 minuter. Torka infångningsmikroplattan en gång till.
Infångningsmikroplattan ska vara vit, och det ska inte vara några rester av rosa vätska kvar i brunnarna på infångningsmikroplattan.
8. Fortsätt till "Signalförstärkning", sida 58, för att fortsätta med testningen.

Signalförstärkning

- Använd ett nytt par handskar när du hanterar DR2.
 - Utför reagenstillsetser över infångningsmikroplattan från vänster till höger med en 8-kanalspipett.
 - Om inte en 8-kanalspipett används kan en repeterande pipett användas. Alikvotera DR2 i ett polypropylenrör med tillräcklig storlek för att rymma den volym som behövs.
 - Tillsätt DR2 utan avbrott. Inkubationstiderna för brunnarna på infångningsmikroplattan måste vara så nära varandra som möjligt (utan uppehåll mellan brunnarna).
 - Kontrollera att du inte vidrör sidorna på brunnarna på infångningsmikroplattan och att du inte får reagensstänk på pipettspetsarna eftersom prover då kan korskontamineras (se **Figur 2**, sida 53).
1. Blanda DR2 noga och överför tillämplig volym (om tillämpligt, se Tabell 1, sida 31, eller Tabell 4, sida **Error! Bookmark not defined.**) i en ren reagensbehållare för engångsbruk.
 2. Pipettera försiktigt 75 µl av DR2 i varje brunn på infångningsmikroplattan med den omvända pipetteringstekniken som har beskrivits tidigare (se "Hybriddetektion", sida 55).
Se till att alla brunnar på infångningsmikroplattan har fyllts tillräckligt genom att observera den gula färgens intensitet; alla brunnar på infångningsmikroplattan ska ha en likvärdig gul färgintensitet.
 3. Täck infångningsmikroplattan med ett mikroplattlock och inkubera vid 20–25 °C i 15 minuter (och högst 30 minuters inkubation).
Viktigt: Undvik direkt solljus.
 4. Fortsätt till "Mäta infångningsmikroplattan och framställa resultat", sida 59, för att fortsätta med testningen.

Mäta infångningsmikroplattan och framställa resultat

1. Mät infångningsmikroplattan med ett DML-instrument.

Se användarhandboken till respektive programvara för mer information om hur man mäter en infångningsmikroplatta och framställer testresultatsrapporter. Analysprogramvaran till *digene*-analysen möjliggör inmatning av viktig testinformation.

2. Om du inte använde en full infångningsmikroplatta, tar du bort infångningsmikroplattans använda brunnar från mikroplatttramen, sköljer mikroplatttramen noga med destillerat eller avjoniserat vatten, torkar och sparar för nästa test.

3. Kassera alla reagensaliquoter och beredda reagenser om inget annat anges.

Späd kvarvarande DNR i flaskan före kassering i enlighet med nationella/lokala laboratorieprocedurer.

Tolkning av resultat

CO för *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testanalysen på 1 pg/ml är likvärdigt med 100 000 HPV-kopior/ml eller 5 000 HPV-kopior per analys.

Resultat av testning av STM-prov

STM-prover med ett RLU/CO-värde på $\geq 1,0$ betraktas som "positive" (positiva) för 1 eller flera av HPV-typerna 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 och 68.

STM-prover med ett RLU/CO-värde $< 1,0$ betraktas som "negative" (negativa) eller "no HPV DNA detected" (inget HPV-DNA detekterat) för de 13 testade HPV-typerna. Antingen saknas högrisk-HPV-DNA-sekvenser eller HPV-DNA-nivåerna är lägre än testets detektionsgräns.

Resultat av testning av SurePath-prov

SurePath-prover med ett RLU/CO-värde på $\geq 1,0$ betraktas som "positiva" för 1 eller flera av HPV-typerna 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 och 68.

SurePath-prover med ett RLU/CO-värde $< 1,0$ betraktas som "negative" (negativa) eller "no HPV DNA detected" (inget HPV-DNA detekterat) för de 13 testade HPV-typerna. Antingen saknas HPV-DNA-sekvenser eller HPV-DNA-nivåerna är lägre än testets detektionsgräns.

Resultat av testning av PreservCyt-prov

PreservCyt-prover med ett RLU/CO-värde på $\geq 1,0$ betraktas som "positiva" för 1 eller flera av HPV-typerna 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 och 68.

PreservCyt-prover med ett RLU/CO-värde $< 1,0$ betraktas som "negative" (negativa) eller "no HPV DNA detected" (inget HPV-DNA detekterat) för de 13 testade HPV-typerna. Antingen saknas HPV-DNA-sekvenser eller HPV-DNA-nivåerna är lägre än testets detektionsgräns.

För PreservCyt-prover med ett RLU/CO-värde $\geq 1,0$ och $< 2,5$, rekommenderar QIAGEN att provet testas om, enligt följande:

- Om RLU/CO är $\geq 1,0$ vid den första omtestningen, ska provet rapporteras som "positivt."
Ingen ytterligare testning behövs.

- Om RLU/CO är $< 1,0$ vid den första omtestningen, krävs ett andra omtest (ett tredje resultat). Det andra omtestresultatet är slutresultatet ($< 1,0$ är negativt, $\geq 1,0$ är positivt) och rapporteras.

RLU/CO-värde nära 1,0

Om RLU/CO för ett prov är nära, men lägre än 1,0, och en infektion av högrisk-HPV misstänks, bör du överväga alternativa testmetoder och/eller ett upprepat prov.

Andra HPV-typer

Eftersom denna analys endast detekterar högrisk-HPV-typ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 och 68, måste du tänka på att det kan finnas andra lågrisk-HPV-typer i provet. Om du testar specifikt för förekomsten av sexuellt överförbar lågrisk-HPV, bör du använda *digene* HC2 HPV DNA-testet, vilket detekterar DNA för både lågrisk- och högrisktyper av HPV.

Assay Calibration Verification

Analyskalibreringsverifiering utförs för att säkerställa att reagenserna, kalibratorerna och kvalitetskontrollerna fungerar som de ska, vilket möjliggör en noggrann bestämning av analys-CO. För *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet krävs analyskalibrering vid varje test; därför är det nödvändigt att verifiera varje analys. Denna verifieringsprocedur är inte avsedd att ersätta intern kvalitetskontrolltestning. Acceptabla intervall för analyskalibrering och kvalitetskontroller har endast fastställts för DML-instrument som godkänts av QIAGEN

Analyskalibrering utförs automatiskt av analysprogramvaran för *digene*-analysen och skrivs ut i dataanalysrapporten. Användare som har *digene* Qualitative Software version 1.03 eller tidigare måste dock utföra analyskalibreringsverifiering manuellt innan patientresultat kan rapporteras. Kontakta QIAGEN tekniska service för mer information.

Testet måste uppfylla de specificerade kriterierna för analyskalibrering. Om något av nedanstående kriterier är ogiltigt kommer inte programvaran att tolka provresultaten.

Negativ kalibrator

NC måste testas i triplikat vid varje test. NC-medelvärdet måste vara ≥ 10 och ≤ 250 RLU och variationskoefficienten (CV) måste vara ≤ 25 %. Om CV är > 25 %, tar programvaran bort det

RLU-värde som är längst bort från medelvärdet som ett avvikande värde och räknar om medelvärdet och CV med de kvarvarande värdena.

Om CV fortfarande är > 25 % är analyskalibreringen ogiltig och testet måste upprepas för alla patientprover. I enlighet med detta ska du inte rapportera patientprovresultat.

Positiv kalibrator

HRC måste testas i tripliket vid varje test. CV för HRC måste vara $\leq 15\%$. Om CV är > 15%, tar programvaran bort det RLU-värde som är längst bort från medelvärdet som ett avvikande värde och räknar om medelvärdet och CV med de kvarvarande värdena.

Om CV fortfarande är > 15% är analyskalibreringen ogiltig och testet måste upprepas för alla patientprover. I enlighet med detta ska du inte rapportera patientprovresultat.

Medelvärde för positiv kalibrator / medelvärde för negativ kalibrator

Programvaran använder $HRC\bar{X}$ och $NC\bar{X}$ för att beräkna $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$. Ett giltigt $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$ definieras som $2,0 \leq HRC\bar{X}/NC\bar{X} \leq 15$.

Om $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$ är < 2,0 eller > 15, är analyskalibreringen ogiltig och testet måste upprepas för alla patientprover. I enlighet med detta ska du inte rapportera patientprovresultat.

Cutoff-beräkning

Analysprogramvaran för *digene*-analysen beräknar och rapporterar RLU/CO och positiva/negativa resultat för alla prover. CO för bestämning av positiva prover är $HRC\bar{X}$. Analysprogramvaran för *digene*-analysen använder provets RLU-värden för att uttrycka resultat som prov-RLU/CO.

För RCS-automatiserad testning appliceras RCS-HPV-analysprotokollet en kalibreringsjusteringsfaktor (CAF) på 0,8 på giltigt $HRC\bar{X}$. Denna CAF krävs för att prestandaegenskaperna för RCS-automatiserad testning ska förbli likvärdiga med den manuella testningen. CAF appliceras endast på RCS-automatiserade testresultat; därför är det mycket viktigt att välja rätt analysprotokoll för att framställa korrekta testresultat.

Kvalitetskontroller

Kvalitetskontrollprover tillhandahålls med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet och måste användas för intern kvalitetskontroll. De medföljande kvalitetskontrollerna är klonade HPV-DNA-mål och är inte härledda från HPV av vildtyp. Detta är samma typ av material som används för de medföljande kalibratorerna. Ytterligare kvalitetskontroller kan testas enligt riktlinjerna eller kraven i nationella eller lokala regelverk eller ackrediteringsorganisationer. De tillhandahållna kvalitetskontrollerna fungerar inte som en lämplig kvalitetskontroll för bearbetningen av PreservCyt-lösning eller SurePath-konserveringsvätska.

Se den tillämpliga användarhandboken för analysprogramvaran för *digene*-analysen för anvisningar om hur man matar in lotnumren och utgångsdatumen för kvalitetskontrollerna. För att en analys ska vara giltig måste RLU/CO för varje kvalitetskontroll hamna inom de definierade kriterierna så som specificeras i tabell 10 nedan.

Om kvalitetskontrollerna inte ligger inom dessa intervall är analysen ogiltig och testet måste upprepas. I enlighet med detta ska du inte rapportera patientresultat.

Tabell 10. Kriterier för kvalitetskontroll av analysvaliditet

Kvalitetskontroll	Minimum (RLU/CO)	Maximum (RLU/CO)	CV (%)
QC1-LR	0.001	0.999	≤25
QC2-HR	2	8	≤25

Limitations

- *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet för HPV-typ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 och 68 rekommenderas inte för bedömning av misstänkta sexuella övergrepp.
- Prevalensen av HPV-infektion i en population kan påverka prestandan. Positiva prediktiva värden minskar när man testar populationer med låg prevalens eller individer utan risk för infektion.
- Ett negativt testresultat utesluter inte möjligheten för HPV-infektion eftersom mycket låga nivåer av infektion eller provtagningsfel kan ge upphov till ett falskt negativt testresultat. Dessutom detekterar inte detta test DNA av lågrisk-HPV-typ (6, 11, 42, 43 och 44).
- Infektion med HPV är ingen definitiv indikator på förekomsten av höggradig cervixsjukdom, inte heller innebär den i samtliga fall att höggradig cervixsjukdom eller cancer kommer att utvecklas.
- Det förekommer en viss korshybridisering mellan High-Risk HPV-proben och HPV-typ 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 och MM9. Patienter som har prov som innehåller höga nivåer av dessa HPV-typer kan felaktigt bli remitterade till kolposkopi (15, 35).
- *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet är utformat för att detektera högrisk-HPV-typer, inklusive 39, 58, 59 och 68. Analytiska studier som utförts av QIAGEN, med användning av klonat HPV-plasmid-DNA, visar att testet detekterar dessa typer vid koncentrationer som varierar mellan 0,62 pg/ml till 1,39 pg/ml. Detta är ekvivalent med detektionsegenskaperna för de andra HPV-typerna som detekteras av *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet. QIAGEN kunde validera detektionen av dessa HPV-typer hos endast ett begränsat antal kliniska prover. På grund av den låga prevalensen för dessa typer i den allmänna populationen (28), har prestandaegenskaperna för *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet för detektionen av HPV-typ 39, 58, 59 och 68 inte bekräftats statistiskt.
- Om det finns höga koncentrationer av svampdödande kräm, spermiedödande medel eller slidsköljningsvätska vid tiden för provtagning av ett STM-prov för testning, finns det en sannolikhet för att erhålla ett falskt negativt resultat om dessa prover skulle innehålla nivåer av HPV-DNA som ger RLU/CO-värden nära analysens CO.
- Om det finns höga koncentrationer av svampdödande kräm, glidkräm eller blod vid tiden för provtagning av ett PreservCyt-cervixprov för provberedning med QIASymphony DSP HPV Media-kit, finns det en sannolikhet för att erhålla ett falskt negativt resultat om dessa prover skulle innehålla nivåer av HPV-DNA som ger RLU/CO-värden nära analysens CO.
- Om det finns förekomst av spermiedödande medel när ett PreservCyt-cervixprov tas för provberedning med QIASymphony DSP AXPH DNA-kit, kan det uppstå ett falskt negativt testresultat.

-
- Om det finns förekomst av spermiedödande medel, svampdödande kräm eller antiinflammatorisk kräm när ett SurePath-cervixprov tas för provberedning med QIA Symphony DSP HPV Media-satsen, kan det uppstå ett falskt negativt testresultat.
 - Korsreaktivitet mellan High-Risk HPV-proben och plasmiden pBR322 är möjlig. Förekomsten av pBR322-homologa sekvenser har rapporterats i humana genitalprover och falskt positiva resultat skulle kunna förekomma i närvaro av höga nivåer av bakteriell plasmid.
 - Underlåtenhet att visuellt kontrollera hybridiseringsplattan under utförande av RCS-automatiserad testning för att garantera korrekt provöverföring och underlåtenhet att korrigera för otillräcklig provöverföring kan leda till falska negativa resultat.

Prestandaegenskaper

Klinisk prestanda vid screening av patienter med normala pap smear-resultat för att underlätta riskbedömningen för patienthantering

Resultaten av 8 oberoende kliniska studier som utförts av framstående medicinska, akademiska och myndighetsinstitutioner vid kliniker i USA och utomlands beskrivs nedan. I studierna användes de vedertagna pap-metoderna i de länder där studien utfördes. I alla utom 2 fall användes Bethesda-systemet för att tolka pap-resultaten. När det gäller motsvarande terminologi för screening av cervixcancer inom EU, se European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening (36). Dessutom diagnostiserades höggradig cervixsjukdom via användningen av kolposkopistyrd biopsi för varje studie. I dessa studier bedömdes den kliniska användbarheten av *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-test jämfört med pap smear för äldre kvinnor (i allmänhet över 30 år). I alla utom en studie utfördes även prospektiv HPV-testning med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet.

Studierna var screeningstudier av ett tvärsnitt av den allmänna populationen med användning av *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet, såvida inget annat anges nedan. Två av studierna utfördes i USA, 2 i Europa, 2 i Latinamerika, en i Afrika och en i Asien.

Prestandan för *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet som observerades från 6 tvärsnittsstudier sammanfattas (se tabell 11 och 12 nedan) för kvinnor i åldern 30 år och äldre och diagnostiserade med histologiskt bekräftad höggradig cervikal neoplas, vilket definieras som cervikal intraepitelial neoplas (CIN) 3 eller allvarligare.

Tabell 11. Prestandauppskattningar – känslighet och specificitet

Population	n	Känslighet (%)			Specificitet (%)		
		(n/N)			(n/N)		
		95 % konfidensintervall (KI)			95 % KI		
	Enbart pap	Enbart HPV	HPV + pap	Enbart pap	Enbart HPV	HPV + pap	
Västeuropa 1	7592	51.6	96.3	100.0	98.5	96.2	95.1
		(14/27)	(26/27)	(27/27)	(7453/7565)	(7275/7565)	(7193/7565)
		32.0–71.3	81.0–99.9	87.2–100.0	98.2–98.8	95.7–96.6	94.6–95.6
Latinamerika 1	6115	58.4	94.8	97.4	98.7	93.9	93.4
		(45/77)	(73/77)	(75/77)	(5962/6038)	(5669/6038)	(5637/6038)
		46.68–69.6	87.2–98.6	90.9–99.7	98.4–99.0	93.3–94.5	92.7–94.0
Latinamerika 2*	6176	77.9	89.7	94.1	94.1	94.0	89.9
		(53/68)	(61/68)	(64/68)	(5745/6108)	(5742/6108)	(5490/6108)
		66.2–87.1	79.9–95.8	85.6–98.4	93.4–94.6	93.4–94.6	89.1–90.6
Afrika	2925	84.1	89.7	92.5	86.4	80.0	76.4
		(90/107)	(96/107)	(99/107)	(2436/2818)	(2253/2818)	(2152/2818)
		75.8–90.5	82.4–94.8	85.8–96.7	85.1–87.7	78.4–81.4	74.8–77.9
Asien	1936	97.6	100.0	100.0	76.3	83.0	68.0
		(41/42)	(42/42)	(42/42)	(1445/1894)	(1572/1894)	(1287/1894)
		87.4–99.9	91.6–100.0	91.6–100.0	74.3–78.2	81.2–85.0	65.8–70.1
USA 1	1040	50.0	100.0	100.0	97.6	96.2	95.5
		(1/2)	(2/2)	(2/2)	(1013/1038)	(999/1038)	(991/1038)
		1.26–98.7	15.8–100.0	15.8–100.0	96.5–98.4	94.9–97.3	94.0–96.7

* *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testdata om sådana var tillgängliga, i annat fall användes HCS-data; kombinerade data.

Tabell 12. Prestandauppskattningar – positivt och negativt prediktivt värde

Population	n	Positivt prediktivt värde (%)				Negativt prediktivt värde (%)		
		Prevalens (%)	(n/N)			(n/N)		
			CIN 3	Enbart pap	Enbart HPV	HPV + pap	Enbart pap	Enbart HPV
Västeuropa 1	7592	0.36	11.1	8.23	6.77	99.83	99.99	100.0
		(27/7592)	(14/126)	(26/316)	(27/399)	(7453/7466)	(7275/7276)	(7193/7193)
		0.23–0.52	6.2–17.9	5.5–11.8	4.5–9.7	99.7–99.9	99.9–100.0	99.9–100.0
Latinamerika 1	6115	1.26	37.2	16.5	15.8	99.47	99.93	99.96
		(77/6115)	(45/121)	(73/442)	(75/476)	(5962/5994)	(5669/5673)	(5637/5639)
		0.99–1.57	28.6–46.4	13.2–20.3	12.6–19.4	99.3–99.6	99.8–100.0	99.9–100.0
Latinamerika 2*	6176	1.10	12.7	14.3	9.4	99.74	99.88	99.93
		(68/6176)	(53/416)	(61/427)	(64/682)	(5745/5760)	(5742/5749)	(5490/5494)
		0.86–1.39	9.7–16.3	11.1–18.0	7.3–11.8	99.6–99.9	99.8–100.0	99.8–100.0
Afrika	2925	3.66	19.1	14.5	12.9	99.31	99.51	99.63
		(107/2925)	(90/472)	(96/661)	(99/765)	(2436/2453)	(2253/2264)	(2152/2160)
		3.01–4.40	15.6–22.9	11.9–17.4	10.6–15.5	98.9–99.6	99.1–99.8	99.3–99.8
Asien	1936	2.17	8.37	11.5	6.47	99.93	100.0	100.0
		(42/1936)	(41/490)	(42/364)	(42/649)	(1445/1446)	(1572/1572)	(1287/1287)
		1.57–2.92	6.1–11.2	8.4–15.3	4.7–8.7	99.6–100.0	99.8–100.0	99.7–100.0
USA 1	1040	0.19	3.85	4.88	4.08	99.90	100.0	100.0
		(2/1040)	(1/26)	(2/41)	(2/49)	(1013/1014)	(999/999)	(991/991)
		0.02–0.69	0.1–19.6	0.6–16.5	0.5–14.0	99.5–100.0	99.6–100.0	99.6–100.0

* *digene* HC2 High-RiskHPV DNA-testdata om sådana var tillgängliga, i annat fall användes HCS-data; kombinerade data.

I samtliga studier finns en enhetlig och ofta mycket signifikant förbättring i känslighet för *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet jämfört med enbart pap. Liksom för känslighet överskrider det negativa prediktiva värdet för HPV värdet för enbart pap i samtliga fall, och närmar sig 100 %. Detta negativa prediktiva värde visar den höga sannolikheten för frånvaron av höggradig cervixsjukdom eller cancer hos kvinnor med en normal cytologi som är fri från HPV-infektion.

Även om specificiteten för *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet är lägre än för enbart pap, har en analys av sannolikhetskvoterna visat att den observerade minskningen av specificitet inte är tillräckligt signifikant för att påverka den kliniska nyttan med att använda testet för att identifiera kvinnor med föga eller ingen risk för att ha eller utveckla cervixsjukdom. Icke desto mindre är det viktigt att beslutet att remittera en patient till kolposkopi baseras på all klinisk information och riskinformation och patienthistorik som är tillgänglig för läkaren. Viktiga variabler innefattar historiken för HPV-infektion och/eller avvikande pap smear, ålder vid första samlaget, antalet sexpartner och samtida sexuellt överförda sjukdomar (37, 38).

Även om prevalensen för höggradig sjukdom inte varierar signifikant mellan studierna från vilka prestandan fastställdes, kan prevalensen för HPV-infektion i en population påverka prestanda, och brukar variera mellan olika patientpopulationer. Dessutom har det visat sig att prevalensen för HPV-infektion sjunker dramatiskt med stigande ålder (17, 24–29, 38–40). Positiva prediktiva värden minskar när man testar populationer med låg prevalens eller individer med föga risk för infektion.

Longitudinell analys utfördes med användning av resultaten av 2 studier; en utfördes i USA av National Cancer Institute (NCI, nationella cancerinstitutet) i Portland, Oregon, och den andra utfördes i Frankrike vid Laboratoire Pol Bouin C.H.U. de Reims (Pol Bouin-laboratoriet, universitetskliniken i Reims). Dessa longitudinella analyser företogs för att påvisa att pap-negativa/HPV-negativa patienter löper en lägre risk för cervixsjukdom jämfört med traditionellt definierade lågriskkvinnor med okänt HPV-status och jämfört med pap-negativa/HPV-positiva patienter (se tabell 13 och 14 nedan).

Tabell 13. Longitudinell analys – relativ risk för höggradig sjukdom

Studiegrupp	Ålder	Lågriskklassificering	n	Fall av CIN 3+	Frekvens (per 100 patientår)	Relativ risk 95 % KI
NCI	30 och äldre	Pap-normal, HPV-negativ	12,054	28	0.043	0.897 (0.596–1.348)
		Normala pap-test i följd*	9429	19	0.048	1.000
	Alla	Pap-normal, HPV-negativ	17,594	48	0.056	0.678 (0.514–0.894)
		Normala pap-test i följd*	13,392	44	0.082	1.000
Frankrike	30 och äldre	Pap-normal, HPV-negativ	1690	3	0.084	0.849 (0.307–2.35)
		Normala pap-test i följd†	2026	4	0.099	1.000
	Alla	Pap-normal, HPV-negativ	2180	3	0.066	0.491 (0.221–1.09)
		Normala pap-test i följd†	2650	7	0.136	1.000

* Tre normala pap-test under cirka 2 år.

† Två normala pap-test under cirka 2 år.

Tabell 14. Longitudinell analys – sjukdomsfrekvenser stratifierade per HPV-status vid utgångsläget

Studiegrupp	Ålder	Status vid utgångsläget	n	Fall av CIN 3+	Frekvens (per 100 patientår)	Relativ risk 95 % KI
NCI	30 och äldre	Pap-normal, HPV-positiv	1078	24	0.451	10.50 (6.13–18.0)
		Pap-normal, HPV-negativ	12,054	28	0.043	1.00
	Alla	Pap-normal, HPV-positiv	2561	63	0.096	10.64 (7.33–15.5)
		Pap-normal, HPV-negativ	17,594	48	0.056	1.00
Frankrike	30 och äldre	Pap-normal, HPV-positiv	419	14	2.346	27.3 (8.41–88.3)
		Pap-normal, HPV-negativ	1696	3	0.084	1.00
	Alla	Pap-normal, HPV-positiv	619	22	2.520	37.0 (11.8–116)
		Pap-normal, HPV-negativ	2180	3	0.066	1.00

Den kliniska användbarheten av HPV-testresultatet påvisas ytterligare av den ökade risken för cervixsjukdom hos HPV-positiva kvinnor jämfört med HPV-negativa kvinnor.

Klinisk prestanda vid screening av patienter med ASC-US pap smear-resultat för att fastställa behovet av remiss till kolposkopi

En studie med titeln "Utility of HPV DNA Testing for Triage of Women with Borderline Pap Smears" (Användbarheten av HPV-DNA-testning för triage av kvinnor med gränsresultat av pap smear) utfördes i USA år 1996 under ledning av Kaiser Foundation Research Institute (Kaiser-stiftelsens forskningsinstitut) och Kaiser Permanente Medical Group (Kaiser Permanentes medicinska grupp). Cervixprover för rutinmässigt pap smear och för *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet erhöles från kvinnor som besökte flera Kaiser-klinikmottagningar. Inledande pap smear utvärderades i enlighet med Bethesda-klassificeringen. När det gäller motsvarande terminologi för screening av cervixcancer inom EU, se European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening (Europeiska riktlinjer för kvalitetssäkring inom screening för cervixcancer) (42). Kvinnor (15 år och äldre) med pap smear-resultat med atypiska celler av obestämd signifikans (ASC-US) återkom för kolposkopi och biopsi. Kolposkopiinriktade histologiska prover undersöktes av patologer, och en inledande diagnos ställdes. Varje histologiprov granskades dessutom av en

oberoende patolog, och diskrepanser mellan den första granskningen och den oberoende granskningen bedömdes av en tredje patolog.

Det första provet testades med en prototyp av *digene* HC2 High-RiskHPV DNA-testet som innehöll prover för 11 av de 13 HPV-typerna (utom HPV-typ 59 och 68). Denna skillnad väntades inte leda till någon signifikant annorlunda prestandaprofil för testet.

Resultat av High-risk HPV DNA-test och histologiska diagnoser var tillgängliga från 885 kvinnor med ASC-US pap smear. Testningen av de flesta av patienterna utfördes med prover som tagits i både STM och PreservCyt-lösning. På grund av likheterna mellan *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testets prestandaegenskaper för STM och PreservCyt-lösning, presenteras analysprestanda endast för PreservCyt-lösning.

Bland de som hade en ASC-US-remiss till pap smear, är det negativa prediktiva värdet för *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet för att ha HSIL eller allvarligare sjukdom vid kolposkopi 99 % (se tabell 15 nedan).

Tabell 15. Jämförelse mellan *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet och konsensus-histologi; population med ASC-US-remiss till pap smear; Kaiser-studie; PreservCyt-prover

		HSIL eller allvarligare vid kolposkopi		Totalsumma
		+	-	
<i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA Test result	+	66	317	383
	-	5	497	502
Totalsumma		71	814	885

Känslighet $[TP/(TP+FN)] = 93,0\% (66/71)$
 95 % KI = 84,3–97,7
 Specificitet $[TN/(TN+FP)] = 61,1\% (497/814)$
 95 % KI = 57,7–64,4
 Sjukdomsprevalens = 8,0 % (71/885)
 Analyspositivt prediktivt värde = 17,2 % (66/383)
 Analysnegativt prediktivt värde = 99,0 % (497/502)

De teoretiska positiva och negativa prediktiva värdena baserade på olika prevalenser för en initial ASC-US som befanns vara HSIL eller allvarligare baserat på resultat i högrisk-HPV-test fastställs (se tabell 16 nedan).

Tabell 16. Teoretiskt positivt och negativt prediktivt värde för högrisk-HPV-testning av ASC-US pap smear-resultat

Teoretisk prevalens för HSIL	Initialt ASC-US pap smear-resultat	
	Positivt prediktivt analysvärde	Negativt prediktivt analysvärde
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

Variationen mellan de olika åldersgrupperna som ingår i studien fastställs (se tabell 17 nedan).

Tabell 17. Kaiser-studiedata: digene HC2 High-Risk HPV DNA-testets prestanda jämfört med konsensus-histologiresultat (HSIL) – åldersspecifika egenskaper

	Ålder < 30	Ålder 30–39	Ålder > 39
n	287	233	365
Sjukdomsprevalens (%)	12.2	11.2	2.7
Känslighet (%)	100	88.46	80.0
(n/N)	(35/35)	(23/26)	(8/10)
95 % KI	90.0–100.0	69.9–97.6	44.4–97.5
Specificitet (%)	31.4	66.2	79.15
(n/N)	(79/252)	(132/207)	(281/355)
95 % KI	25.7–37.5	59.3–72.6	74.6–83.3
Negativt prediktivt värde (%)	100.0	97.86	99.29
(n/N)	(79/79)	(137/140)	(281/283)
Positivt prediktivt värde (%)	16.83	24.73	9.76
(n/N)	(35/208)	(23/93)	(8/82)

Klinisk känslighet och specificitet för fastställandet av risken för höggradig sjukdom hos kvinnor med pap smear-resultat med LSIL eller HSIL

En klinisk multicenterstudie med användning av *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet utfördes med prover som tagits från flera stora sjukhus och kolposkopikliniker (3 kliniker) med hög prevalens av cervixsjukdom och HPV i västra och södra USA. HPV-testning utfördes vid 3 studiekliniker som inte var anknutna till kolposkopiklinikerna där provtagningen hade utförts.

Populationen för denna kliniska studie utgjordes av kvinnor som antingen fått diagnosen LSIL eller HSIL baserat på ett färskt pap smear och remitterats till uppföljande kolposkopi. Av 702 rekryterade patienter hade 327 pap smear-resultat som översteg ASC-US och hade adekvat information tillgänglig; 96 av dessa hade ett slutligt sjukdomsstatus på HSIL eller allvarigare.

Exfolierade cervixcellprover erhöles med antingen *digene* HC2 DNA Collection Device för att sedan placeras i STM eller med en provtagningsborste som sedan sköljdes i PreservCyt-lösning. Prover togs vid tiden för kolposkopi. Prover testades med *digene* HC2 High-RiskHPV DNA-testet, och resultaten jämfördes med sjukdomsstatus som faststälts för varje patient. Sjukdomsstatus baserades på resultatet för histologisk utvärdering. När histologin var negativ eller när ett histologiresultat saknades, fastställdes dock sjukdomsstatus med cytologi vid tiden för kolposkopiundersökningen (se tabell 18 nedan).

digene HC2 High-Risk HPV DNA-testet utfördes vid 3 stora storstadskliniker utan anknytning till klinikerna där man samlade in proverna vid kolposkopi. Cytologi utfördes vid ett referenspatologilaboratorium, och histologin utfördes vid institutionerna som utförde kolposkopin. Testresultat jämfördes med sjukdomsstatus för att bedöma testets känslighet, specificitet samt negativa och positiva prediktiva värden för detektion av höggradig cervixcancer. På grund av likheterna mellan *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testets prestandaegenskaper för STM och PreservCyt-lösning, presenteras analysprestanda endast för PreservCyt-lösning. Ingen skillnad observerades mellan högrisk-HPV-testresultat och STM-prover och PreservCyt-prover.

Tabell 18. Algoritm för patientens sjukdomsstatus

Cytologieresultat	Histologieresultat	Sjukdomsstatus
Negativt	Negativt eller ej utfört*	Negativt
LSIL	Negativt	LSIL
HSIL	Negativt	HSIL
Cancer	Negativt	HSIL+
Negativt	LSIL	LSIL
LSIL	Ej utfört*	LSIL
LSIL	LSIL	LSIL
HSIL	LSIL	LSIL
Cancer	LSIL	LSIL
Negativt	HSIL	HSIL
LSIL	HSIL	HSIL
HSIL	HSIL	HSIL
HSIL	Ej utfört*	HSIL
Cancer	HSIL	HSIL
Negativt	Cancer	HSIL+
LSIL	Cancer	HSIL+
HSIL	Cancer	HSIL+
Cancer	Ej utfört*	HSIL+
Cancer	Cancer	HSIL+

* Biopsi och/eller endocervikal skrapning (ECC) utfördes inte eftersom inga avvikelser observerades vid kolposkopi eller histologieresultatet var inte tillgängligt.

Prestandan för *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet fastställdes med användning av 327 PreservCyt-prover, av vilka 96 togs från kvinnor som fått diagnosen höggradig cervixsjukdom (se tabell 19 och 20 nedan). Jämförelserna gjordes mellan alla studiepatienter med avvikande resultat på remitterat pap smear.

Tabell 19. Resultat av högrisk-HPV-testning

		Slutligt sjukdoms-status HSIL		Slutligt sjukdoms-status LSIL		Slutligt sjukdoms-status negativt		Total sum-ma
		+	-	+	-	+	-	
Högrisk-HPV-resultat								
Resultat av remiss-pap smear	LSIL	44	4	78	33	28	37	224
	HSIL	45	3	29	14	5	7	103
	Total sum-ma	89	7	107	47	33	44	327
Total sum-ma		96		154		77		327

digene HC2 High-Risk HPV DNA-testet uppvisade cirka 93 % total känslighet för identifiering av kvinnor med höggradig neoplas i en population som remitterats till kolposkopi på basis av en pap smear-diagnos på LSIL, HSIL eller motsvarande (se tabell 20 nedan). Testet uppvisade dessutom ett negativt prediktivt värde på nästan 95 % i denna population.

Tabell 20. Prestandaegenskaper för testning av högrisk-HPV-DNA bland patienter med ett remiss-pap smear med LSIL eller högre och ett slutligt sjukdomsstatus på HSIL

		Slutligt sjukdomsstatus		Totalsumma
		HSIL	LSIL eller negativt	
Resultat av högrisk-HPV-DNA-test	+	89	140	229
	-	7	91	98
	Totalsumma	96	231	327

Känslighet $[TP/(TP+FN)] = 92,7\%$ (89/96)
 95 % KI = 85,6–97,0
 Specificitet $[TN/(TN+FP)] = 39,4\%$ (91/231)
 95 % KI = 33,1–46,0
 Sjukdomsprevalens för remiss-LSIL till slutlig HSIL = 21,4 %
 Sjukdomsprevalens för remiss-HSIL till slutlig HSIL = 46,6 %
 Totalt positivt prediktivt värde = 38,9 % (89/229)
 Totalt negativt prediktivt värde = 92,8 % (91/98)

Medan specificiteten för *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet verkade vara något lågt, väntas inget strikt samband mellan frånvaro av neoplas och ett negativt HPV-resultat. HPV-DNA kan förekomma hos kvinnor som inte har progredierat till högre grad av sjukdom. Faktum är, att när HPV-testning med PCR (polymeraskedjereaktion) (en analys som endast används i forskning)

utfördes på prover med positiva *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testresultat och vilkas motsvarande sjukdomsstatus var lägre än lågradig neoplas, var nästan 75 % positiva.

De teoretiska positiva och negativa prediktiva värdena för *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet för inledande LSIL- eller HSIL-resultat vid pap smear som befanns vara HSIL eller allvarligare sjukdom vid kolposkopi fastställdes (se tabell 21 nedan).

Tabell 21. Teoretiskt positivt och negativt prediktivt värde för *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet av inledande LSIL- eller HSIL-resultat vid pap smear

Teoretisk prevalens för HSIL	Inledande LSIL- eller HSIL-resultat vid pap smear	
	Positivt prediktivt analysvärde	Negativt prediktivt analysvärde
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

Prestanda vid vaginal- eller självprovtagning

I litteraturen som citeras avseende prestanda för *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-test från vaginala prover tagna av patienten, rekryterades över 141 000 kvinnor i åldrarna 16–54 år. Studiekohorterna inkluderade kvinnor från Kina (41, 42), Mexiko (43, 44) och Storbritannien (45). Studiedesignen varierade något, men i allmänhet erbjöds kvinnor med ett positivt testresultat ytterligare undersökning av kolposkopi, och resultaten rapporterades avseende känslighet och specificitet jämfört med den jämförande metoden.

I två studier där data fanns tillgängliga för att jämföra prover som tagits av patienter med prover som tagits av läkare, indikerar resultaten hög känslighet för CIN2+ för båda metoderna (42, 45), 81–85 % för prover tagna av patienter jämfört med 96–100 % för prover tagna av läkare. Specificitetsresultaten var liknande för CIN2+ för båda metoderna (42, 45), 81–82 % för prover tagna av patienter jämfört med 83–85 % för prover tagna av läkare. I andra studier där endast prestandadata för prover tagna av patienter fanns tillgängliga, var prestandan för *digene* HC2

High-Risk HPV DNA-testets känslighet för CIN2+ 3,4 gånger större än cytologi (43) och 98 % känslighet före justering av verifikationsbias (44).

Analytisk känslighet

En icke-klinisk panel av klonat HPV-plasmid-DNA testades för att fastställa om var och en av de 13 HPV-typerna kan detekteras med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet och för att fastställa analysens känslighet för var och en av HPV-typerna. Varje HPV-målkoncentration (100 pg/ml, 10 pg/ml, 2,5 pg/ml, 1,0 pg/ml, 0,5 pg/ml och 0,2 pg/ml) för var och en av de 13 HPV-DNA-typerna (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 och 68) kördes i tripliket. Medel-RLU för varje koncentration av varje HPV-typ beräknades och jämfördes med den positiva kalibratoren.

Den detekterbara gränsen för varje HPV-typ i STM fastställdes (se tabell 22 nedan). De detekterbara gränserna varierade från 0,62 pg/ml till 1,39 pg/ml, beroende på den testade HPV-typerna. Den genomsnittliga detekterbara gränsen för alla 13 HPV-DNA-typer var 1,08 pg/ml med en standardavvikelse på 0,05 pg/ml.

Tabell 22. Sammanfattning av detekterbara gränser för känslighet för varje HPV-DNA-typ i STM

HPV-DNA-typ	Detekterbar HPV-DNA-koncentration (pg/ml)	Standardavvikelse	95 % KI
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
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
Medel (alla typer)	1.08	0.05	0.95–1.25

Ekvivalens mellan provtyper

Ekvivalens mellan STM- och PreservCyt-prover

Ekvivalens mellan STM- och PreservCyt-prover undersöktes för likvärdig utvinning av HPV 18-DNA. Cirka 10⁶ positiva HeLa-celler som innehöll integrerade HPV 18-genom tillsattes till STM och till en PreservCyt-pool med negativa celler. Varje provtyp bearbetades enligt dess respektive provberedning och denatureringsprocedurer så som beskrivs i de tillämpliga bruksanvisningarna och testades med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet. Resultaten visade att utvinning av HPV 18-DNA från humana cancerceller är ekvivalent för de två medierna och att PreservCyt-provberedningen inte påverkar den analytiska sensitiviteten för *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet.

Ekvivalens mellan manuell provberedning av PreservCyt-prover och provberedning av PreservCyt-prover med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kit

Studier utfördes med användning av PreservCyt-prover som tagits från en delgrupp av kvinnor med normal cytologi (n=1276) och en delgrupp av kvinnor med ASC-US-cytologi eller högre än ASC-US (n=402). Manuell provberedning och provberedning med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kit utfördes för varje prov utfördes följt av RCS-automatiserad testning med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet (se tabell 23 nedan).

Tabell 23. Överensstämmelse mellan manuell provberedning av PreservCyt-prover och provberedning av PreservCyt-prover med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kit (n=1678)

Positiv överensstämmelse (%) (n/N) 95 % KI		Negativ överensstämmelse (%) (n/N) 95 % KI	
Alla positiva	Kraftigt positivt område (RLU/CO ≥ 2,5)	Alla negativa	Kraftigt negativt område (RLU/CO < 0,8)
96.0	97.6	96.2	99.1
(409/426)	(372/381)	(1204/1252)	(1173/1184)
93.7–97.5	95.6–98.8	95.0–97.1	98.3–99.5

Den relativa analyskänsligheten och -specificiteten för PreservCyt-prover som beretts med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kitet är i hög grad korrelerad med resultaten som erhöles med metoden för manuell provberedning vilket beläggs genom den lägre gränsen för det 95-procentiga konfidensintervallet för både positiv och negativ överensstämmelse.

Ekvivalens mellan manuell provberedning av PreservCyt-prover och provberedning av PreservCyt-prover med användning av QIASymphony DSP AXpH-kit

Studier utfördes med användning av PreservCyt-prover som tagits från en delgrupp av kvinnor i åldern 30 år och äldre med normal cytologi (n=1901) och en delgrupp av kvinnor med ASC-US-cytologi (n=398). Manuell provberedning och provberedning med användning av QIASymphony DSP AXpH-kit utfördes för varje prov utfördes följt av testning med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet (se tabell 24 nedan).

Tabell 24. Överensstämmelse mellan manuell provberedning av PreservCyt-prover och provberedning med användning av QIASymphony DSP AXpH-kit (n=2299)

Positiv överensstämmelse (%)		Negativ överensstämmelse (%)	
(n/N)		(n/N)	
95 % KI		95 % KI	
Alla positiva	Kraftigt positivt område (RLU/CO \geq 2,5)	Alla negativa	Kraftigt negativt område (RLU/CO < 0,8)
92.7	96.5	99.1	99.9
(281/303)	(245/254)	(1978/1996)	(1967/1969)
89.3–95.2	93.4–98.1	98.6–99.4	99.6–100.0

Den relativa analyskänsligheten och -specificiteten för PreservCyt-prover som beretts med användning av QIASymphony DSP AXpH-kitet är i hög grad korrelerad med resultaten som erhöles med metoden för manuell provberedning vilket beläggs genom den lägre gränsen för det 95-procentiga konfidensintervallet för både positiv och negativ överensstämmelse.

Ekvivalens mellan STM- och manuell provberedning av SurePath-prover med postgradient cellpellet

En klinisk utvärdering i två faser utfördes på 6 provtagningskliniker och 3 testkliniker inom USA. Patienter som besökte kliniker för sexuellt överförbara sjukdomar, kliniker för obstetrik/gynekologi, kliniker för kolposkopi, sjukhus eller familjeplaneringskliniker var kvalificerade för rekrytering enligt i förväg fastställda inklusions- och exklusionskriterier. Till genomförbarhetsfasen, avsedd att fastställa ett tillämpligt CO-värde för *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet för användning med SurePath-prover med postgradient cellpellet, rekryterades cirka 400 patienter. Den kliniska valideringsfasen, till vilken cirka 1 500 patienter rekryterades för att validera det valda CO-värdet, började efter det att en interimistisk analys av genomförbarhetsfasen visat att ett CO-värde på 1,0 RLU/CO med användning av SurePath-prover med postgradient cellpellet producerade acceptabel överensstämmelse med STM-provresultat.

I båda utvärderingsfaserna togs parvisa SurePath- och STM-cervixprover från varje kvinnlig deltagare som gav sitt samtycke. SurePath-provet skickades därefter till ett cytologilabb för objektglasberedning. Efter cytologisk beredning testades de återstående SurePath-proverna med postgradient cellpellet och det motsvarande STM-provet med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet med ett CO-värde på 1,0 RLU/CO (se tabell 25 nedan).

Tabell 25. Överensstämmelse mellan SurePath-provresultat med postgradient cellpellet och STM-provresultat (alla åldrar och cytologisk klassificering) (n=1 490)

Positiv överensstämmelse (%)		Negativ överensstämmelse (%)	
(n/N)		(n/N)	
95 % KI		95 % KI	
Alla positiva	Kraftigt positivt område (RLU/CO ≥ 2,5)	Alla negativa	Kraftigt negativt område (RLU/CO < 0,80)
93.5	96.4	95.3	96.0
(401/429)	(378/392)	(1011/1061)	(1002/1044)
90.7–95.6	94.1–98.0	93.8–96.5	94.6–97.1

Den relativa analyskänsligheten och -specificiteten för testning av SurePath-prover med postgradient cellpellet har en hög korrelation med resultaten som erhålls vid testning av STM-prover vilket beläggs genom den lägre gränsen för det 95-procentiga konfidensintervallet för både positiv och negativ överensstämmelse.

Ekvivalens mellan manuell provberedning av SurePath-prover med postgradient cellpellet och provberedning av SurePath-prover med användning av QIA Symphony DSP HPV Media-satsen

Studier utfördes med användning av SurePath-prover som samlats in från följande delgrupper:

- Kvinnor med normal cytologi (n=1189)
- Kvinnor med ASC-US-cytologi eller högre än ASC-US (n=199)

För varje SurePath-prov utfördes provberedning av SurePath-prov med QIA Symphony DSP HPV Media-satsen och manuell provberedning av provet med postgradient cellpellet. RCS-automatiserad testning med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet (se tabell 26 nedan) utfördes för samtliga beredda prover..

Tabell 26. Överensstämmelse mellan resultaten mellan manuell provberedning av SurePath-prover och provberedning av SurePath-prover med användning av QIASymphony DSP HPV Media-satsen (n=1388)

Positiv överensstämmelse (%)		Negativ överensstämmelse (%)	
(n/N)		(n/N)	
95 % KI		95 % KI	
Alla positiva	Kraftigt positivt område (RLU/CO \geq 2,5)	Alla negativa	Kraftigt negativt område (RLU/CO < 0,8)
91.7	97.5	99.0	99.7
(222/242)	(192/197)	(1134/1146)	(1124/1127)
87.6–94.6	94.2–98.9	98.2–99.4	99.2–99.9

Den relativa analyskänsligheten och -specificiteten för SurePath-prover som beretts med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kitet är i hög grad korrelerad med resultaten som erhöles med metoden för manuell provberedning vilket beläggs genom den lägre gränsen för det 95-procentiga konfidensintervallet för både positiv och negativ överensstämmelse.

Ekvivalens mellan manuell provberedning av SurePath-prover med postgradient cellpellet och provberedning av SurePath-prover med postgradient cellpellet med användning av QIASymphony DSP HPV Media-satsen

Studier utfördes med användning av SurePath-prover som samlats in från följande delgrupper:

- Kvinnor med normal cytologi (n=1200)
- Kvinnor med ASC-US-cytologi eller högre än ASC-US (n=183)

Manuell provberedning och provberedning med användning av QIASymphony DSP HPV Media-satsen utfördes för varje SurePath-prov med postgradient cellpellet följt av RCS-automatiserad testning med digene HC2 High-Risk HPV DNA-testet (se tabell 27 nedan).

Tabell 27. Överensstämmelse mellan manuell provberedning av SurePath-prover med postgradient cellpellet och provberedning av SurePath-prover med postgradient cellpellet med användning av QIASymphony DSP HPV Media-satsen (n=1383)

Positiv överensstämmelse (%) (n/N) 95 % CI		Negativ överensstämmelse (%) (n/N) 95 % CI	
Alla positiva	positiv region RLU/CO \geq 2,5	Alla negativa	Kraftigt negativ region RLU/CO $<$ 0,8
92.6	97.4	94.4	99.3
(188/203)	(147/151)	(1114/1180)	(1078/1086)
88.2–95.5	93.4–99.0	92.9–95.6	98.6–99.6

Den relativa analyskänsligheten och -specificiteten för SurePath-prover med postgradient cellpellet som beretts med användning av QIASymphony DSP HPV Media-satsen är i hög grad korrelerad med resultaten som erhöles med metoden för manuell provberedning vilket beläggs genom den lägre gränsen för det 95-procentiga konfidensintervallet för både positiv och negativ överensstämmelse.

Överensstämmelse mellan testmetoder

En multicenterstudie (n=2270) utfördes för att utvärdera de kliniska testresultaten med RCS jämfört med testresultaten med den manuella metoden. Testning utfördes på 3 laboratorier, utanför QIAGEN, med patientprov från 5 provtagningsställen. Datauppsättningen bestod av 1269 cervixprover i PreservCyt-lösning och 1001 prover i STM.

Statistisk överensstämmelse, mellan matchade prover testade med RCS och med den manuella metoden, beräknades för den här patientpopulationen (se tabell 28 och 29 nedan).

Tabell 28. Sammanfattning av överensstämmelse mellan RCS-automatiserad och manuell testning – STM-prover (n=1001)

Cytologisk klassificering	HPV-prevalens (%)	Positiv överensstämmelse (%)		Negativ överensstämmelse (%)	
		Alla positiva	Kraftigt positivt område (RLU/CO > 2,5)	Alla negativa	Kraftigt negativt område (RLU/CO < 0,8)
WNL* < 30 år	21	99.3 (139/140) 96.1–100.0	99.1 (112/113) 95.2–100.0	99.3 (538/542) 98.1–99.8	100.0 (531/531) 99.3–100.0
WNL ≥ 30 år	15	92.0 (23/25) 74.0–99.0	93.8 (15/16) 69.8–99.8	100.0 (143/143) 97.5–100.0	100.0 (142/142) 97.4–100.0
ASC-US	65	98.1 (51/52) 89.7–100.0	100.0 (47/47) 92.4–100.0	96.4 (27/28) 81.7–99.9	100.0 (26/26) 86.8–100.0
LSIL+	96	100.0 (65/65) 94.5–100.0	100.0 (62/62) 94.2–100.0	66.7 (2/3) 9.4–99.2	66.7 (2/3) 9.4–99.2
Övrigt	33	100.0 (1/1) 2.5–100.0	100.0 (1/1) 2.5–100.0	100.0 (2/2) 15.8–100.0	100.0 (2/2) 15.8–100.0
Alla STM-prover	28	98.6 (279/283) 96.4–99.6	99.2 (237/239) 97.0–99.9	99.2 (712/718) 98.2–99.7	99.9 (703/704) 99.2–100.0

* WNL = within normal limits (inom normala gränser).

Tabell 29. Sammanfattning av överensstämmelse mellan RCS-automatiserad och manuell testning – PreservCyt-prover (n=1269)

Cytologisk klassificering	HPV Prevalens (%)	Positiv överensstämmelse (%)		Negativ överensstämmelse (%)	
		Alla positiva	Kraftigt positivt område (RLU/CO > 2,5)	Alla negativa	Kraftigt negativt område (RLU/CO < 0,8)
WNL < 30 år	20	96.2 (75/78) 89.2–99.2	100.0 (64/64) 94.4–100.0	98.4 (301/306) 96.2–99.5	99.0 (293/296) 97.1–99.8
WNL ≥ 30 år	8	88.7 (47/53) 77.0–95.7	92.1 (35/38) 78.6–98.3	99.1 (578/583) 98.0–99.7	99.5 (571/574) 98.5–99.9
ASC-US	36	100.0 (48/48) 92.6–100.0	100.0 (46/46) 92.3–100.0	96.6 (84/87) 90.3–99.3	96.5 (83/86) 90.1–99.3
LSIL+	77	100.0 (64/64) 94.4–100.0	100.0 (62/62) 94.2–100.0	89.5 (17/19) 66.9–98.7	88.9 (16/18) 65.3–98.6
Övrig cytologi	11	100.0 (3/3) 29.2–100.0	100.0 (3/3) 29.2–100.0	100.0 (24/24) 85.6–100.0	100.0 (24/24) 85.8–100.0
Alla PreservCyt-prover*	20	96.4 (238/247) 93.2–98.3	98.6 (211/214) 96.0–99.7	98.5 (1007/1022) 97.6–99.2	98.9 (990/1001) 98.0–99.4

* WNL = within normal limits (inom normala gränser)

† Cytologidata ej tillgängliga från 4 patienter

En kompletterande klinisk studie utfördes med sparade kvarvarande PreservCyt-prover tagna från en delgrupp av kvinnor 30 år och äldre med normal cytologi (se tabell 30 nedan) med en HPV-prevalens på 4,8 %

Tabell 30. Sammanfattning av överensstämmelse mellan RCS-automatiserad och manuell testning – WNL-kvinnor i åldern 30 år och äldre (n=2077)

Positiv överensstämmelse (%)		Negativ överensstämmelse (%)	
(n/N)		(n/N)	
95 % KI		95 % KI	
Alla positiva	Kraftigt positivt område (RLU/CO > 2,5)	Alla negativa	Kraftigt negativt område (RLU/CO < 0,8)
92.0	91.8	99.3	99.7
(92/100)	(78/85)	(1964/1977)	(1944/1949)
84.84–96.48	83.77–96.62	98.88–99.65	99.40–99.92

Det fanns 7 oförenliga resultat mellan de manuella och RCS-automatiserade testresultaten i det kraftigt positiva området. De inledande manuella testresultaten för dessa 7 prover låg utanför den rekommenderade omtestningsalgoritmen för PreservCyt-prov, men eftersom studiedesignen krävde att alla prov skulle testas i triplikat, var upprepade resultat tillgängliga för avvikande upplösning.

Upprepade testdata för vart och ett av de 7 oförenliga proven tyder på att alla de oförenliga proverna är negativa för HPV-DNA (se tabell 31 nedan). Baserat på de upprepade negativa resultaten som erhöles för båda replikaten, var troligen vart och ett av de initialt positiva manuella resultaten falskt positiva.

Tabell 31. Oförenliga PreservCyt-prover för WNL-kvinnor i åldern 30 år och äldre (n=7)

Prov	Plats	Manuell testning (RLU/CO)			RCS-automatiserad testning (RLU/CO)		
		Initial	Uppr 1	Uppr 2	Initial	Uppr 1	Uppr 2
1	A	2.51	0.08	0.08	0.12	0.17	0.14
2	A	20.18	0.08	0.09	0.19	0.24	0.20
3	A	3.88	0.12	0.11	0.17	0.22	0.22
4	A	9.37	0.09	0.09	0.15	0.21	0.20
5	A	6.01	0.17	0.13	0.25	0.30	0.30
6	B	2.97	0.71	0.99	1.59	0.89	0.90
7	C	11.01	0.16	0.14	0.19	0.15	0.21

Resultat från den här kliniska studien indikerar en total överensstämmelse mellan RCS-automatiserad och manuell testning med antingen STM- eller PreservCyt-prover.

Reproducerbarhet

Total reproducerbarhet för manuell testning

En multicenter-reproducerbarhetsstudie utfördes för att fastställa reproducerbarheten mellan dagar, mellan laboratorier och totalt för *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet med användning av en panel av HPV-DNA-mål och HPV-positiva och HPV-negativa kliniska STM-prover.

Tre externa laboratorier utförde testningen med samma lot av *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testkit på 3 olika dagar med en identisk reproducerbarhetspanel. Reproducerbarhetspanelen innehöll följande prover:

- 12 denaturerade kliniska STM-provpooler
- 3 icke denaturerade kliniska PreservCyt-provpooler
- Negativ kalibrator
- Positiv högrisk-HPV-kalibrator vid koncentrationer på 0,5 pg/ml, 1 pg/ml, 2,5 pg/ml, 5 pg/ml och 10 pg/ml.

Alla panelprover testades varje dag i triplikat med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet. Resultaten indikerar att reproducerbarheten för *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet med kliniska prover är mycket god (se tabell 32 nedan).

Tabell 32. Total reproducerbarhet – multicenter-reproducerbarhet (alla körningar vid alla laboratorier)

Statistiskt mått	Resultat
Förväntade positiva med ett observerat positivt resultat (95 % KI)	100.0% (99.0–100.0)
Förväntade negativa med ett observerat negativt resultat (95 % KI)	99.0% (97.49–99.73)
Överensstämmelse (95 % KI)	99.5% (98.70–99.86)
Kappa	0.990

Reproducerbarhet med kliniska STM-prover

Manuell testning.

En studie utfördes för att utröna reproducerbarheten för manuell testning av kliniska STM-prover med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-test. En panel med 20 prover bestående av kliniska pooler

(10 positiva och 10 negativa) bereddes genom att man kombinerade redan testade STM-prover. Prover testades i replikat om 4 på var och en av 5 dagar för totalt 20 replikat per prov. Testning utfördes med användning av en kombinerad probblandning bestående av högrisk-HPV-proben och en lågrisk-HPV-prob. Reproducerbarheten för testet väntades inte skilja sig åt när bara probblandningen användes i *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet. Medel-RLU/CO och det 95-procentiga konfidensintervallet för medelvärdet beräknades (se tabell 33 nedan)..

Tabell 33. Reproducerbarhet för STM-prover – manuell testning (sjunkande ordningsföljd per medel-RLU/CO)

Prov-ID	Medel-RLU/CO	95 % KI	Positivt testresultat (%) (n/N)
10	3.18	3.02–3.35	100 (20/20)
20	1.43	1.36–1.50	100 (20/20)
11	1.25	1.20–1.28	100 (20/20)
12	1.21	1.15–1.27	100 (20/20)
15	1.20	1.14–1.25	100 (20/20)
13	1.07	1.01–1.11	80 (16/20)
16	1.06	1.01–1.09	75 (15/20)
17	1.04	1.00–1.06	80 (16/20)
14	0.98	0.92–1.02	45 (9/20)
18	0.92	0.87–0.96	20 (4/20)
19	0.72	0.68–0.75	0 (0/20)
7	0.40	0.33–0.46	0 (0/20)
4	0.38	0.35–0.39	0 (0/20)
9	0.37	0.32–0.41	0 (0/20)
1	0.35	0.32–0.36	0 (0/20)
2	0.35	0.31–0.37	0 (0/20)
8	0.32	0.29–0.34	0 (0/20)
3	0.30	0.27–0.31	0 (0/20)
6	0.27	0.24–0.30	0 (0/20)
5	0.26	0.23–0.28	0 (0/20)

För de 5 proverna med en medel-RLU/CO vid 20 % eller mer över CO-värdet, var 100 av 100 replikat (100,0 %) positiva. För de 5 proverna med en medel-RLU/CO inom 20 % över eller under CO-värdet, var 60 av 100 (60 %; 95 % KI = 49,7–69,6) av replikaten positiva och 40 av 100 (40 %) var negativa. För de 10 proverna med en medel-RLU/CO vid 20 % eller mer under CO-värdet, var 200 av 200 replikat (100 %) negativa.

Resultaten indikerar att prover som var 20 % eller mer från CO-värdet kan förväntas ge förenliga resultat. Prover som var nära CO-värdet gav ungefär lika många positiva som negativa resultat. Dessa data visar att manuell testning av STM-prover med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet ger reproducerbara resultat.

RCS-automatiserad testning

En studie utfördes för att bedöma reproducerbarheten inom samma körning, från dag till dag och mellan olika laboratorier för RCS-automatiserad testning av STM-prover med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet. En panel med 16 prover av poolade kliniska prover (se tabell 34 nedan) testades med användning av en (1) reagenslot, två gånger dagligen på 3 olika dagar. Varje panelprov testades fyra gånger.

Tabell 34. Reproducerbarhet för STM-prover – sammansättning av panel för RCS-automatiserad testning

Panelprov	Ungefärligt RLU/CO	Förväntat testresultat
1N	<0.4	Negativt
2N	0.4–0.8	Negativt
3P	0.8–1.2	Högt negativt/lågt positivt
4P	0.8–1.2	Högt negativt/lågt positivt
5P	0.8–1.2	Högt negativt/lågt positivt
6P	1.2–2.0	Lågt positivt
7P	1.2–2.0	Lågt positivt
8P	1.2–2.0	Lågt positivt
9P	2.0–5.0	Lågt positivt
10P	5.0–10.0	Medelpositivt
11N	<0.4	Negativt
12N	<0.4	Negativt
13N	<0.4	Negativt
14XR	sk-HPV-DNA-positivt kliniskt material i STM k negativ pool	Högt negativt/lågt positivt
15XR	sk-HPV-DNA-plasmid i STM klinisk negativ pool	Högt negativt/lågt positivt
16XR	vidvektor-DNA-kontroll i STM klinisk negativ	Högt negativt/lågt positivt

Två panelprov (14XR och 15XR) inkluderades för att bedöma potentialen för korshybridisering av *digene* HC2 High-Risk HPV-DNA-testets probblandning med prover som bara innehåller lågrisk-HPV-DNA-typerna 6, 11, 42, 43 och 44. Panelprov 16XR bestod av pGEM® DNA med en

koncentration på 1,49 ng/ml och fungerade som vektorkontroll för panelprov 15XR. Resultaten av denna testning indikerade inga falska positiva testresultat på grund av förekomsten av lågrisk-HPV-DNA-typer i kliniska prover. Dessa resultat är förenliga med manuell testning.

Reproducerbarheten beräknades enligt den metod som beskrivs av NCCLS E5-A* (se tabell 35 nedan). Denna metod kräver att man beräknar varianskomponenter för var och en av källorna till variabilitet: laboratorium, dag, körning och fel (definierat som variation inom samma analys och mellan olika analyser).

Tabell 35. Reproducerbarhet för STM-prover – RCS-automatiserad testning; kvantitativ reproducerbarhet

Panelprov	n	Medel- RLU/CO	Standardavvikelse				Totalsumma	Total CV (%)
			Inom körning	Mellan körningar	Mellan dagar	Mellan labb		
1N	72	0.13	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	15.10
2N	72	0.36	0.03	0.01	0.03	0*	0.04	11.69
3P	72	0.96	0.06	0.06	0.04	0*	0.09	9.55
4P	72	1.03	0.06	0.18	0.06	0*	0.19	18.81
5P	72	1.41	0.11	0.14	0.15	0.06	0.24	17.00
6P	72	1.73	0.10	0.27	0*	0.11	0.31	18.10
7P	72	1.74	0.12	0.21	0*	0*	0.24	13.78
8P†	70	1.95	N/A‡	N/A‡	N/A‡	N/A‡	0.47	23.80
9P	72	5.21	0.34	0.44	0.21	0*	0.59	11.36
10P	72	7.67	0.46	0.63	0.71	0*	1.05	13.70
11N	72	0.13	0.01	0.01	0.01	0*	0.02	16.89
12N	72	0.17	0.03	0.06	0.03	0*	0.07	39.14
13N	72	0.15	0.02	0.02	0*	0.01	0.03	17.01

* Negativa varianskomponenter är inställda lika med noll.

† Två ogiltiga replikat för panelmedlem 8P uteslöt analys av varianskomponent på grund av ojämna storleksgrupper vid jämförelse.

‡ N/A (ej relevant): variansanalys ej möjlig på grund av färre replikat än övriga panelprov

Reproducerbarhet av kliniska PreservCyt-prov

Manuell testning.

Reproducerbarheten för manuell testning av PreservCyt-prover med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet fastställdes i en studie med användning av 24 simulerade prover med olika HPV-DNA-

* NCCLS. Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline. NCCLS document E5-A (1999).

koncentrationer. Prover bestod av PreservCyt-lösning och vita blodceller, med och utan HPV 16 plasmid-innehållande bakterier.

Prover testades i replikat om 4 på var och en av 5 dagar för totalt 20 replikat per prov. På var och en av de 5 dagarna i studien bereddes ett prov om 8 ml från varje prov enligt bruksanvisningen till *digene* HC2 Sample Conversion-kitet och testades. Medelvärde och 95-procentigt konfidensintervall beräknades (se tabell 36 nedan).

Tabell 36. Reproducerbarhet för PreservCyt-prover – manuell testning med manuell provberedning; kvalitativ reproducerbarhet (sjunkande ordningsföljd per medel-RLU/CO)

Prov-ID	Medel-RLU/CO	95 % KI	Positivt testresultat (%) (n/N)
21	3.51	3.19–3.83	100 (20/20)
12	1.58	1.48–1.69	100 (20/20)
13	1.42	1.32–1.52	100 (20/20)
17	1.38	1.23–1.53	90 (18/20)
18	1.36	1.23–1.48	95 (19/20)
15	1.32	1.16–1.49	85 (17/20)
23	1.17	1.06–1.27	75 (15/20)
16	1.14	1.07–1.20	75 (15/20)
20	1.10	0.96–1.21	85 (17/20)
19	1.06	0.95–1.17	45 (9/19)
22	1.05	0.99–1.10	70 (14/20)
11	1.04	0.96–1.11	65 (13/20)
14	0.94	0.86–1.01	25 (5/20)
24	0.77	0.73–0.81	0 (0/20)
3	0.28	0.25–0.30	0 (0/20)
1	0.27	0.24–0.30	0 (0/20)
7	0.27	0.25–0.30	0 (0/20)
2	0.27	0.25–0.28	0 (0/20)
5	0.26	0.24–0.28	0 (0/20)
4	0.24	0.22–0.25	0 (0/20)
9	0.23	0.21–0.25	0 (0/20)
8	0.22	0.18–0.27	0 (0/20)
10	0.22	0.20–0.25	0 (0/20)
6	0.19	0.17–0.21	0 (0/20)

För de 6 proverna med en medel-RLU/CO vid 20 % eller mer över CO-värdet, var 114 av 120 replikat (95,0%) positiva. För de 7 proverna med en medel-RLU/CO inom 20 % över eller under

CO-värdet, var 88 av 139 (63,3%; 95 % KI = 54,3–70,9) av replikaten positiva och 51 av 139 (36,7%) var negativa. För de 4 proverna inom 10 % över eller under CO var 41 av 79 (51,9 %) av replikaten positiva och 38 av 79 (48,1 %) var negativa. För de 11 proverna med en medel-RLU/CO vid 20 % eller mer under CO-värdet, var 220 av 220 replikat (100 %) negativa.

Resultaten indikerar att prover som var 20 % eller mer från CO-värdet kan förväntas ge förenliga resultat. Prover som var nära CO-värdet gav ungefär lika många positiva som negativa resultat. Dessa data visar att manuell testning av PreservCyt-prover med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet ger reproducerbara resultat.

RCS-automatiserad testning med manuell provberedning

En intern studie av RCS-automatiserad testning utfördes med användning av kliniska PreservCyt-prover som främst erhöles från kvinnor med ett cytologiresultat på ASC-US eller högre än ASC-US (HPV-prevalens 57 %). Proverna delades i 2 alikvoter, varje alikvot bearbetades därefter individuellt med *digene* HC2 Sample Conversion-kitet och testades därefter i duplikat med *digene* HC2 High-RiskHPV DNA-testet.

I likhet med andra kvalitativa IVD-tester associeras variabilitet hos *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testresultat från kliniska prov primärt med en eller en kombination av följande faktorer: provtagning, provberedning samt testproceduren. Eftersom testresultaten som jämfördes erhöles från samma kliniska prov, kontrollerade den experimentella designen för variabilitet på grund av provtagning. Repeterbarheten för resultat som erhöles från 2 individuellt beredda provalikvoter från samma kliniska prov (kallat "mellan beredda alikvoter") speglar variation på grund av kombinationen av provberedning och testprocedur. Repeterbarheten för resultat som erhöles från samma provalikvot (nedan kallad "inom beredd alikvot") speglar variation enbart från testproceduren (se tabell 37 nedan).

Tabell 37. Reproducerbarhet för PreservCyt-prover – RCS-automatiserad testning med manuell provberedning; kvalitativ reproducerbarhet

Analys	Positiv	Negativ	Total	
	överensstämmelse (%) (n/N) 95 % KI	överensstämmelse (%) (n/N) 95 % KI	överensstämmelse (%) (n/N) 95 % KI	
Inom beredd alikvot	Alla data	99.62 (261/262) 97.9–100.0	94.7 (160/169) 90.1–97.5	97.7 (421/431) 95.8–98.9
	Kraftigt positiva och kraftigt negativa regioner	100.0 (249/249) 98.5–100.0	98.2 (160/163) 94.7–99.6	99.3 (409/412) 97.9–99.9
	Alla data	99.6 (264/265) 97.9–100.0	98.2 (163/166) 94.8–99.6	99.1 (427/431) 97.6–99.8
Mellan beredd alikvot	Kraftigt positiva och kraftigt negativa regioner	100.0 (249/249) 98.5–100.0	99.4 (161/162) 96.6–100.0	99.8 (410/411) 98.7–100.0

Ytterligare en studie utfördes för att utvärdera den kvantitativa reproducerbarheten för resultat som erhållits med RCS-automatiserad testning av simulerade PreservCyt-prover. Tre testlaboratorier, inklusive QIAGEN, deltog i studien.

Varje testlaboratorium utförde både RCS-automatiserad och manuell testning av *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet två gånger per dag på 5 olika dagar med en tillhandahållen reproducerbarhetspanel med 6 prover. Varje panelprov bestod av odlade celler som tillsatts i PreservCyt-lösning för att ge ett ungefärligt RLU/CO-värde (se tabell 38 nedan).

De HPV-DNA-positiva proven i panelen bereddades genom tillsats av olika mängder av HPV-DNA-positiva SiHa-celler (från en laboratoriecelinje). Det negativa provet i panelen bestod av HPV-negativa Jurkat-celler (från en annan laboratoriecelinje). Den slutliga cellkoncentrationen för samtliga 6 prover i panelen var cirka 5×10^4 celler/ml.

Tabell 38. Reproducerbarhet för PreservCyt-prover – RCS-automatiserad testning med manuell provberedning; kvantitativ reproducerbarhet för panelprover

Panelprov	Celltyp	Ungefärligt RLU/CO	Förväntat resultat
1N	Jurkat	<1.0	Negativt
2N	Jurkat	<1.0	Negativt
3P	SiHa och Jurkat	5.0–8.0	Lågt positivt
4P	SiHa och Jurkat	5.0–8.0	Lågt positivt
5P	SiHa	30.0–50.0	Medelpositivt
6P	SiHa	200.0	Högt positivt

Reproducerbarheten beräknades enligt den metod som beskrivs av NCCLS E5-A* (se tabell 39 nedan). Denna metod kräver att man beräknar varianskomponenter för var och en av källorna till variabilitet: laboratorium, dag, körning och fel (definierat som variation inom samma analys och mellan olika analyser). Varr och ett av de 6 proven i panelen testades 4 gånger i var och en av de 10 körningarna (2 körningar per dag under 5 dagars testning) på alla de 3 testlaboratorierna.

Tabell 39. Reproducerbarhet för PreservCyt-prover – RCS-automatiserad testning med manuell provberedning; kvantitativ reproducerbarhet

Panelprov	n	Medel- RLU/CO	Standardavvikelse				Totalsumma	Total CV (%)
			Inom körning	Mellan körningar	Mellan dagar	Mellan labb		
1N	120	0.20	0.04	0.01	0.01	0.08	0.089	44.4
2N	120	0.20	0.06	0.01	0*	0.08	0.10	52.2
3P	120	4.05	0.76	1.17	0*	0.26	1.42	35.1
4P	120	4.23	0.74	0.86	0*	0.31	1.18	27.8
5P	120	28.6	5.00	5.61	4.41	0*	8.71	30.5
6P	120	214.6	33.95	27.25	18.09	25.53	53.61	25.0

† Negativa varianskomponenter är inställda lika med noll.

Som ett tillägg till den initiala reproducerbarhetsstudien med data från prover mycket nära analysens cutoff, utfördes ytterligare en precisionsstudie på ett laboratorium utanför QIAGEN med användning av RCS.

* NCCLS. Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline. NCCLS document E5-A (1999).

Panelen bestod av 1 negativt, 2 negativa eller lågt positiva, och 2 lågt positiva prover. Varje prov i panelen bereddades genom tillsats av odlade Jurkat- och SiHa-celler i PreservCyt-lösning för att ge följande RLU/CO-värden (se tabell 40 nedan):

Det externa laboratoriet slutförde RCS-automatiserad testning med användning av en enstaka lot av reagenser i *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet för varje testkörning, utförde testet 2 gånger per dag på 3 olika dagar med en tillhandahållen panel beatående av 5 simulerade PreservCyt-prover. Varje prov i panelen delades upp i 4 prover och samtliga 4 prover testades på samma mikroplatta (se tabell 41 nedan).

Tabell 40. Reproducerbarhet för PreservCyt-prover – RCS-automatiserad testning med manuell provberedning; kvantitativ reproducerbarhet nära panelprover med analysens CO

Panelprov	Ungefärligt RLU/CO-värde	Förväntat resultat
1N	0.2	Negativ
2N	0.8–1.2	Högt negativt/lågt positivt
3P	0.8–1.2	Högt negativt/lågt positivt
4P	1.2–2.0	Lågt positivt
5P	1.2–2.0	Lågt positivt

Tabell 41. Reproducerbarhet för PreservCyt-prover – RCS-automatiserad testning med manuell provberedning; kvantitativ reproducerbarhet nära analys-CO

Panelprov	n	Medel-RLU/CO	Standardavvikelse			Totalsumma	CV (%)
			Inom körning	Mellan körningar	Mellan dagar		
1N	24	0.14	0.01	0*	0.02	0.02	15.12
2N	24	1.39	0.14	0.15	0*	0.21	14.84
3P	24	1.31	0.16	0*	0.11	0.19	14.70
4P	24	1.74	0.13	0.21	0.18	0.31	17.73
5P	24	1.63	0.24	0.20	0.26	0.40	24.63

* Negative variance components are set equal to zero.

Provberedning med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kit.

En intern studie av provberedning med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kit utfördes med användning av kliniska PreservCyt-prover som erhållits från kvinnor med ett av följande två cytologieresultat:

- ASC-US eller högre än ASC-US
- negativa för intraepitelial lesion eller malignitet (NILM)

Två prover avlägsnades från varje patientprov. Varje prov bereddades individuellt med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kitet och resultaten fastställdes genom RCS-automatiserad testning med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet.

I likhet med andra kvalitativa IVD-tester associeras variabilitet hos *digene* HC2 högrisk-HPV DNA-testresultat från kliniska prov primärt med en eller en kombination av följande faktorer: provtagning, provberedning samt testproceduren. Eftersom testresultaten som jämfördes erhöles från samma kliniska patientprov (benämnt "mellan prover"), kontrollerade den experimentella designen för variabilitet på grund av provtagning. Reproducerbarheten för resultat (se tabell 42 nedan) som erhöles från 2 enskilt beredda prover från samma kliniska patientprov speglar variation på grund av provberedning och testprocedur.

Tabell 42. Reproducerbarhet för PreservCyt-prover – provberedning med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kit; kvalitativ reproducerbarhet mellan prover

Positiv överensstämmelse (%)	Negativ överensstämmelse (%)	Total överensstämmelse (%)
(n/N)	(n/N)	(n/N)
95 % KI	95 % KI	95 % KI
99.0	96.4	97.3
(95/96)	(161/167)	(256/263)
94.3–99.8	92.4–98.3	94.6–98.7

Ytterligare en studie utfördes för att utvärdera reproducerbarheten för resultat som erhöles med simulerade PreservCyt-prover. Provberedning med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kitet följdes av RCS-automatiserad testning med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet. De 8 positiva proven i panelen bereddades genom tillsats av antingen HPV-DNA-positiva SiHa- eller HeLa-celler till HPV-DNA-negativa C33 A-celler i PreservCyt-lösning, medan de 2 HPV-DNA-negativa proverna i panelen endast innehöll HPV-DNA-negativa C-33 A-celler.

Tre olika operatörer utförde testningen under en dag med användning av tre olika QIASymphony SP-instrument och tre olika loter av QIASymphony DSP HPV Media-kitet med panelprov 2N, 3E, 5P, 7P och 9P. Panelprov 2N, 3E, 5P och 7P testades med 18 replikat i 3 olika körningar, vilket gav 54 datapunkter för varje prov i panelen. Panelprov 9P testades med 16 replikat i 3 olika körningar, vilket gav 48 datapunkter.

En operatör utförde *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet på tre olika dagar med användning av tre olika QIASymphony SP-instrument och en lot av QIASymphony DSP HPV Media-kitet med

panelprov 1N, 4E, 6P, 8P och 10P. Panelprov 1N, 4E, 6P och 8P testades med 18 replikat i 8 olika körningar, vilket gav 144 datapunkter för varje prov i panelen. Panelprov 10P testades med 16 replikat i 8 olika körningar, vilket gav 128 datapunkter.

Av proverna i panelen med en medel-RLU/CO vid 20 % eller mer över CO-värdet, var 572 av 572 (100,0 %) positiva. Av proverna i panelen med en medel-RLU/CO inom 20 % över eller under CO-värdet, var 98 av 198 (49,5 %) positiva och 100 av 198 (50,5 %) var negativa. Av proverna i panelen med en medel-RLU/CO vid 20 % eller mer under CO-värdet, var 198 av 198 (100,0 %) positiva (se tabell 43 nedan).

Tabell 43. Reproducerbarhet för PreservCyt-prover – provberedning med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kit; kvalitativ reproducerbarhet

Panelprov	Celltyp	Medel-RLU/CO	Standardavvikelse	Positivt testresultat (%) (n/N)
1N	C-33 A	0.37	0.05	0 (0/144)
2N	C-33 A	0.41	0.06	0 (0/54)
3E	HeLa och C-33 A	0.81	0.11	6 (3/54)
4E	SiHa och C-33 A	1.09	0.18	66 (95/144)
5P	HeLa och C-33 A	3.17	0.46	100 (54/54)
6P	SiHa och C-33 A	4.81	0.74	100 (144/144)
7P	HeLa och C-33 A	6.77	0.97	100 (54/54)
8P	SiHa och C-33 A	9.41	1.39	100 (144/144)
9P	HeLa och C-33 A	13.72	2.81	100 (48/48)
10P	SiHa och C-33 A	28.13	5.08	100 (128/128)

Resultaten indikerar att prover som var 20 % eller mer från CO-värdet kan förväntas ge förenliga resultat. Prover som var nära CO-värdet gav ungefär lika många positiva som negativa resultat. Dessa data visar att provberedning av PreservCyt-prover med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kit följt av testning med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet ger reproducerbara resultat.

Resultaten av den interna studien användes också för att utvärdera den kvantitativa reproducerbarheten för resultat som erhöles med provberedning av PreservCyt-prover med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kit (se tabell 44 och tabell 45 nedan).

Tabell 44. Reproducerbarhet för PreservCyt-prover – provberedning med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kit; kvantitativ reproducerbarhet med samma operatör

Panelprov	n	Medel-RLU/CO	Standardavvikelse			Beräknad total standardavvikelse	Beräknad total CV (%)
			Inom körningar	Mellan körningar	Mellan kombinationer*		
1N	144	0.37	0.04	0.03	0.03	0.06	14.92
4E	144	1.09	0.12	0.11	0.09	0.19	17.24
6P	144	4.81	0.49	0.40	0.42	0.77	15.92
8P	144	9.41	0.96	0.97	0.46	1.44	15.32
10P	128	28.13	4.00	2.04	2.54	5.16	18.35

* Between combinations of QIASymphony SP instruments and different days.

Tabell 45. Reproducerbarhet för PreservCyt-prover – provberedning med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kit; kvantitativ reproducerbarhet på samma dag

Panelprov	n	Medel-RLU/CO	Standardavvikelse		Beräknad total standardavvikelse	Beräknad total CV (%)
			Inom körningar	Mellan körningar [†]		
2N	54	0.41	0.04	0.05	0.06	15.86
3E	54	0.81	0.08	0.08	0.12	14.48
5P	54	3.17	0.38	0.33	0.50	15.72
7P	54	6.77	0.92	0.38	1.00	14.73
9P	48	13.72	2.64	1.15	2.88	21.01

[†] En körning består av en kombination av ett QIASymphony DSP HPV Media-kit, ett QIASymphony SP-instrument och en operatör.

Den kvantitativa reproducerbarheten är mycket hög vilket visas genom att alla CV-värden är kvar under 25 %. Standardavvikelser mellan körningar är jämförbara med det motsvarande värdet inom körningar, vilket indikerar enhetliga resultat oavsett vilket instrument eller vilken lot av kitet som använts.

Provberedning med användning av QIASymphony DSP AXpH DNA-kit.

En intern studie av provberedning med användning av QIASymphony DSP AXpH DNA-kit utfördes med användning av kliniska PreservCyt-prover som erhållits från kvinnor med antingen cytologin ASC-US eller NILM: Två prover avlägsnades från varje patientprov. Varje prov bereddades individuellt med användning av QIASymphony DSP AXpH DNA-kitet och resultaten fastställdes genom RCS-automatiserad testning med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet.

I likhet med andra kvalitativa IVD-tester associeras variabilitet hos *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testresultat från kliniska prov primärt med en eller en kombination av följande faktorer: provtagning, provberedning samt testproceduren. Eftersom testresultaten som jämfördes erhöles från samma kliniska patientprov (benämnt "mellan prover"), kontrollerade den experimentella designen för variabilitet på grund av provtagning. Reproducerbarheten för resultat (se tabell 46 nedan) som erhöles från 2 enskilt beredda prover från samma kliniska patientprov speglar variation på grund av provberedning och testprocedur.

Tabell 46. Reproducerbarhet för PreservCyt-prover – provberedning med användning av QIASymphony DSP AXpH DNA-kit; kvalitativ reproducerbarhet mellan prover

Positiv överensstämmelse (%)	Negativ överensstämmelse (%)	Total överensstämmelse (%)
(n/N)	(n/N)	(n/N)
95 % KI	95 % KI	95 % KI
95.3	96.7	96.2
(101/106)	(176/182)	(277/288)
89.4–98.0	92.3–98.5	93.3–97.9

Ytterligare en studie utfördes för att utvärdera reproducerbarheten för resultat som erhöles med simulerade PreservCyt-prover. Provberedning med användning av QIASymphony DSP AXpH DNA-kitet följdes av RCS-automatiserad testning med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet.

Tre olika operatörer utförde *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet på olika dagar med olika instrument och olika reagensloter med en 9-provspanel. Varje prov i panelen testades i duplikat i 24 olika körningar, vilket gav 48 datapunkter för varje prov i panelen. De 8 positiva proven i panelen bereddades genom tillsats av antingen HPV-DNA-positiva SiHa- eller HeLa-celler till HPV-DNA-negativa H9-celler i PreservCyt-lösning, medan det HPV-DNA-negativa provet i panelen endast innehöll HPV-DNA-negativa H9-celler.

Av proverna i panelen med en medel-RLU/CO vid 20 % eller mer över CO-värdet, var 237 av 240 (98,8 %) positiva. Av proverna i panelen med en medel-RLU/CO inom 20 % över eller under CO-värdet, var 95 av 144 (66,0 %) positiva och 49 av 144 (34,0 %) var negativa. Av proverna i panelen med en medel-RLU/CO vid 20 % eller mer under CO-värdet, var 48 av 48 (100,0 %) positiva (se tabell 47 nedan).

Tabell 47. Reproducerbarhet för PreservCyt-prover – provberedning med användning av QIASymphony DSP AXpH DNA-kit; kvalitativ reproducerbarhet

Panelprov	Celltyp	Medel-RLU/CO	Standardavvikelse	Positivt testresultat (%) (n/N)
1N	H9	0.17	0.03	0 (0/48)
2E	H9 och HeLa	1.00	0.16	56 (27/48)
3E	H9 och HeLa	1.16	0.57	54 (26/48)
4E	H9 och SiHa	1.18	0.23	88 (42/48)
5P	H9 och SiHa	1.89	0.20	100 (48/48)
6P	H9 och HeLa	2.05	0.43	96 (46/48)
7P	H9 och SiHa	2.97	0.45	100 (48/48)
8P	H9 och HeLa	5.67	0.61	100 (48/48)
9P	H9 och SiHa	9.91	1.63	98 (47/48)

Resultaten indikerar att prover som var 20 % eller mer från CO-värdet kan förväntas ge förenliga resultat. Prover som var nära CO-värdet gav ungefär lika många positiva som negativa resultat. Dessa data visar att provberedning av PreservCyt-prover med användning av QIASymphony DSP AXpH DNA-kit följt av testning med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet ger reproducerbara resultat.

Resultaten av den interna studien användes också för att utvärdera den kvantitativa reproducerbarheten för resultat som erhöles med provberedning av PreservCyt-prover med användning av QIASymphony DSP AXpH DNA-kit (se tabell 48 nedan).

Tabell 48. Reproducerbarhet för PreservCyt-prover – provberedning med användning av QIASymphony DSP AXpH DNA-kit; kvantitativ reproducerbarhet

Panelprov	n	Medel- RLU/CO	Standardavvikelse			Beräknad total standardavvikelse	Beräknad total CV (%)
			Inom körningar	Mellan körningar	Mellan kombinationer*		
1N	48	0.17	0.02	0.02	0.01	0.03	18.13
2E	48	1.00	0.14	0.05	0.06	0.16	16.20
3E	48	1.16	0.48	0.22	0.23	0.57	49.27
4E	48	1.18	0.16	0.14	0.10	0.23	19.63
5P	48	1.89	0.09	0.09	0.16	0.20	10.63
6P	48	2.05	0.18	0.34	0.19	0.43	20.83
7P	48	2.97	0.27	0.23	0.28	0.45	15.14
8P	48	5.67	0.35	0.44	0.24	0.61	10.85
9P	48	9.91	1.36	0.55	0.71	1.63	16.42

*Mellan kombinationer av *digene* HC2 High-RiskHPV DNA-testkit, QIASymphony DSP AXpH DNA-kit, använt RCS, använt QIASymphony SP och operatör..

Reproducerbarhet av kliniska SurePath-prov

Manuell testning

Reproducerbarheten för manuell testning av SurePath-prover med postgradient cellpellet med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet fastställdes i en studie med användning av tre olika laboratorier. Panelproverna testades med användning av ett CO på 1,0 RLU/CO på olika dagar och med olika körningar med en identisk uppsättning panelprover med känt positiv eller negativ HPV-status. Panelen bestod av 5 positiva, 2 högt negativa/lågt positiva, och 5 negativa prover.

Varje prov i panelen bereddades genom kombination av unika kliniska prover som tagits i SurePath-konservingsvätska med ett känt negativt och positivt HPV-status för att erhålla de önskade målvärdena för RLU/CO. Varje prov i panelen testades i duplikat, två gånger per dag, under en period på 5 dagar vid vart och ett av de 3 deltagande laboratorierna (se tabell 49 nedan).

Tabell 49. Reproducerbarhet av SurePath-prover med postgradient cellpellet – manuell testning; kvalitativ reproducerbarhet

Panelprov	Medel-RLU/CO	Positivt testresultat (%) (n/N)
1	0.20	0.0 (0/60)
2	0.21	0.0 (0/60)
3	0.22	0.0 (0/60)
4	0.28	3.3 (2/60)
5	0.36	3.3 (2/60)
6	0.83	21.7 (13/60)
7	1.17	43.3 (26/60)
8	19.47	100.0 (60/60)
9	25.65	100.0 (60/60)
10	81.52	100.0 (60/60)
11	154.18	100.0 (60/60)
12	765.29	100.0 (60/60)

RCS-automatiserad testning

Reproducerbarheten av resultaten av SurePath-proverna med postgradient cellpellet med RCS-automatiserad testning jämfördes med resultaten som erhöles med manuell testning. Två separata alikvoter från samma bearbetade SurePath-prover med postgradient cellpellet (från samma patientprov) testades (se tabell 50 nedan).

Tabell 50. Reproducerbarhet av SurePath-prover med postgradient cellpellet – RCS-automatiserad testning; resultatöverensstämmelse mellan RCS-automatiserad och manuell testning

Positiv överensstämmelse (%) (n/N) 95 % KI		Negativ överensstämmelse (%) (n/N) 95 % KI	
Alla positiva	Kraftigt positivt område (RLU/CO \geq 2,5)	Alla negativa	Kraftigt negativt område (RLU/CO < 0,80)
99.0 (417/421) 97.6–99.7	100.0 (375/375) 99.0–100.0	97.7 (1057/1079) 96.9–98.75	98.7 (1050/1064) 97.8–99.28

Provberedning av SurePath-prover med användning av QIASymphony DSP HPV Media-sats

En studie utfördes för att utvärdera reproducerbarheten för resultat som erhållits med simulerade SurePath-prover. Provberedning med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kitet följdes av RCS-automatiserad testning med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet. De 4 positiva proven i panelen bereddes genom tillsats av antingen HPV-DNA-positiva SiHa-celler till HPV-DNA-negativa H-9-celler i SurePath-konserveringslösning, medan det HPV-DNA-negativa provet i panelen endast innehöll HPV-DNA-negativa H-9-celler i SurePath-konserveringslösning.

Tre olika operatörer utförde testningen på 6 olika dagar med användning av 3 olika QIASymphony SP-instrument och 3 olika loter av QIASymphony DSP HPV Media-kitet med panelprov 1N, 2E, 3P, 4P och 5P. Panelprov 1N, 2E, 3P och 4P testades med 18 replikat i 37 olika körningar, vilket gav 666 datapunkter för panelprov 2E och 3P och 665 datapunkter för panelprov 1N och 4P. Panelprov 5P testades med 16 replikat i 37 olika körningar, vilket gav 590 datapunkter. Fyra datapunkter exkluderades på grund av otillräcklig volym vilket flaggades av QIASymphony SP under provberedningen.

Av proverna i panelen med en medel-RLU/CO vid 20 % eller mer över CO-värdet, var 1921 av 1921 (100,0 %) positiva. Av proverna i panelen med en medel-RLU/CO inom 20 % över eller under CO-värdet, var 410 av 666 (61,6 %) positiva och 256 av 666 (38,4 %) var negativa. Av proverna i panelen med en medel-RLU/CO vid 20 % eller mer under CO-värdet, var 664 av 665 (99,8 %) negativa (se tabell 51 nedan).

Tabell 51. Reproducerbarhet för SurePath-prover – provberedning med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kitet; kvalitativ reproducerbarhet

Panelprov	Celltyp	Medel-RLU/CO	Standardavvikelse	Positivt testresultat (%) (n/N)
1N	H-9	0.38	0.06	0.2 (1/665)
2E	SiHa och H-9	1.06	0.17	61.6 (410/666)
3P	SiHa och H-9	4.51	0.78	100.0 (666/666)
4P	SiHa och H-9	8.34	1.57	100.0 (665/665)
5P	SiHa och H-9	24.69	5.12	100.0 (590/590)

Resultaten indikerar att SurePath-prover som var 20 % eller mer från CO-värdet kan förväntas ge förenliga resultat. SurePath-prover som var nära CO-värdet gav ungefär lika många positiva som negativa resultat. Dessa data visar att provberedning av SurePath-prover med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kitet följt av testning med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet ger reproducerbara resultat.

Resultaten av den interna studien användes också för att utvärdera den kvantitativa reproducerbarheten för resultat som erhöles med provberedning av SurePath-prover med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kit (se tabell 51 nedan).

Tre olika operatörer utförde testningen på 6 olika dagar med användning av 3 olika QIASymphony SP-instrument och 3 olika loter av QIASymphony DSP HPV Media-kitet med panelprov 1N, 2E, 3P, 4P och 5P. Panelprov 1N, 2E, 3P och 4P testades med 18 replikat i 8 olika körningar, vilket gav 162 datapunkter för varje prov i panelen. Panelprov 5P testades med 16 replikat vilket gav 144 datapunkter (se tabell 52 nedan).

Tabell 52. Reproducerbarhet för SurePath-prover – provberedning med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kitet; kvantitativ reproducerbarhet

Panelprov	n	Medel- RLU/CO	Standardavvikelse			Beräknad total standardavvikelse	Beräknad total CV (%)
			Inom körningar	Mellan dagar	Mellan kombinationer*		
1N	162	0.37	0.06	0.02	0.03	0.07	19.18
2E	162	1.05	0.14	0.07	0.10	0.18	17.41
3P	162	4.40	0.62	0.00	0.43	0.75	17.09
4P	162	8.24	1.15	1.01	1.34	1.77	21.42
5P	144	23.89	3.95	4.10	4.67	6.11	25.59

* A run consists of a combination of a QIASymphony DSP HPV Media Kit, a QIASymphony SP instrument and an operator on a particular day.

Den kvantitativa reproducerbarheten är mycket hög vilket visas genom att alla CV-värden är kvar under 26 %. Standardavvikelser mellan körningar är jämförbara med det motsvarande värdet inom körningar, vilket indikerar enhetliga resultat oavsett vilket instrument eller vilken lot av kitet som använts.

Provberedning av SurePath-prover med postgradient cellpellet med användning av QIASymphony DSP HPV Media-satsen

En studie utfördes för att utvärdera reproducerbarheten för resultat som erhöles med simulerade SurePath-prover med postgradient cellpellet. Provberedning med användning av QIASymphony DSP HPV Media-satsen följdes av RCS-automatiserad testning med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet. Cellkulturmaterial i 70 % SurePath-konserveringslösning användes för att likna SurePath-prover med postgradient cellpellet. De 4 positiva panelproverna bereddades genom tillsats av antingen HPV-DNA-positiva SiHa-celler till HPV-DNA-negativa H-9-celler i SurePath-konserveringslösning, medan det HPV-DNA-negativa panelprovet endast innehöll HPV-DNA-negativa H-9-celler i SurePath-konserveringslösning.

Fyra olika operatörer utförde testningen på 6 olika dagar med användning av 3 olika QIASymphony SP-instrument och 3 olika loter av QIASymphony DSP HPV Media-satsen med panelprov 1, 2, 3, 4 och 5. Panelprover 1, 2, 3 och 4 testades med 18 replikat i 37 olika körningar, vilket gav 666 datapunkter för panelprov 1 och 3, och 665 datapunkter för panelprov 2 och 4. Två datapunkter exkluderades på grund av otillräcklig volym vilket flaggades av QIASymphony SP under provberedningen. Panelprov 5 testades med 16 replikat i 37 olika körningar, vilket gav 592 datapunkter.

Av proverna i panelen med en medel-RLU/CO vid 20 % eller mer över CO-värdet, var 1923 av 1923 (100,0%) positiva. Av proverna i panelen med en medel-RLU/CO inom 20 % över eller under CO-värdet, var 416 av 665 (62,6 %) positiva och 249 av 665 (37,4 %) negativa. Av proverna i panelen med en medel-RLU/CO vid 20 % eller mer under CO-värdet, var 666 av 666 (100 %) positiva (se tabell 53 nedan).

Tabell 53. Reproducerbarhet för SurePath-prover med postgradient cellpellet – provberedning med användning av QIASymphony DSP HPV Media-satsen; kvalitativ reproducerbarhet

Panelprov	Celltyp	Medel-RLU/CO	Standardavvikelse	CV (%)	Positivt testresultat (%) (n/N)
1	H-9	0.12	0.02	18.77	0.0 (0/666)
2	SiHa och H-9	0.96	0.11	11.15	62.6 (416/665)
3	SiHa och H-9	4.72	0.56	11.89	100.0 (666/666)
4	SiHa och H-9	9.34	0.98	10.46	100.0 (665/665)
5	SiHa och H-9	24.9	3.37	13.55	100.0 (592/592)

Resultaten indikerar att SurePath-prover med postgradient cellpellet som var 20 % eller mer från CO-värdet kan förväntas ge förenliga resultat. SurePath-prover med postgradient cellpellet som var nära CO-värdet gav ungefär lika många positiva som negativa resultat. Dessa data visar att provberedning av SurePath-prover med postgradient cellpellet med användning av QIASymphony DSP HPV Media-satsen följt av testning med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet ger reproducerbara resultat.

Resultaten av den interna studien användes också för att utvärdera den kvantitativa reproducerbarheten för resultat som erhöles med provberedning av SurePath-prover med postgradient cellpellet med användning av QIASymphony DSP HPV Media-satsen.

Fyra olika operatörer utförde testningen på 6 olika dagar med användning av 3 olika QIASymphony SP-instrument och 3 olika loter av QIASymphony DSP HPV Media-satsen med panelprov 1, 2, 3, 4 och 5. Panelprov 1, 2, 3 och 4 testades med 18 replikat vilket gav

162 datapunkter för varje panelprov. Panelprov 5 testades med 16 replikat vilket gav 144 datapunkter (se tabell 54 nedan).

Tabell 54. Reproducerbarhet för SurePath-prover med postgradient cellpellet – provberedning med användning av QIASymphony DSP HPV Media-satsen; kvantitativ reproducerbarhet

Panelprov	n	Medel-RLU/CO	Standardavvikelse			Beräknad total standardavvikelse	Beräknad total CV (%)
			Inom körningar	Mellan dagar	Mellan kombinationer*		
1	162	0.12	0.02	0.00	0.01	0.02	19.80
2	162	1.00	0.08	0.02	0.06	0.10	10.27
3	162	4.99	0.37	0.13	0.38	0.55	11.00
4	162	9.78	0.61	0.23	0.54	0.85	8.72
5	144	26.40	2.19	0.70	1.51	2.75	10.41

* Mellan kombinationer av olika dagar, operatörer, loter av QIASymphony DSP HPV Media-satsen och QIASymphony SP-instrument.

Den kvantitativa reproducerbarheten är mycket hög vilket visas genom att alla CV-värden är kvar under 20%. Standardavvikelser mellan körningar är jämförbara med det motsvarande värdet inom körningar, vilket indikerar enhetliga resultat oavsett vilket instrument eller vilken lot av satsen som använts

Korsreaktivitet

Ett batteri av bakterier, virus och plasmider som förekommer allmänt i kvinnans anogenitala kanal, liksom en samling av kutanotropa HPV-typer för vilka det fanns tillgängliga kloner, analyserades för fastställande av om det skulle uppstå en korsreaktivitet med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet. Alla mikroorganismer analyserades vid koncentrationer på 1×10^5 och 1×10^7 organismer per ml. Renat DNA av virus och plasmider analyserades vid en koncentration på 4 ng/ml.

Följande bakterier testades och alla testades negativt i *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet:

- *Acinetobacter anitratus*
- *Acinetobacter lwoffii* (ATCC 17908)
- *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285)
- *Bacteroides melaninogenicus*
- *Candida albicans* (ATCC 14053 eller 10231)
- *Chlamydia trachomatis*

- *Enterobacter cloacae*
- *Escherichia coli* (HB101)*
- *Escherichia coli*
- *Fusobacterium nucleatum*
- *Gardnerella vaginalis*
- *Haemophilus ducreyi*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Lactobacillus acidophilus*
- *Mobiluncus curtisii*
- *Mobiluncus mulieris*
- *Mycoplasma hominis*
- *Mycoplasma hyorhinis*
- *Neisseria gonorrhoeae* (ATCC 19424)
- *Neisseria lactamica* (NRL 2118)
- *Neisseria meningitidis* (ATCC 13077)
- *Neisseria sicca* (ATCC 29256)
- *Peptostreptococcus anaerobius*
- *Proteus vulgaris* (ATCC 21117, 8427, 33420)
- *Serratia marcescens*
- *Staphylococcus aureus* (Cowan-stam)
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Streptococcus faecalis* (ATCC 14508)
- *Streptococcus pyogenes* (ATCC 27762)
- *Treponema pallidum*
- *Trichomonas vaginalis*
- *Ureaplasma urealyticum*

Följande virus- eller plasmid-DNA eller humant serum testades och alla testades negativt i *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet:

- Adenovirus 2
- Cytomegalovirus

* Både *E. coli*-stammen som användes för att odla plasmider (HB101) och ett kliniskt isolat av *E. coli* analyserades.

- Epstein-Barr-virus
- Hepatit B-tyt antigenpositivt serum
- Herpes simplex I
- Herpes simplex II
- Humant immunbristvirus (HIV, RT DNA)
- HPV-typ 1, 2, 3, 4, 5, 8, 13 och 30
- Simian-virus typ 40 (SV40)

Den enda plasmiden som visade korsreaktivitet i *digene* HC2 High-RiskHPV DNA-testet var pBR322. Korsreaktivitet mellan pBR322 och probblandningen är inte oväntad eftersom det är svårt att avlägsna allt vektor pBR322-DNA vid isolering av HPV-insatsen. Förekomsten av pBR322-homologa sekvenser har rapporterats i humana genitalprover och falska positiva resultat skulle kunna förekomma i närvaro av höga nivåer av den bakteriella plasmiden. Emellertid hade 298 kliniska prover som testades positiva med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet inga positiva resultat på grund av pBR322 när de testades med en pBR322-prob. Sannolikheten för ett falskt positivt resultat med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet på grund av homologa pBR322-sekvenser i kliniska prover förefaller alltså vara låg.

Korshybridisering

Arton olika HPV-typer (högrisk och lågrisk) testades med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet vid koncentrationer på 4 ng/ml av HPV-DNA. Alla högrisk-HPV-målen var positiva. Denna studie visade dessutom att det sker en liten grad av korshybridisering mellan HPV-typ 6 och 42 och *digene* HC2 High-RiskHPV DNA-testet. Patientprover med höga nivåer (4 ng/ml eller högre) av HPV-typ 6 eller 42 kan ha falska positiva resultat i *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet. Den kliniska signifikansen av detta är att patienter med 4 ng/ml eller högre av HPV-typ 6 eller 42 kan remitteras till kolposkopi i onödan.

Det har även visats att *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet korsreagerar med HPV-typ 40, 53 och 66. Dessa typer är sällsynta, och det finns inte tillräcklig evidens för att fastställa den exakta korrelationen mellan infektion med dessa typer och utvecklingen av höggradig sjukdom (15). Det finns även rapporter i litteraturen om att komplexa prover som är likartade med de som används i detta test kan orsaka falska positiva resultat på grund av korshybridisering med HPV-typ 11, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 eller MM9 (35). Även om flera av dessa HPV-typer är sällsynta eller nya typer som sällan träffas på vid höggradig sjukdom, kan patienter vilkas prover innehåller höga nivåer av dessa HPV-DNA-typer felaktigt bli remitterade till kolposkopi.

Effekt av blod och andra substanser på STM-prover

Effekten av blod och andra potentiellt störande definierade eller odefinierade substanser utvärderades i *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet. Helblod, slidsköljningsvätska, svampdödande kräm och spermiedödande medel (substanser som ofta återfinns i cervixprover) tillsattes till STM-negativa och STM-positiva prover (kliniska provpooler och icke-kliniska prover) vid koncentrationer som kan finnas i cervixprover.

Inga falska positiva resultat observerades med någon av de fyra substanserna vid någon koncentration. Ett falskt negativt resultat kan dock rapporteras i kliniska prover med HPV-DNA-nivåer som är nära CO för testet (1 pg/ml) om det finns höga koncentrationer av svampdödande kräm eller spermiedödande kräm. Det är dock mycket osannolikt att ett kliniskt prov skulle bestå nästan helt av en av dessa substanser eftersom cervix rutinmässigt rengörs före provtagning för pap smear och för HPV-testning.

Effekt av blod och andra substanser på PreservCyt-prover

Manuell provberedning

Effekten av blod och andra potentiellt störande definierade eller odefinierade substanser som potentiellt finns i PreservCyt-prover utvärderades i *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet. Helblod, slidsköljningsvätska, svampdödande kräm och spermiedödande medel (substanser som ofta återfinns i cervixprover) tillsattes till pooler med negativa och positiva kliniska PreservCyt-prover vid koncentrationer som kan finnas i cervixprover. Inga falska positiva resultat observerades med någon av de 4 substanserna vid någon koncentration. Dessutom hämmas inte detektionen av HPV-DNA med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet av substanser som ingår naturligt i vissa kliniska prover.

Provberedning med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kit

Effekterna av blod och andra potentiellt störande substanser i PreservCyt-prover utvärderades med användning av QIASymphony DSP HPV Media-kitet för provberedning och RCS-automatiserad testning med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet. Effekter av följande potentiellt störande substanser testades:

- Svampdödande kräm
- Antiinflammatorisk kräm
- Blod
- Spermiedödande medel

- Slidsköljning
- Deodorantsuppositorier
- Glidmedel
- Spermicid

Var och en av substanserna tillsattes till negativa och positiva kliniska pooler. Inga falska positiva eller falska negativa resultat observerades med någon av substanserna vid en koncentration som kan finnas i cervixprover. Ett falskt negativt resultat kan dock rapporteras i kliniska prover med HPV-DNA-nivåer som är nära CO för testet om det finns höga koncentrationer av svampdödande kräm, glidmedel eller blod. Det är dock mycket osannolikt att ett kliniskt prov skulle bestå nästan helt av en av dessa substanser eftersom cervix rutinmässigt rengörs före provtagning för pap smear och för HPV-testning.

Provberedning med användning av QIASymphony DSP AXpH DNA-kit

Effekten av helblod i PreservCyt-prover utvärderades med användning av QIASymphony DSP AXpH DNA-kitet för provberedning och testades sedan med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet. Synbart blodiga kliniska prover valdes ut och testades med användning av både metoden för manuell provberedning och metoden för automatiserad provberedning med användning av QIASymphony DSP AXpH DNA-kitet. Resultat jämfördes för 238 prover och gav en total överensstämmelse på 94,12 % och ett McNemar-p-värde på 0,2850, vilket indikerar att det inte finns någon statistiskt signifikant skillnad i kliniska prestanda mellan manuell respektive automatiserad provberedningsmetod med användning av QIASymphony DSP AXpH DNA-kitet.

Effekter av följande potentiellt störande substanser testades:

- Slidsköljning
- Svampdödande kräm
- Spermiedödande medel
- Mononukleära celler i perifert blod (PBMC)
- Glidmedel
- Intimspray
- Spermicid
- Magnetiska partiklar
- TopElute-vätska

Varje substans tillsattes till negativa och positiva cellpooler vid koncentrationer som kan finnas i cervixprover eller kan tillsättas under provberedning. Inga falska positiva resultat observerades med någon av substanserna vid någon koncentration. Inga falska negativa resultat observerades

med undantag för spermiedödande medel. Ta inte ett PreservCyt-cervixprov för automatiserad provberedning med QIA Symphony DSP AXpH DNA-kitet om det finns förekomst av spermiedödande medel

Effekt av blod och andra substanser på SurePath-prover

Provberedning av SurePath-prover med användning av QIA Symphony DSP HPV Media-satsen

Effekterna av blod och andra potentiellt störande substanser i SurePath-prover utvärderades med användning av QIA Symphony DSP HPV Media-satsen för provberedning och RCS-automatiserad testning med användning av *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet.

Effekter av följande potentiellt störande substanser testades:

- Svampdödande kräm
- Antiinflammatorisk kräm
- Blod
- Spermiedödande medel
- Slidsköljning
- Deodorantsuppositorier
- Glidmedel
- Spermicid

Var och en av substanserna tillsattes till negativa och positiva kliniska pooler. Inga falska positiva resultat observerades med någon av substanserna vid en koncentration som kan finnas i cervixprover.

Inga falska negativa resultat observerades med undantag för följande substanser:

- Spermiedödande medel orsakade falska negativa resultat vid en mycket låg koncentration.
- Om det finns en hög koncentration av svampdödande kräm i provet kan ett falskt negativt resultat rapporteras i kliniska prover med HPV-DNA-nivåer som är nära CO för testet. Det är dock mycket osannolikt att ett kliniskt prov skulle bestå nästan helt av svampdödande kräm eftersom cervix rutinmässigt rengörs före provtagning för pap smear och för HPV-testning.

Ta inte ett SurePath-cervixprov för automatiserad provberedning med QIA Symphony DSP HPV Media-satsen om det finns förekomst av svampdödande kräm eller spermiedödande medel.

Provberedning av SurePath-prover med postgradient cellpellet med användning av QIASymphony DSP HPV Media-satsen

Effekterna av blod och andra potentiellt störande substanser i SurePath-prover med postgradient cellpellet utvärderades med användning av QIASymphony DSP HPV Media-satsen för provberedning och RCS-automatiserad testning med användning av *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet.

Effekter av följande potentiellt störande substanser testades:

- Svampdödande kräm
- Antiinflammatorisk kräm
- Blod
- Spermiedödande medel
- Slidsköljning
- Deodorantsuppositorier
- Glidmedel
- Spermicid

Var och en av substanserna tillsattes till negativa och positiva kliniska pooler som sedan bearbetades med BD PrepMate-systemet för att imitera ett SurePath-prov med postgradient cellpellet. Ett enskilt falskt positivt resultat observerades för både blod och svampdödande kräm. Den statistiska analysen visade emellertid ingen signifikant interferens. Inga falska positiva resultat observerades med någon av de övriga substanserna vid en koncentration som kan finnas i cervixprover.

Falska negativa resultat observerades för svampdödande kräm, antiinflammatorisk kräm och spermiedödande medel. Ta inte ett SurePath-cervixprov för automatiserad provberedning med QIASymphony DSP HPV Media-satsen om det finns förekomst av svampdödande kräm, antiinflammatorisk kräm eller spermiedödande medel.

Överföring (carryover)

RCS utformades för minimera provkontaminering eller överföring av rester av alkaliskt fosfat genom användning av engångspipettspetsar för reagens och provaspiration. För att bekräfta denna egenskap har QIAGEN utfört flera studier för att bedöma om användningen av RCS ökade risken för överföring eller korskontaminering av prover jämfört med den manuella metoden. Flera RCS-instrument användes för att fastställa överföringspotential från system till system.

I en studie tillsattes 2 ng och 20 ng HPV-DNA-plasmid till negativt kontrollmaterial för att bereda högt positiva STM-prover. Koncentrationen 20 ng/ml gav RLU-värden som var cirka 3–5 gånger högre än de värden som förväntades observeras hos det högsta positiva kliniska provet vid rutinmässig klinisk testning. Dessa högt positiva simulerade prover placerades över hela mikroplattan i ett schackmönster, växelvis i brunnar som bara innehöll negativ kontroll (testbrunnar). Den här designen beaktar eventuella additativa effekter av sekventiella högt positiva prov. Därefter testades mikroplattorna med både den manuella och den RCS-automatiserade testmetoden. Efter bearbetning jämfördes antalet falska positiva testbrunnar. RCS-automatiserad testning genererade inte fler testbrunnar med falska positiva resultat än den manuella metoden med de simulerade STM-proverna, även när en extremt hög sekvens av positiva prover fanns på mikroplattan.

I en andra överföringsbedömning kombinerades HPV-positiva PreservCyt-patientprover för att skapa en panel av prover med olika kemiluminiscensnivåer för att ge RLU/CO-värden som var representativa för det intervall som förväntas vid rutinmässig klinisk användning av RCS-automatiserad testning. De positiva proverna låg mellan cirka 200–1800 RLU/CO. För att bedöma potentialen för överföring, inklusive de potentiella additiva effekterna av sekventiella höga positiva prover, placerades de positiva proven i panelen på mikroplattor i ett schackmönster bredvid negativa kontrollbrunnar. Sedan testades dessa plattor med den RCS-automatiserade testmetoden.

Resultaten av den här överföringsbedömningen, med poolade patientprover, tyder på en eventuell falsk positiv frekvens på 0,3 % på grund av överföringseffekt vid utförandet av RCS-automatiserad testning med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet.

QIAGENs erfarenhet av att utföra tester med poolade PreservCyt-prover tyder på att poolning av PreservCyt-patientprover skapar prover som inte uppvisar egenskaper som liknar dem för enskilda patientprov. Även om effekterna av den här poolningen på överföringspotentialen för RCS-automatiserad testning är okända, visade ytterligare preklinisk testning av RCS-automatiserad testning ingen ökad potential för falska positiva resultat på grund av överföring. Dessa bedömningar utfördes med artificiella plasmidprover med DNA-koncentrationer som var nästan 5 gånger högre än vad som observerats kliniskt.

I en tredje överföringsbedömning skapades testprover genom tillsats av fluorescensfärg, i koncentrationer representativa för analysens dynamiska RLU-intervall, till bakgrundsmatriser som låg nära viskositeten hos kliniska prover och *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testreagens. Dessa testprover bearbetades därefter på 3 separata RCS-instrument och överföringspotentialen bedömdes för vart och ett av de följande viktiga stegen i RCS-programmet:

- Provöverföring
- Överföring från platta till platta
- Probtillsats
- Skakning av mikroplatta
- Tvätt av mikroplatta

Fluorescensresultatet mättes vid en exciteringsvåglängd på 485 nm och en emissionsvåglängd på 535 nm och det var tillräckligt sensitivt för att detektera en överföringshändelse i storleksordningen 1:20 000, vilket skulle motsvara ett falskt positivt resultat med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet (dvs. 1 pg i 20 ng). Resultaten av den här bedömningen visade ingen överföringshändelse under något av de viktiga stegen i RCS som skulle kunna leda till falska positiva resultat för *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet.

Reagensstabilitet i systemet

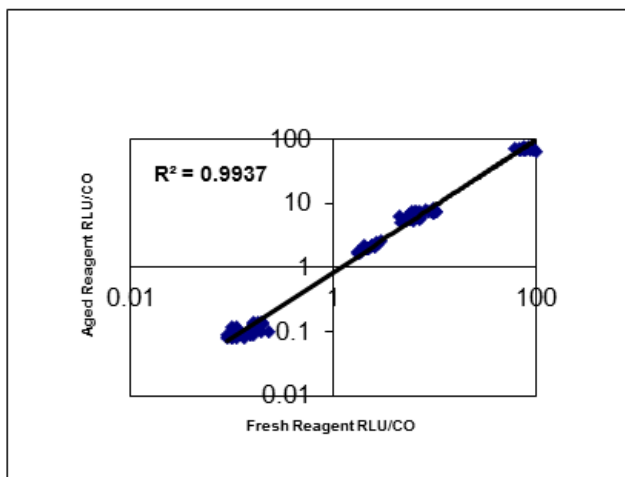
QIAGEN bedömde prestandaegenskaperna för RCS-automatiserad testning vid användning av reagenser som var kvar på systemplattformen under längre perioder. Reagenserna som mest sannolikt utsätts för längre placering i systemet innefattar probblandningen, DR1, DR2 och infångningsmikroplattan.

Testprestanda bedömdes med både nyberedda reagens och reagens som fanns kvar i plattformen på RCS-instrumentet vid rumstemperatur under en period på 16 timmar (för att simulera 2 arbetsskift i laboratoriemiljön). Testning av simulerade kliniska prover utfördes med 2 RCS-instrument på var och en av 2 testdagar med en definierad reagensmatris (se tabell 55 nedan).

Tabell 55. Studiedesign för reagensstabilitet i systemet

RCS-instrument	Dag 1	Dag 2
1	Gamla reagenser	Färsk reagenser
2	Färsk reagenser	Gamla reagenser

Ett diagram över alla RLU/CO-datapunkter visas i figur 3 nedan. Diagrammet och regressionsanalysen för gamla jämfört med färsk reagenser indikerar överensstämmelse mellan gamla och färsk reagenser.



Figur 3. Punktdiagram som jämför analysens kalibrator- och kontrollvärden med gamla och fräska reagens.

Ytterligare undersökning av de överensstämmande resultaten visar att inga kvalitativa resultat ändrades vid användning av gamla reagens (se tabell 56 nedan).

Tabell 56. Överensstämmelse mellan fräska och gamla reagenser

Statistiskt mått	Resultat
Total överensstämmelse (%)	100.0%
(n/N)	(96/96)
95 % KI	97.97–100.0
Positiv överensstämmelse (%)	100.0%
(n/N)	(64/64)
95 % KI	97.97–100.0
Negativ överensstämmelse (%)	100.0%
(n/N)	(32/32)
95 % KI	97.97–100.0
R ²	0.9937
Lutning	0.97
Skärning	0.47
Kappa	1.0

Dataanalysen visar att resultaten är statistiskt identiska för fräska och gamla reagens, vilket tyder på att reagens är tillräckligt stabila när de förvaras i instrumentet under en period på upp till 16 timmar.

Litteraturhänvisningar

1. Broker, T. R. and Botchan, M. (1986) Papillomaviruses: retrospectives and prospectives. In: Botchan, M., Grodzicker, T., and Sharp, P., eds. *DNA Tumor Viruses: Control of Gene Expression and Replication*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 17-36. From the 1985 Cancer Cells Conference at Cold Spring Harbor.
2. Lorincz, A.T. and Reid, R. (1989) Association of human papillomavirus with gynecologic cancer. *Curr. Opin. Oncol.* **1**, 123.
3. Jenson, A.B., Kurman, R.J., and Lancaster, W.D. (1984) Human papillomaviruses. In: Belshe, R.B. *Textbook of Human Virology*. Littleton, MA: PSG Wright, p 951.
4. Becker, T.M., Stone, K.M., and Alexander, E.R. (1987) Genital human papillomavirus infection: a growing concern. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* **14**, 389.
5. McCance, D.J., Walker, P.G., Dyson, J.L., Coleman, D.V., and Singer, A. (1983) Presence of human papillomavirus DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia. *Br. Med. J.* **287**, 784.
6. Naghashfar, Z. et al. (1985) Identification of genital tract papillomaviruses HPV 6 and HPV 16 in warts of the oral cavity. *J. Med. Virol.* **17**, 313.
7. Gissmann, L., Wolnik, L., Ikenberg, H., Koldovsky, U., Schnurch, H.G., and zur Hausen, H. (1983) Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 560.
8. Munoz, N., Bosch, F.X., Shah, K.V., and Meheus, A., eds. (1992) *IARC Scientific Publications no. 119: The Epidemiology of Cervical Cancer and Human Papillomavirus*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
9. Reid, R. et al. (1987) Sexually transmitted papillomaviral infections. I. The anatomic distribution and pathologic grade of neoplastic lesions associated with different viral types. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **156**, 212.
10. Fuchs, P.G., Girardi, F., and Pfister, H. (1988) Human papillomavirus DNA in normal, metaplastic, preneoplastic and neoplastic epithelia of the cervix uteri. *Int. J. Cancer* **41**, 41.

11. Lorincz, A.T., Temple, G.F., Kurman, R.J., Jenson, A.B., and Lancaster, W.D. (1987) Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* **79**, 671.
12. Lorincz, A.T., Lancaster, W.D., and Temple, G.F. (1986) Cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus from a woman with dysplasia of the uterine cervix. *J. Virol.* **58**, 225.
13. Beaudenon, S., Kremsdorf, D., Croissant, O., Jablonska, S., Wain Hobson, S., and Orth, G. (1986) A novel type of human papillomavirus associated with genital neoplasias. *Nature* **321**, 246.
14. Lorincz, A.T., Quinn, A.P., Lancaster, W.D., and Temple, G.F. (1987) A new type of papillomavirus associated with cancer of the uterine cervix. *Virology* **159**, 187.
15. Meyer, T. et al., (1998) Association of rare human papillomavirus types with genital premalignant and malignant lesions. *J. Infect. Dis.* **178**, 252.
16. Lorincz, A.T., Reid, R., Jenson, A.B., Greenberg, M.D., Lancaster, W., and Kurman, R.J. (1992) Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* **79**, 328.
17. Longuet, M., Beaudenon, S., and Orth, G. (1996) Two novel genital human papillomavirus (HPV) types, HPV68 and HPV70, related to the potentially oncogenic HPV39. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 738.
18. Naghashfar, Z.S., Rosenshein, N.B., Lorincz, A.T., Buscema, J., and Shah, K.V. (1987) Characterization of human papillomavirus type 45, a new type 18 related virus of the genital tract. *J. Gen. Virol.* **68**, 3073.
19. Nuovo, G.J., Crum, C.P., de Villiers, E.M., Levine, R.U., and Silverstein, S.J. (1988) Isolation of a novel human papillomavirus (type 51) from a cervical condyloma. *J. Virol.* **62**, 1452.
20. Shimoda, K., Lorincz, A.T., Temple, G.F., and Lancaster, W.D. (1988) Human papillomavirus type 52: a new virus associated with cervical neoplasia. *J. Gen. Virol.* **69**, 2925.










21. Lorincz, A.T., Quinn, A.P., Goldsborough, M.D., McAllister, P., and Temple, G.F. (1989) Human papillomavirus type 56: a new virus detected in cervical cancers. *J. Gen. Virol.* **70**, 3099.
22. Lorincz, A.T., Quinn, A.P., Goldsborough, M.D., Schmidt, B.J., and Temple, G.F. (1989) Cloning and partial DNA sequencing of two new human papillomavirus types associated with condylomas and low grade cervical neoplasia. *J. Virol.* **63**, 2829.
23. Beaudenon, S. et al. (1987) Plurality of genital human papillomaviruses: characterization of two new types with distinct biological properties. *Virology* **161**, 374.
24. Schiffman, M. (1993) Latest HPV findings: some clinical implications. *Contemp. Ob. Gyn.* **38**, 27.
25. Volpers, C.; and Streeck, R.E. (1991) Genome organization and nucleotide sequence of human papillomavirus type 39. *Virology* **181**, 419.
26. Matsukura, T., and Sugase, M. (1990) Molecular cloning of a novel human papillomavirus (type 58) from an invasive cervical carcinoma. *Virology* **177**, 833.
27. Rho, J., Roy-Burman, A., Kim, H., de Villiers, E.M., Matsukura, T., and Choe, J. (1994) Nucleotide sequence and phylogenetic classification of human papillomavirus type 59. *Virology* **203**, 158.
28. Bosch, F.X. et al. (1995) International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**, 796.
29. Kahn, T., Schwarz, E., and zur Hausen, H. (1986) Molecular cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus (HPV 30) from a laryngeal carcinoma. *Int. J. Cancer* **51**, 61.
30. Koutsky, L.A. et al. (1992) 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.
31. Nieminen, P., Aho, M., Vesterinen, E., Stellato, G., Vaheeri, A., Soares, V.R.X., Paavonen, J. (1991) Natural history of HPV infection: preliminary results of a cohort study [abstract]. In: 1991 Papillomavirus Workshop. Seattle, WA p 77.

32. Centers for Disease Control (1987) Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 36(Suppl 2), 3S.
33. Sehulster, L.M., Hollinger, F.B., Dreesman, G.R., and Melnick, J.L. (1981) Immunological and biophysical alteration of hepatitis B virus antigens by sodium hypochlorite disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 762.
34. Martin, L.S., McDougal, J.S., and Loskoski, S.L. (1985) Disinfection and inactivation of the human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy associated virus. *J. Infect. Dis.* **152**, 400.
35. Vernon, S.D., Unger, E.R., and Williams, D. (2000) Comparison of human papillomavirus detection and typing by cycle sequencing, line blotting, and hybrid capture. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 651.
36. Coleman, D. et al. (1993) European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Europe against cancer programme. *Eur. J. Cancer* 29A(Suppl. 4), S1.
37. Lorincz, A.T., Schiffman, M.H., Jaffurs, W.J., Marlow, J., Quinn, A.P., and Temple, G.F. (1990) Temporal associations of human papillomavirus infection with cervical cytologic abnormalities. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **162**, 645.
38. Morrison, E.A.B. et al. (1991) Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasia: a case control study. *Int. J. Cancer* **49**, 6.
39. Wheeler, C.M., Stewart, A.M., Gravitt, P.E., and Cheng, S. (1995) Generation of entire human papillomavirus genomes by long PCR: frequency of errors produced during amplification. *Genome Res.* **5**, 79.
40. Burk R.D. et al. (1996) Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex. Transm. Dis.* **23**, 333.
41. Belinson, J. et al. (2009) Prevalence of type-specific human papillomavirus in endocervical, upper and lower vaginal, perineal and vaginal self-collected specimens: implications for vaginal self-collection. *Int. J. of Cancer* **127**, 1151.
42. Zhao, F. et al. (2012) Pooled analysis of a self-sampling HPV DNA Test as a cervical cancer primary screening method. *J. Natl Cancer Inst.* **104**, 178.

-
43. Lazcano-Ponce, E. et al. (2011) Self-collection of vaginal specimens for human papillomavirus testing in cervical cancer prevention (MARCH): a community-based randomized controlled trial. *Lancet* **378**, 1868.
 44. Lazcano-Ponce, E. et al. (2014) Specimen self-collection and HPV DNA screening in a pilot study of 100,242 women. *Int. J. Cancer* **135**, 109.
 45. Szarewski, A. et al. (2007) Human papillomavirus testing by self-sampling: assessment of accuracy in an unsupervised clinical setting. *J. Med Screen* **14**, 34.
 46. NCCLS (1999) *Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices: Approved Guideline*. NCCLS document E5-A.

Symboler

Symbolerna i följande tabell används i denna bruksanvisning.

Symbol	Symboldefinition
	Räcker till 96 tester
	Räcker till 384 tester
	Medicinteknisk produkt för in vitro-diagnostik
	Katalognummer
	Tillverkare
	Auktoriserad representant inom EU
	Använd före
	Konsultera bruksanvisningen
	GTIN-artikelnnummer (Global Trade Item Number)

Felsökningshandbok

Kommentarer och förslag

Felaktig eller ingen färgförändring observeras under denaturering.

- | | |
|--|--|
| a) DNR är inte berett på rätt sätt | Se till att DNR innehåller indikatorfärgen och har en mörklila färg. |
| b) DNR är inte tillsatt | Se till att DNR har tillsatts till provet genom att mäta provets volym (ska vara 1,5 ml). Om volymen visar att DNR inte har tillsatts ska du tillsätta rätt mängd, blanda och fortsätta med testet om den rätta färgförändringen observeras. |
| c) Provet innehåller blod eller andra material som maskerar färgförändringen | Den exakta färgförändringen som beskrivs väntas inte ske med dessa provtyper; testresultat ska inte påverkas negativt. |
| d) Provets pH kan vara ovanligt surt | Om ingen av dessa orsaker stämmer, kan provet vara ovanligt surt, vilket gör att den väntade färgförändringen inte inträffar. Ta ett nytt prov innan du applicerar ättiksyra i cervix eftersom ett olämpligt prov-pH påverkar testresultaten negativt. |

Kvalitetskontroller ger felaktiga resultat.

- | | |
|---|---|
| a) Fel analysprotokoll har valts för testet | Om analysprotokollet är felaktigt för testet som utförs, ska du avläsa mikroplattan igen inom 30 minuter efter DR2-tillsats med användning av rätt analysprotokoll. |
| b) Omvänd placering av QC1-LR och QC2-HR | Testa om proverna. |
| c) Omvänd placering av HRC och QC2-HR | Testa om proverna. |

Kommentarer och förslag

Felaktig färgförändring observerad under hybridisering.

- | | |
|---|---|
| a) Otillräcklig blandning av probblandning med denaturerade kalibratorer, kvalitetskontroller och/eller prov; eller probblandning är inte tillsatt; eller felaktig reagensvolym är tillsatt | Skaka hybridiseringsmikroplattan eller mikrorörstället som innehåller mikrorör i ytterligare 2 minuter. Om det finns mikrorör eller mikroplattbrunnar som fortfarande är lila, ska du tillsätta ytterligare 25 µl av rätt probblandning och blanda väl. Om det inte sker någon korrekt färgförändring trots tillsats av probblandning och ny blandning, och provet inte innehåller blod eller andra material, ska provet testas igen. |
| b) Provet innehåller blod eller andra material som maskerar färgförändringen | Den exakta färgförändringen som beskrivs väntas inte ske med dessa provtyper; testresultat ska inte påverkas negativt. |
| c) Provet hade < 1000 µl STM | Kontrollera originalprovets volym. Volymen ska vara 1425 µl ± 20 µl (efter avlägsnande av 75 µl alikvot för testning). Om volymen är < 1425 µl, innehöll originalprovet < 1000 µl STM. Ta ett nytt prov. |

Testet godkänns inte i analysvalideringen. Ingen signal observeras i positiva kalibratorer, kvalitetskontroller eller i prover.

- | | |
|---|---|
| a) Ingen prob är tillsatt till probspädningsvätskan | Bered probblandning så som beskrivs i denna bruksanvisning. Märk rören noga. |
| b) Proben kontamineras med RNAs under beredning | Använd pipettspetsar med aerosolbarriär och handskar när proben pipetteras. Bered probblandning i en steril behållare. Använd endast rena, nya reagensbehållare för engångsbruk. |
| c) Otillräcklig blandning av probblandning | När proben har tillsatts till probspädningsvätskan vortexblander du mycket noga vid högsta hastighet i minst 5 sekunder. Det ska bildas en synlig virvel. |
| d) Otillräcklig blandning av probblandning och denaturerat prov | Efter tillsats av probblandning och prov till varje brunn på hybridiseringsmikroplattan eller hybridiseringsmikroröret ska skakning utföras på Rotary Shaker I inställd på 1100 ± 100 rpm i 3 ± 2 minuter. Kontrollera färgförändring från lila till gult i varje mikroplattbrunn eller mikrorör. |

Kommentarer och förslag

- | | |
|--|--|
| e) Felaktig tid eller temperatur under hybridiseringssteget | Hybridisera i 60 ± 5 minuter vid 65 ± 2 °C. Kontrollera temperaturen för Microplate Heater I eller vattenbadet. Kontrollera att Microplate Heater I eller vattenbadet är inställt på att värma upp prover till rätt temperatur och är förvärmade i 60 minuter före användning. Kontrollera att vattennivån är tillräcklig för att värma upp prover till rätt temperatur. Vattenbad ska kalibreras regelbundet. |
| f) Otillräcklig blandning under infångningssteget | Skaka på en Rotary Shaker I i 60 ± 5 minuter vid 20–25 °C så som beskrivs i denna bruksanvisning. Verifiera Rotary Shaker I-hastigheten med kalibrering. (Se Rotary Shaker I Användarhandbok (<i>Rotary Shaker I User Manual</i>)). |
| g) Rätt mängd DR1 tillsattes inte eller inkuberingen skedde inte med den specificerade tiden | Pipettera 75 µl av DR1 i varje brunn på mikroplattan med en 8-kanalspipett. Inkubera vid 20–25 °C i 30–45 minuter. |
| h) Rätt mängd DR2 tillsattes inte eller inkuberingen skedde inte med den specificerade tiden | Pipettera 75 µl av DR2 i varje brunn på mikroplattan med en 8-kanalspipett. Inkubera vid 20–25 °C i 15–30 minuter. |
| i) DML-instrumentet fungerade inte eller felaktig programmering | Se tillämplig användarhandbok till DML-instrumentet och till programvaran för vidare anvisningar eller kontakta QIAGENs tekniska service. |

Förhöjda RLU-värden i kalibratorer, kvalitetskontroller och/eller prov (≥ 200 RLU i många eller alla mikroplattbrunnar). Testet kan underkännas i analysvalideringen.

- | | |
|---|--|
| a) DNR är inte tillsatt; eller felaktig reagensvolym tillsattes; eller otillräcklig blandning av DNR med prover, kalibratorer eller kvalitetskontroller | Kontrollera att den repeterande pipetten tillför rätt mängd innan du tillsätter DNR. Det är viktigt med kalibrerade pipetter. Tillsätt halva volymen av DNR till varje rör och blanda väl. Undvik falska positiva resultat genom att säkerställa att vätskan tvättar hela insidan av röret. Kalibratorer, kvalitetskontroller och prover ska bli lila efter tillsats av DNR. |
|---|--|

Kommentarer och förslag

- | | |
|--|--|
| b) Ljuskäcka i DML-instrumentet; luckan är inte försluten; förslutningen runt luckan är trasig | Kontrollera bakgrundsavläsningen (rådatamätning) av DML-instrumentet genom att avläsa en tom mikroplatta. En avläsning som är större än 50 RLU indikerar att det finns en ljuskäcka. Se tillämplig användarhandbok till DML-instrumentet för anvisningar eller kontakta QIAGENS tekniska service. |
| c) Kontamination av DR2 eller brunnarna i infångningsmikroplattan med DR1 eller exogent alkaliskt fosfatas | Se "Kontaminationskontroll av DR2", sida 128. |
| d) Kontaminerad tvättbuffert | Se "Kontaminationskontroll av tvättanordning och/eller vattenkälla", sida 128. |
| e) Kontaminerad Automated Plate Washer | Se "Kontaminationskontroll av tvättanordning och/eller vattenkälla", sida 128. |
| f) Otillräcklig tvättning av brunnarna på infångningsmikroplattan efter DR1-inkubation | Tvätta brunnarna på infångningsmikroplattan väl med tvättbuffert 6 gånger, antingen genom att överflöda brunnarna eller använda Automated Plate Washer. Det ska inte synas några rester av rosa vätska i brunnarna på mikroplattan efter tvätt. Se Automated Plate Washer Användarhandbok (<i>Automated Plate Washer User Manual</i>) för anvisningar om testning avseende kontamination eller funktionsfel. |
| g) DR1-kontamination av mikroplattbrunnar | Kontrollera att alla arbetsytor är rena och torra. Var försiktig när du använder DR1. Undvik aerosoler. |
| h) Hybridiseringslösning torkas inom samma område med Kimtowels-torkar eller motsvarande luddfria pappershanddukar | Torka inte igen med redan använda Kimtowels-torkar eller motsvarande luddfria pappershanddukar. |
| i) Använde fel torkhanddukar | Använd Kimtowels-torkar eller motsvarande luddfria pappershanddukar för torkning. |

Kommentarer och förslag

Låga PC/NC-kvoter eller stort antal lågt positiva prover med kvoter < 2,0 (> 20 %). Testet kan underkännas i analysvalideringen.

- | | | |
|----|--|--|
| a) | Otillräcklig provberedning | Tillsätt rätt volym av DNR och blanda noggrant med vortexblandning. Undvik falska positiva resultat genom att säkerställa att vätskan tvättar hela insidan av röret.

För PreservCyt-prov måste du se till att tillräcklig blandning och resuspension av cellpelleten slutförs före denatureringsinkubation.

En tydlig färgförändring från genomskinligt till mörkt lila ska observeras. Inkubera i 45 ± 5 minuter vid 65 ± 2 °C. |
| b) | Probblandning otillräckligt blandad eller för litet probblandning har tillsatts | Bered probblandning enligt beskrivningen. Blanda noga med vortexblandning och se till att det bildas en synlig virvel. Probblandning ska tillsättas till rör med en volymetrisk pipett eller en pipett med flera kanaler för att säkerställa rätt tillförsel. |
| c) | Otillräcklig mängd probblandning har tillsatts till varje hybridiseringsmikrorör eller brunn på mikroplattan | Kontrollera att den 8-kanaliga pipetten tillför rätt mängd innan du tillsätter probblandning. Tillsätt 25 µl probblandning till varje mikrorör eller mikroplattbrunn som innehåller denaturerade kalibratorer, kvalitetskontroller och prover. Färgförändringen ska gå från mörklila till gult efter tillsats och noggrann blandning. PreservCyt-prover ska bli rosa istället för gula. |
| d) | Förlust av DR1-aktivitet | Förvara DR1 vid 2–8 °C. Använd före utgångsdatumet. |
| e) | Otillräcklig infångning | Infångningssteget ska utföras med en Rotary Shaker I inställd på 1100 ± 100 rpm. Validera skakarens hastighet genom kalibrering. |
| f) | Otillräcklig tvättning | Tvätta brunnarna på mikroplattan väl med tvättbuffert 6 gånger, antingen genom att överflöda brunnarna eller använda Automated Plate Washer. |
| g) | Kontaminerad tvättbuffert | Se "Kontaminationskontroll av tvättanordning och/eller vattenkälla", sida 128. |

Serie av positiva prover med ungefär samma RLU-värden.

- | | | |
|----|---|---|
| a) | Kontamination av brunnar på infångningsmikroplattan | Täck infångningsmikroplattan under alla inkubationer. Undvik att exponera rör för aerosolkontamination medan analysen utförs. Använd puderfria handskar under |
|----|---|---|

Kommentarer och förslag

under test	manipulationer.
b) DR2-kontamination	Se till att du inte kontaminerar stamlösningen när DR2 pipetteras i brunnarna på infångningsmikroplattan. Undvik att kontaminera DR2 med aerosoler från DR1 eller med laboratoriedamm osv.
c) Funktionsfel i Automated Plate Washer	Se "Kontaminationskontroll av tvättanordning och/eller vattenkälla", sida 128, eller se Automated Plate Washer Användarhandbok (<i>Automated Plate Washer User Manual</i>) för anvisningar om testning för kontamination eller funktionsfel.

Stora CV:n mellan replikat.

a) Felaktig pipettering	Kontrollera att pipetten verkligen tillför reproducerbara volymer. Kalibrera pipetter rutinmässigt.
b) Otillräcklig blandning	Blanda noga vid alla steg. Vortexblanda före och efter denatureringsinkubation och efter tillsats av probblandning. Kontrollera att en synlig virvel bildas.
c) Ofullständig överföring av vätska från hybridiseringsmikrorör eller brunnar på hybridiseringsmikroplatta till brunnar på infångningsmikroplatta	Kontrollera under överföringssteget från hybridiseringsmikroplattan eller hybridiseringsmikrorören till brunnarna på infångningsmikroplattan att reproducerbara volymer överförs.
d) Olämpliga tvättförhållanden	Tvätta brunnarna på mikroplattan väl med tvättbuffert 6 gånger, antingen genom att överflöda brunnarna eller använda Automated Plate Washer.
e) DR1-kontamination av mikroplattbrunnar	Kontrollera att alla arbetsytor är rena och torra. Var försiktig när du använder DR1. Undvik aerosoler.

Falska positiva resultat från kända negativa prover.

a) DR2 kontaminerat	Kontrollera att inga prov korskontamineras medan du delar upp DR2 i alikvoter mellan prover. Om du bara använder en del av ett kit, ska den volym som behövs för det testet alikvoterats i en ren reagensbehållare för engångsbruk innan pipetten fylls.
---------------------	--

Kommentarer och förslag

- | | | |
|----|---|--|
| b) | DR1-kontamination av mikroplattbrunnar | Tvätta brunnarna på mikroplattan väl med tvättbuffert 6 gånger, antingen genom att överflöda brunnarna eller använda Automated Plate Washer. Det ska inte synas några rester av rosa vätska i brunnarna på mikroplattan efter tvätt. |
| c) | Torkning inom samma område på Kimtowels-torkar eller motsvarande luddfria pappershanddukar | Torka inte på ett område som redan har använts. |
| d) | Otillräcklig provberedning | Tillsätt rätt volym av DNR och blanda noggrant med vortexblandning. Undvik falska positiva resultat genom att säkerställa att vätskan tvättar hela insidan av röret.

För manuell beredning av PreservCyt-prover måste du se till att tillräcklig blandning och resuspension av cellpelleten slutförs före denatureringsinkubation. Se bruksanvisningen till <i>digene</i> HC2 Sample Conversion-satsen.

En tydlig färgförändring från genomskinligt till mörkt lila ska observeras. Inkubera i 45 ± 5 minuter vid 65 ± 2 °C. För manuell beredning av SurePath-prover ska du se till att proverna inkuberas i 90 ± 5 minuter vid 65 ± 2 °C.. |
| e) | Olämpliga tvättförhållanden | Wash microplate wells thoroughly with Wash Buffer 6 times, either by overflowing the wells or using the Automated Plate Washer. |
| f) | Kontamination av pipettspets med icke-denaturerat material under överföring av denaturerat prov till hybridiseringsmikroröret eller brunnen på hybridiseringsmikroplattan | The denaturation step of the specimen processing procedure must be performed as directed in these instructions for use. Improper specimen vortexing, tube inversion and agitation can result in incomplete denaturation of non-specific RNA–DNA hybrids endogenous to cervical specimens. For PreservCyt or SurePath specimens in particular, these hybrids are likely to be present on the inside walls of the specimen denaturation tube. To prevent carryover of this non- |

Kommentarer och förslag

denatured cellular material, the pipet tip must not touch the sides of the specimen denaturation tube during transfer of the denatured specimen to the hybridization microtube or hybridization microplate well.

Förhöjda NC-RLU-värden (> 200 RLU). Resten av testet fungerar som förväntat.

- a) DR2 inkuberades vid en temperatur över 20–25 °C. Kör om testet och kontrollera att infångnings- och detektionsstegen inkuberas vid 20–25 °C.
- b) DR2 inkuberades längre än 30 minuter. Avläs mikroplattan efter 15 minuters inkubation (och högst 30 minuter efter inkubation) vid 20–25 °C.
- c) DR2 eller tvättbuffert var kontaminerad med alkaliskt fosfatas eller DR1. Se "Kontaminationskontroll av DR2", sida 128, eller "Kontaminationskontroll av tvättanordning och/eller vattenkälla", sida 128.

Testet godkänns inte i analysvalideringen. Förhöjd $\overline{PCX}/\overline{NCX}$.

Omvänd placering av HRC och QC2-HR Testa om proverna. Läs noga etiketterna på kalibrator- och kvalitetskontrollflaskorna för att förhindra omvänd placering av dessa reagenser.

Kontaminationskontroll av DR2

1. Pipettera 75 µl från den alikvoterade, resterande eller ursprungliga flaskan med DR2 i en tom brunn på infångningsmikroplattan.

Obs! Testning av DR2 i replikat om 3 ger optimal prestandabedömning.

2. Inkubera vid 20–25 °C i 15 minuter. Undvik direkt solljus.
3. Mät mikroplattan med ett DML-instrument.

DR2-kontrollen ska vara < 50 RLU.

Om DR2-värdena är < 50 RLU kan DR2 användas för att upprepa testet.

Om DR2 är kontaminerat (> 50 RLU) skaffar du ett nytt kit och upprepar testet.

Kontaminationskontroll av tvättanordning och/eller vattenkälla

1. Märk brunnarna 1–4. Pipettera 75 µl av DR2 i 4 olika brunnar på infångningsmikroplattan.

Brunn 1 används som DR2-kontrollen.

2. Pipettera 10 µl av tvättbufferten från tvättflaskan i brunn 2 på mikroplattan.
3. Låt tvättbufferten flöda genom tvättanordningens slang. Pipettera 10 µl av tvättbufferten från slangen i brunn 3 på mikroplattan.
4. Skaffa en aliquot av vattnet som användes för att bereda tvättbufferten. Pipettera 10 µl av vattnet i brunn 4 på mikroplattan.
5. Inkubera vid 20–25 °C i 15 minuter. Undvik direkt solljus.
6. Mät mikroplattan med ett DML-instrument.

DR2-kontrollen (brunn 1) ska vara < 50 RLU.

Jämför RLU från brunn 2, 3 och 4 med RLU för DR2-kontrollen. Det enskilda RLU-värdet för brunn 2, 3 och 4 ska inte överskrida RLU för DR2-kontrollen med mer än 50 RLU.

Värden som är mer än 50 RLU högre än DR2-kontrollen indikerar kontamination. Se "Manuell tvättmetod", sida 57, för anvisningar om hur man rengör och underhåller tvättanordningen

Kontaminationskontroll av Automated Plate Washer

1. Märk brunnarna 1–5. Pipettera 75 µl av DR2 i 5 olika brunnar på infångningsmikroplattan. Brunn 1 används som DR2-kontrollen.
2. Pipettera 10 µl av tvättbufferten från tvättflaskan till platttvättaren i brunn 2 på mikroplattan.
3. Pipettera 10 µl av sköljvätskan från sköljflaskan till platttvättaren i brunn 3 på infångningsmikroplattan.
4. Tryck på knappen **Prime** (prima) på platttvättarens knappsats och låt tvättbufferten flöda genom slangarna. Pipettera 10 µl av tvättbufferten från tråget i brunn 4 på mikroplattan.
5. Tryck på knappen **Rinse** (skölj) på platttvättarens knappsats och låt sköljvätskan flöda genom slangarna. Pipettera 10 µl av tvättbufferten från tråget i brunn 5 på mikroplattan.
6. Täck och inkubera i 15 minuter vid 20–25 °C. Undvik direkt solljus.
7. Mät mikroplattan med ett DML-instrument.

DR2-kontrollen (brunn 1) ska vara < 50 RLU.

Jämför RLU från brunn 2, 3, 4 och 5 med RLU för DR2-kontrollen. Det enskilda RLU-värdet för brunn 2, 3, 4 och 5 ska inte överskrida 50 RLU av RLU för DR2-kontrollen.

Värden som överskrider 50 RLU av DR2-kontrollen indikerar kontamination av platttvättaren.

Se Automated Plate Washer Användarhandbok (Automated Plate Washer User Manual) för dekontaminationsproceduren.

Kontaktinformation

Använd QIAGEN-kontaktinformationsbladet som medföljer testkitet om du vill kontakta din lokala QIAGEN-representant.

Den här sidan är med avsikt lämnad tom

Den här sidan är med avsikt lämnad tom

Varumärken: QIAGEN®, Sample to Insight®, *digene*®, Hybrid Capture®, QIASymphony®, Rapid Capture® (QIAGEN Group); ATCC® (American Type Culture Collection); CDP-Star® (Life Technologies Corporation); Corning® (Corning Incorporated); DuraSeal™ (Diversified Biotech); Eppendorf®, Repeater® (Eppendorf AG); Kimtowels® (Kimberly-Clark Corporation); Parafilm® (BEMIS Company, Inc.); pGEM® (Promega Corp); PrepMate®, PrepStain®, SurePath® (Becton, Dickinson and Company); PreservCyt®, ThinPrep® (Hologic, Inc.); VWR® (VWR International, Inc.).

Registrerade namn, varumärken osv. som används i detta dokument, även när de inte uttryckligen har markerats som sådana, får inte betraktas som oskyddade i lag.

Den här produkten och de metoder den använder omfattas ett eller flera av följande patent:

Hybrid Capture-tekniken skyddas av det europeiska patentet med nummer O 667 918 registrerat i Österrike, Belgien, Schweiz, Liechtenstein, Tyskland, Danmark, Spanien, Frankrike, Storbritannien, Grekland, Irland, Italien, Luxemburg, Nederländerna och Sverige.

Patentnummer för Hybrid Capture i USA

6,228,578B1

Patentnummer för HPV i USA

5,876,922 • 5,952,487 • 5,958,674 • 5,981,173

© 2012–2015 QIAGEN, med ensamrätt.

Ordering www.qiagen.com/contact | Technical Support support.qiagen.com | Website www.qiagen.com