

digene[®] HC2 HPV DNA Test

Brugsvejledning

IVD

Σ 96

En in vitro-nukleinsyrehybridiseringsanalyse med signalamplifikation vha. mikrotiterpladekemiluminescens til kvalitativ påvisning af 18 lavrisiko- og højrisikotyper af humant papillomvirus (HPV)-DNA i cervixprøver

Til brug med:

digene HC2 DNA Collection Device

digene Specimen Transport Medium

Hologic PreservCyt[®] opløsning

BD SurePath[®] Preservative Fluid



REF

5196-1330



QIAGEN

19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874
USA

EC REP

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
TYSKLAND

L2126da Rev. 4



Sample & Assay Technologies

INDHOLDSFORTEGNELSE

NAVN OG TILSIGTET ANVENDELSE	1
RESUMÉ OG FORKLARING	2
FUNKTIONSPRINCIP	3
REAGENSER OG MEDFØLGENDE MATERIALER	4
NØDVENDIGE MATERIALER, DER IKKE MEDFØLGER	5
ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER	6
SIKKERHEDSFORANSTALTNINGER	6
HÅNDBTERINGSFORSKRIFTER.....	8
REAGENSFREMSTILLING OG -OPBEVARING	9
PRØVETAGNING OG -HÅNDBTERING	12
CERVIXPRØVER I STM	12
CERVIKALE BIOPSIER	12
CERVIXPRØVER I PRESERVCYT SOLUTION	12
CERVIXPRØVER I SUREPATH PRESERVATIVE FLUID	13
TESTPROCEDURE	14
HØJVOLUMEN-PRØVEKAPACITETSTESTNING MED RAPID CAPTURE SYSTEM	14
MANUEL METODE.....	14
DENATURERING	15
RYSTNING OG DENATURERING	18
HYBRIDISERING: KOMBINERET-PROBECOCTAIL (CPC) OG TO-PROBSMETODER.....	21
HYBRID CAPTURE	23
HYBRID-DETEKTION.....	24
VASK	24
SIGNALAMPLIFIKATION.....	25
VERIFIKATIONSKRITERIER FOR ANALYSEKALIBRERING	27
CUT-OFF-BEREGNING	29
KVALITETSONTROL	30
FORTOLKNING AF PRØVERESULTATER	31
YDEEVNEKARAKTERISTIKKER	32
DATA DER UNDERSTØTTER LAVRISIKO- OG HØJRISIKO-HPV-INDIKATION	32
DATA, DER UNDERSTØTTER DEN PRIMÆRE HØJRISIKO-HPV-SCREENINGSINDIKATION	36
ANALYSESENSITIVITET	38
KOMBINERET-PROBECOCTAIL (CPC) YDEEVNE.....	39
ÆKVIVALENS MELLEEM STM- OG PRESERVCYT SOLUTION-PRØVER.....	39
KORRELLATION AF SUREPATH-PRØVERESULTATER MED STM-PRØVER I EN KLINISK POPULATION.....	40
REPRODUCERBARHED.....	40
HØJRISIKO-HPV-PROBE	41
KRYDSREAKTIVITET	42
KRYDSREAKTIVITETSPANEL	42
KRYDSHYBRIDISERING	43
BLOD OG ANDRE SUBSTANSERS EFFEKT PÅ STM-PRØVER	43
BLOD OG ANDRE SUBSTANSERS EFFEKT PÅ PRESERVCYT SOLUTION-PRØVER	43
DIGENE HC2 HPV DNA TESTS REPRODUCERBARHED MED KLINISKE PRØVER INDSAMLET I STM	43
RLU/CO	44
DIGENE HC2 HPV DNA TESTS REPRODUCERBARHED MED KLINISKE PRØVER INDSAMLET I PRESERVCYT SOLUTION	44
RLU/CO	45
DIGENE HC2 HØJRISIKO-HPV-DNA-TESTENS REPRODUCERBARHED MED PRØVER TAGET MED SUREPATH PRESERVATIVE FLUID.....	45
REPRODUCERBARHED FOR SUREPATH-RESULTATER VED ANVENDELSE AF RAPID CAPTURE SYSTEM TIL ANALYSEBEHANDLING	46
PROCEDUREBEGRÆNSNINGER	47

LITTERATURHENVISNINGER	48
GUIDE TIL PROBLEMLØSNING	51
KONTAMINERINGSKONTROL	55
QIAGEN KONTAKTINFORMATION	56

NAVN OG TILSIGTET ANVENDELSE

Til in vitro-diagnostisk brug.

digene HC2 HPV DNA Test vha. Hybrid Capture[®] 2 (HC2)-teknologi er en nukleinsyrehybridiseringsanalyse med signalamplifikation vha. mikrotiterpladekemiluminescens til kvalitativ påvisning af 18 lavrisiko- og højrisikotyper af humant papillomvirus (HPV)-DNA i cervixprøver.

Cervixprøver, som kan testes med *digene* HC2 HPV DNA Test, omfatter følgende:

- Prøver indsamlet med *digene* HC2 DNA Collection Device
- Prøver, der indsamles med et indsamlingsudstyr af børstetypen eller en børste/spatelkombination og placeret i PreservCyt Solution (der henvises til *digene* HC2-prøvekonversionskittets brugsvejledning for udførlige detaljer).
- Prøver indsamlet i SurePath Preservative Fluid (KUN til test af højrisiko HPV-DNA)
- Biosier indsamlet i *digene* Specimen Transport Medium (STM)

Ved brug af lavrisiko- og højrisiko HPV-prober er brugen af testen denne:

- Til at bistå diagnosen af seksuelt overførte HPV-infektioner med HPV-type 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 og 68.
- Til at skelne mellem to HPV-DNA-grupper: lavrisiko HPV-type 6, 11, 42, 43 og 44 og højrisiko HPV-type 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 og 68; den specifikke tilstedeværende HPV-type kan imidlertid ikke bestemmes.

Ved brug af højrisiko HPV-probe er brugen af testen denne:

- Til påvisning af højrisiko HPV-type 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 og 68, som er blevet påvist som den primære kausale faktor i udviklingen af cervixcancer.
- Som en initial generel populationsscreeningstest til anvendelse med eller uden smear-test, til identifikation af kvinder med forøget risiko for udvikling af cervixcancer eller tilstedeværelse af alvorlig cervixsygdom. En HPV-diagnose bliver mere og mere indikativ for cervixsygdom med stigende alder.
- Som opfølgningstest til patienter efter abnorme resultater af smear-test eller cervixsygdom for at afgøre behovet for henvisning til kolposkopi eller andre opfølgningsprocedurer.
- Som opfølgningstest til patienter med resultater af smear-test i form af Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion (LSIL) eller High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion (HSIL) før kolposkopi. For disse patienter vil et *digene* HC2 HPV DNA Test-resultat hjælpe lægen i patientbehandlingen med risikovurderingen af kvinder ved at bestemme fravær af high-grade sygdom.

digene HC2 HPV DNA Test skal bruges sammen med klinisk information, som stammer fra andre diagnostiske test og screeningstest, objektive undersøgelser og fuld anamnese i overensstemmelse med behørlige patientbehandlingsprocedurer. Resultaterne af *digene* HC2 HPV DNA Test **må ikke** bruges som det eneste grundlag for klinisk vurdering og behandling af patienter.

RESUMÉ OG FORKLARING

Tilstedeværelsen af visse HPV-typer i den kvindelige genitalkanal forbindes med et antal sygdomme, som omfatter condyloma, Bowenoid papulose, cervikal, vaginal og vulvar intraepithelial neoplasi og carcinoma.¹⁻³ Det er generelt accepteret, at disse vira overvejende overføres seksuelt. og at højrisiko HPV-typer er den vigtigste erkendte risikofaktor for at udvikle cervixcancer.⁴⁻⁸

Humane papillomvira består af en icosahedral viruspartikel (virion), der indeholder et 8000 basepar dobbeltstrengt cirkulært DNA-molekyle, der er omringet af et proteinkapsid. Efter infektion af epitheliale celler vil virus-DNA'et blive etableret i hele epitheliums tykkelse, men intakte viruspartikler findes kun i de øvre vævslag. Derfor kan viralt DNA, afhængigt af type og læsionsgrad, findes enten i virioner eller som episomale eller integrerede HPV-sekvenser.

Det har hidtil ikke været muligt at dyrke HPV in vitro, og immunologiske test er utilstrækkelige til bestemmelse af tilstedeværelse af HPV-cervixinfektion. Indirekte evidens for anogenital HPV-infektion kan findes via en fysisk undersøgelse og ved tilstedeværelse af karakteristiske celleforandringer associeret med virusreplikation i celleprøver fra smear-test eller biopsiprøver. Alternativt kan biopsier analyseres med nukleinsyrehybridisering for at påvise tilstedeværelse af HPV-DNA direkte.

HPV 16 og HPV 18 er historisk set blevet anset for højrisiko cancer-associerede HPV'er, og HPV-type 6 og 11 som lavrisiko HPV'er.⁸⁻¹⁰ Det er efterfølgende blevet påvist, at HPV-type 31, 33 og 35 har en intermedier association med cancer.^{2,11-14} På trods af dette nyttige konceptuelle grundrids, tegner disse 7 HPV-typer sig kun for omkring 70 % af cervixneoplasmer.⁹⁻¹¹ Andre HPV'er, heriblandt type 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58 og 68, er blevet identificeret som de væsentligste HPV'er, der kan påvises i de resterende læsioner^{15-20,32-36}. Disse HPV-typer kan også rubriceres i lav-, intermedier- og højrisikogrupper, hvilket baseres på deres relative distribution inden for forskellige histopatologiske diagnosekategorier.^{21, 32-37}

Det er blevet påvist, at HPV-DNA er til stede hos ca. 10 % af kvinder med normalt cervix epithelium, men den faktiske prævalens inden for specifikke kvindegrupper er stærkt påvirket af alder og andre demografiske variabler.^{2,10,21,31} Prospektive undersøgelser har vist, at 15-28 % af HPV-DNA-positive kvinder udvikler squamous intraepithelial neoplasi (SIL) i løbet af 2 år sammenlignet med kun 1-3 % af HPV-DNA-negative kvinder.^{22,23} Risikoen for udvikling var i særdeleshed større for HPV-type 16 og 18 (ca. 40 %) end for andre HPV-typer.²²

FUNKTIONSPRINCIP

digene HC2 HPV DNA Test ved brug af HC2-teknologi er en signalamplificeret hybridiseringsantistofcaptureanalyse, som påvises vha. mikrotiterpladekemiluminescens. Prøver, der indeholder target-DNA'et, hybridiserer med en specifik HPV-RNA-probe. De resulterende RNA:DNA-hybrider fanges på overfladen af en mikrotiterpladebrønd, som er belagt med antistoffer, der er specifikke over for RNA:DNA-hybrider. Immobiliserede hybrider indgår derefter i en reaktion med alkalisk fosfatase-konjugerede antistoffer, der er specifikke for RNA:DNA-hybriderne, og påvises med et kemiluminescerende substrat. Flere alkaliske fosfatase-molekyler er konjugeret på hvert antistof. Flere konjugerede antistoffer bindes til hvert fanget hybrid, der medfører en væsentlig signalamplifikation. I det substratet spaltes af det bundne alkaliske fosfatase, vil der blive afgivet lys, som måles som relative lysenheder (RLU'er) på et luminometer. Intensiteten af det afgivne lys angiver tilstedeværelse eller fravær af target-DNA i prøven.

En RLU-måling, som er lig med eller større end cut-off-værdien, angiver tilstedeværelse af HPV-DNA-sekvenser i prøver. En RLU-måling, som er mindre end cut-off-værdien, angiver fravær af de specifikke HPV-DNA-sekvenser, der testes for, eller HPV-DNA-niveauer, der er under analysens detektionsgrænse.

Højvolumen-prøvekapacitetstestning med *digene* HC2 HPV DNA Test kan udføres med Rapid Capture® System (RCS). Dette instrument bearbejder op til 352 prøver på otte timer. For at muliggøre højvolumen-prøvekapacitetstestning skal alle proceduretrinene udføres af RCS, med undtagelse af prøveindenaturering, kemiluminescenssignalpåvisning og resultatsrapportering.

REAGENSER OG MEDFØLGENDE MATERIALER

Der er 96 test i et HC2 HPV DNA Test-kit (kat.nr. 5196-1330). Antallet af patientresultater vil variere afhængigt af antallet af anvendelser pr. kit:

1 anvendelse = 40 patientresultater (lavrisiko og højrisko)

2 anvendelser = 32 patientresultater (lavrisiko og højrisko)

- 1 x 0,35 ml **Indikatorfarvestof**
Indeholder 0,05 % w/v natriumazid.
- 1 x 50 ml **Denatureringsreagens**
Fortyndet natriumhydroxid-opløsning (NaOH).
- 1 x 5 ml **Probediluent**
Bufret opløsning med 0,05 % w/v natriumazid.
- 1 x 150 µl **Lavrisiko HPV-probe**
HPV 6/11/42/43/44-RNA-probe i bufret opløsning (grøn hætte).
- 1 x 100 µl **Højrisko HPV-probe**
HPV 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68RNA-probe i bufret opløsning (rød hætte).
- 1 x 1 ml **Lavrisiko HPV-kvalitetskontrol**
5 pg/ml (500.000 kopier/ml) klonet HPV 6 DNA og bære-DNA i STM med 0,05 % w/v natriumazid.
- 1 x 1 ml **Højrisko HPV- kvalitetskontrol**
5 pg/ml (500.000 kopier/ml) klonet HPV 16 DNA og bære-DNA i STM med 0,05 % w/v natriumazid.
- 1 x 2,0 ml **Negativ kalibrator**
Bære-DNA i prøvetransportmedium (STM) med 0,05 % w/v natriumazid.
- 1 x 1,0 ml **Lavrisiko HPV-kalibrator**
1 pg/ml klonet HPV 11 DNA og bære-DNA i STM med 0,05 % w/v natriumazid.
- 1 x 1,0 ml **Højrisko HPV-kalibrator**
1 pg/ml klonet HPV 16 DNA og bære-DNA i STM med 0,05 % w/v natriumazid.
- 1 x 1 **Capture-mikrotiterplade**
Belagt med anti-RNA:DNA-hybridantistoffer.
- 1 x 12 ml **Detektionsreagens 1**
Alkalisk fosfatase-konjugerede antistoffer over for RNA:DNA-hybrider i bufret opløsning med 0,05 % w/v natriumazid.
- 1 x 12 ml **Detektionsreagens 2**
CDP-Star[®] med Emerald (smaragd) II (kemiluminescerende substrat).
- 1 x 100 ml **Vaskebufferkoncentrat**
Indeholder 1,5 % w/v natriumazid.

NØDVENDIGE MATERIALER, DER IKKE MEDFØLGER

Hybrid capture system *in vitro*-diagnostisk udstyr og tilbehør^A

digene Hybrid Capture 2 System ("digene HC2 System"), som består af et QIAGEN-godkendt luminometer ("DML-instrument"), en QIAGEN-godkendt personal computer og perifere enheder (skærm, tastatur, mus, printer og printerkabel), *digene* HC2 System Software ("digene-analysesoftware"), *digene* HC2 System Assay Protocols for HPV, LumiCheck Plate Software og *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 (valgfri)^B

Konversionsstativ og stativlåg (valgfri)

digene prøvestativ og stativlåg (valgfri)

EXPAND-4 pipette og stativ (valgfri)^C

digene HC2 DNA Collection Device^D

Rørforsglingsdispenser og skæreudstyr (valgfri, bruges med MST Vortexer 2)

Rapid Capture System (valgfrit til højvolumen-prøvekapacitetstestning)^E

Vaskeapparat

Hybridisering-mikrotiterplader

Mikrotiterpladelåg

Tomme mikrotiterpladerækker (kan fås hos Costar, Model #2581); valgfrie til brug med Automated Plate Washer I

Ekstralange pipettespidser til prøvefjernelse

Prøvetagningsrør

Rack til prøvetagningsrør

Skruenhætter til prøvetagningsrør

Reagensbeholdere til engangsbrug

DuraSeal™ rørforsglingsfilm

Hybridisering-mikrorør

Mikrorørstativ

Pladeforsgling

Almindeligt laboratorieudstyr og tilbehør

65 ± 2°C vandbad, der er tilstrækkeligt stort til at rumme enten et konversionsstativ (36 x 21 x 9 cm) eller prøvestativer Mikrocentrifuge (valgfri til centrifugering af prøvehætteglas for at opnå maksimalt prøvevolumen)

Vortex-mixer med kop fastgjort

Enkanalsmikropipette; med variable indstillinger til 20-200 µl og 200-1000 µl volumener

Repetierende positiv fortrængningspipette, som f.eks.

Eppendorf Repeater® Repeater® pipette eller lignende

8-kanalspipette: variable indstillinger til 25-200 µl volumener

Timer

Natriumhypochloritopløsning 5 % v/v (eller husholdningsklorin)

Parafilm® eller tilsvarende

Engangspipettespidser med aerosol-barriere til enkeltkanalspipette (20 til 200 µl og 200-1000 µl)

Engangspipettespidser til Eppendorf Repeater pipette (25 og 500 µl)

Engangspipettespidser til 8-kanalspipette (25 til 200 µl)

Kimtowels® klude eller lignende frugtfrie papirservietter

Bordovertræk til engangsbrug

Puddefri handsker

5 ml og/eller 15 ml rundbandede polypropylenrør med snaphætte (til probefortynding)

2,0 ml mikrocentrifugerør af polypropylen med hætter

Yderligere udstyr og tilbehør til Surepath Preservative Fluid Specimen Processing

Swinging Bucket Centrifuge, der kan opnå 800 ± 15 x g og rumme 15 ml koniske polypropylencentrifugerør

digene HC2-prøvekonversionsrør (15 ml koniske)^F

7 ml overførselspipetter med standardspids eller tilsvarende

QIAGEN Specimen Transport Media

Engangsspidser til Eppendorf Repeater Pipette (100 µl)

Ekstra udstyr og tilbehør til bearbejdning af PreservCyt Solution-prøver

Swingspandcentrifuge, der er i stand til at nå op på 2900 ± 150 x g og rumme 10 ml eller 15 ml koniske centrifugerør af polypropylen

5 ml serologiske pipetter eller overførselspipetter

digene HC2-prøvekonversionskit^A

Engangspipettespidser til Eppendorf Repeater pipette (50 og 100 µl)

Manuel rysteprocedure:

digene HC2 -prøvekonversionsrør (15 ml koniske)^F, Sarstedt

10 ml koniske rør med hætter eller VWR® eller Corning®

15 ml centrifugerør af polypropylen med koniske bunde og hætter

Rørstativ, der kan holde 10-ml eller 15-ml koniske rør

Multi-Specimen Tube Vortexer 2-procedure

digene HC2-prøvekonversionsrør (15 ml koniske)^F

Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2

Konversionsstativ og låg (specielt til 15 ml koniske rør)

Rørforsglingsdispenser og skæreenhed

DuraSeal rørforsglingsfilm (bruges med MST Vortexer 2)

^A Hos QIAGEN fås kun udstyr og tilbehør, der er valideret med *digene* HC2 HPV DNA Test.

^B Også påkrævet når den halvautomatiske RCS-applikation udføres.

^C Specialfremstillet emne. Andre specialfremstillede, ekspanderbare multikanalspipetter kan anvendes, såfremt spidsmelletrum på 3,2 cm kan opnås i ekspanderet position. Alternativt kan der anvendes en enkeltkanalspipette, der kan pipettere 75 µl.

^D *digene* HC2 HPV DNA Test ydeevnekaraktistikker blev kun etableret med de angivne prøvetagningskits.

^E Der henvises til *Brugermanualen for Rapid Capture System* for særlig vejledning vedrørende brugen af dette system til højvolumen-prøvekapacitetstestning med denne analyse.

^F *digene* HC2-prøvekonversionsrør (VWR eller Corning®), der fås hos QIAGEN, skal anvendes for at sikre korrekt analyseudførelse, når Multi-Specimen Tube Vortexer 2-proceduren anvendes.

ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

LÆS ALLE VEJLEDNINGER OMHYGGELIGT, FØR TESTEN ANVENDES.

SIKKERHEDSFORANSTALTNINGER

ALLE PRØVER skal anses som potentielt infektiøse. Ingen kendt testmetode kan med fuldstændig sikkerhed garantere, at prøverne ikke overfører smitte. Det anbefales, at humane prøver håndteres i overensstemmelse med de behørigte nationale/lokale biosikkerhedspraksis. Brug disse regler i forbindelse med materialer, som indeholder eller mistænkes for at indeholde smittefarlige stoffer. Disse forholdsregler omfatter, men er ikke begrænset til, følgende:

1. Der må ikke pipetteres med munden.
2. Der må ikke ryges eller indtages mad eller drikkevarer i områder, hvor der håndteres reagenser eller prøver.
3. Brug puddefri engangshandsker til håndtering af reagenser eller prøver. Vask hænderne grundigt, når testen er udført.
4. Rengør og desinficer alle spild af prøver med et tuberculocidalt desinfektionsmiddel som f.eks. 0,5 % v/v natriumhypochlorit eller andet velegnet desinfektionsmiddel.^{42,43}
5. Dekontaminér og bortskaf alle prøver, reagenser og andre potentielt kontaminerede materialer i overensstemmelse med nationale og lokale forordninger.

Nogle reagenser indeholder natriumazid. Der har været indberetninger om, at natriumazid kan danne bly- eller kobberazid i laboratoriets afløbsinstallationer. Disse azider kan eksplodere ved rystelser, f.eks. hvis der hamres. For at forhindre ophobning af bly- eller kobberazid skal afløbene skylles grundigt med vand efter bortskaffelse af opløsninger, der indeholder natriumazid. For at fjerne kontaminering fra gamle afløb, der mistænkes for at indeholde en ophobning af azid, anbefaler USA's Occupational Safety and Health Administration (arbejderbeskyttelsesstyrelse) følgende: (1) sug væske ud af vandlåsen ved at bruge en gummi- eller plastikslange som hævert, (2) fyld denne med 10 % v/v natriumhydroxidopløsning, (3) lad det stå i 16 timer og (4) skyl derefter grundigt med vand.

RCS-automatiseret test

Der henvises til *Brugermanualen for Rapid Capture System* for yderligere Advarsler og forholdsregler vedrørende brugen af dette system til højvolumen-prøvekapacitetstestning.

SIKKERHEDS- OG RISIKOSÆTNINGER FOR KOMPONENTER

Følgende risiko- og sikkerhedssætninger gælder for komponenterne i *digene* HC2 HPV DNA Test-kittet:

Vaskebufferkoncentrat



Indeholder: Natriumazid. Advarsel! Farlig ved indtagelse. Kan forårsage uønskede langtidsvirkninger i vandmiljøet. Undgå udledning til miljøet. Dette materiale og dets beholder skal bortskaffes som farligt affald.

Denatureringsreagens



Indeholder: Natriumhydroxid. Fare! Giver alvorlige ætsninger af hud og øjenskader. Kan korrodere metaller. Dette materiale og dets beholder skal bortskaffes som farligt affald. HVIS DET KOMMER I ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis det kan gøres nemt. Fortsæt med at skylle. HVIS DET KOMMER PÅ HUDEN (eller i håret): Fjern straks al kontamineret beklædning. Skyl huden med vand/tag brusebad. Ring omgående til Giftlinjen, eller søg læge. Opbevares

under lås. Brug beskyttelseshandsker/særligt arbejdstøj/beskyttelsbriller/ansigtsskærm.

Probe Diluent



Indeholder: Eddikesyre, polyakrylsyre. Fare! Giver alvorlige ætsninger af hud og øjenskader. Dette materiale og dets beholder skal bortskaffes som farligt affald. HVIS DET KOMMER I ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis det kan gøres nemt. Fortsæt med at skylle. HVIS DET KOMMER PÅ HUDEN (eller i håret): Fjern straks al kontamineret beklædning. Skyl huden med vand/tag brusebad. Ring omgående til Giftlinjen, eller søg læge. Opbevares under lås. Brug beskyttelseshandsker/særligt arbejdstøj/beskyttelsbriller/ansigtsskærm.

Højrisiko HPV-kalibrator

Advarsel! Let hudirriterende. Hvis hudirritation forekommer: Søg læge.

Lavrisiko HPV-kalibrator

Advarsel! Let hudirriterende. Hvis hudirritation forekommer: Søg læge.

Højrisiko HPV- kvalitetskontrol

Advarsel! Let hudirriterende. Hvis hudirritation forekommer: Søg læge.

Lavrisiko HPV-kvalitetskontrol

Advarsel! Let hudirriterende. Hvis hudirritation forekommer: Søg læge.


Negativ kalibrator

Advarsel! Let hudirriterende. Hvis hudirritation forekommer: Søg læge.


Yderligere oplysninger

Sikkerhedsdatablade: www.qiagen.com/safety

HÅNTERINGSFORSKRIFTER

1. Til in vitro-diagnostisk brug.
2. Cervixbørsten må kun anvendes til ikke-gravide kvinder.
3. Reagenserne må ikke bruges efter udløbsdatoen, som er anført ved siden af symbolet  på den yderste æskes mærkat.
4. Hvis analysen udføres uden for de angivne tids- og temperaturområder, kan der produceres ugyldige resultater. Analyser, som ikke udføres inden for de fastlagte tids- og temperaturområder, er ugyldige og skal gentages.
5. *digene* HC2 HPV DNA Test-procedure, Verifikationskriterier for analysekalibrering, Kvalitetskontrol og Fortolkning af prøveresultater skal følges nøje for at sikre pålidelige testresultater.
6. Det er vigtigt at pipettere præcist det reagensvolumen, som er angivet og at blande omhyggeligt efter hver reagenstilsætning. Hvis dette ikke overholdes, kan det resultere i fejlagtige testresultater. Når de anførte farveændringer forekommer, bekræftes det, at disse betingelser er opfyldt.
7. Kitkomponenterne er blevet testet som en enhed. Komponenter fra andre kilder eller forskellige partier **må ikke** udveksles.
8. Nukleinsyrer er meget følsomme over for nukleasenedbrydning i omgivelserne. Nukleaser findes på human hud og på overflader eller materialer, som håndteres af mennesker. Arbejdsflader skal rengøres og dækkes med bordbeskyttelse til engangsbrug, **og der skal anvendes puddefri handsker under udførelsen af alle analysetrin.**
9. Sørg for at undgå kontaminering af Capture Microplate (den fangende mikrotiterplade) og Detection Reagent (detektionsreagens) 2 med eksogent alkalisk fosfatase under analysens udførelse. Substanser, som kan indeholde alkalisk fosfatase omfatter Detection Reagent 1, bakterier, spyt, hår og olier fra huden. **Det er især vigtigt at dække Capture Microplate (den fangende mikrotiterplade) efter vasketrinet og under inkubering med Detection Reagent 2, da eksogent alkalisk fosfatase kan reagere med Detection Reagent 2 og producere falsk-positive resultater.**
10. Beskyt Detection Reagent 2 mod længere udsættelse for direkte lys. Brug Detection Reagent 2 umiddelbart efter alikvotering og undgå direkte solllys.
11. Repetitionspipetten skal spædes inden reagenslevering og jævnlige undersøges for store luftbobler. En stor mængde luftbobler i repetitionspipettespidsen kan forårsage unøjagtig levering og kan undgås ved at fylde pipetten, dispensere al væsken og genfylde den. Se pipetteleverandørens brugsanvisning for specifik vejledning.
12. Multikanalspipettering skal udføres vha. den omvendte pipetteringsteknik (se *Hybrid-detektion*) for dispensering af Detection Reagent 1 og 2. Kontrollér hver pipettespids på multikanalspipetten for korrekt tilpasning og påfyldning.
13. Sørg for, at hver mikrotiterpladebrønd vaskes grundigt, som anført i Manuel vask-vejledningen. Utilstrækkelig vask vil resultere i forøget baggrund, og kan forårsage falsk-positive resultater. Residual-vaskebuffer i brønde kan medføre reduceret signal eller dårlig reproducérbarhed.
14. Lad Hybrid Capture System Microplate Heater (varmeplade for mikrotiterplade) I varme op i mindst 60 minutter til den når en ligevægtstemperatur på 65°C ±2°C fra kold start. Hvis denne opvarmningsperiode ikke tillades, kan det medføre, at hybridiseringsmikrotiterpladen smelter. Se *Brugermanualen for Microplate Heater (varmeplade for mikrotiterplade)* for detaljer.

REAGENSFREMSTILLING OG -OPBEVARING

1. Ved modtagelse skal kittet opbevares ved 2-8°C. Wash Buffer Concentrate (vaskebufferkoncentrat), Denaturation Reagent (denatureringsreagens) og Indicator Dye (indikatorfarvestof) kan opbevares ved 2-30°C efter ønske.
2. Må ikke anvendes efter udløbsdatoen, som er anført ved siden af symbolet  på æskens mærkat, eller de fremstillede reagensers udløbsdato (se nedenfor).
3. Alle reagenser er klar til brug med undtagelse af Denaturation Reagent (denatureringsreagens), lavrisiko- og højrisiko HPV-prober og Wash Buffer Concentrate (vaskebufferkoncentrat).

En kombineret-probecocktail-metode (CPC) er til rådighed til at teste prøver for tilstedeværelsen af nogen af de 18 HPV-typer. For at teste således skal en kombineret-probecocktail fremstilles ved at blande fortyndet lavrisiko HPV-probeblending og fortyndet højrisiko HPV-probeblending med hinanden inden *digene* HC2 HPV DNA Test udføres. To-probsmetoden anvender separate lavrisiko og højrisiko HPV-probeblandinger. Se vejledning nedenfor.

For højvolumen-prøvekapacitetstestning henvises der til *Brugermanualen for Rapid Capture System* til fremstilling af HPV-probeblending(er), vaskebuffer, Detection Reagent 1 og Detection Reagent 2, da disse vejledninger er specifikke for brugen af dette system til højvolumen-prøvekapacitetstestning.

REAGENS	FREMSTILLINGSMETODE												
Denatureringsreagens	<p>Fremstil først:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tilsæt 5 dråber Indicator Dye (indikatorfarvestof) til Denaturation Reagent-flasken (denatureringsreagens), og bland grundigt. Denatureringsreagensen skal have en ensartet, mørkviolet farve. • Efter fremstilling er denatureringsreagensen stabil i tre måneder, når den opbevares ved 2-8°C. Mærk den med den nye udløbsdato. Hvis farven blegner, skal der tilsættes 3 dråber indikatorfarvestof, hvorefter der blandes grundigt før brug. <p>Advarsel: Denatureringsreagens er ætsende. Brug særligt arbejdstøj, egnede beskyttelseshandsker og beskyttelsesbriller/ansigtsskærm under arbejdet. Vær forsigtig ved håndtering.</p>												
Lavrisiko HPV-probeblending (fremstillet fra lavrisiko HPV-probe og probediluent-reagenser)	<p>Under prøvedenatureringsinkubation fremstilles:</p> <p>Vigtigt: Prober kan sommetider sidde fast i hætteglassets låg.</p> <p>Bemærk: Sørg for at undgå RNase-kontaminering af probe og probeblending. Brug aerosol-barriere pipettespidser til pipetteringsprober. Probediluent er viskøs.</p> <p>Sørg for, at der blandes grundigt ved forberedelsen af HPV-prober. Der skal dannes en synlig hvirvel i væsken under blandetrinet. Ufuldstændig blanding kan resultere i reduceret signal.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Centrifuger lavrisiko HPV-proben i et kort øjeblik for at bringe væsken ned til bunden af hætteglasset. Bank den let for at blande indholdet. • Bestem mængden af probeblending, der kræves (25 µl/test). Det anbefales, at der fremstilles ekstra probeblending for at kompensere for det volumen, som kan gå tabt i pipettespidser eller på siden af hætteglasset. Der henvises til de foreslåede volumener, der er anført nedenfor. Det mindste antal brønde, der anbefales ved hver brug er 24. Hvis mindre end 24 brønde pr. analyse ønskes, kan det samlede antal test pr. kit blive reduceret pga. begrænsede probe- og probediluentvolumener. • Overfør den påkrævede mængde probediluent til en ny engangsbeholder. Afhængigt af antallet af test anbefales enten et 5 ml eller 15 ml rundbundet polypropylenrør med snaphætte. Fremstil en 1:25 fortynding af lavrisiko HPV-proben i probediluent til fremstilling af probeblending. <table border="1" data-bbox="576 1705 1380 1864"> <thead> <tr> <th>Antal test/rækker</th> <th>Probediluent-volumen*</th> <th>Probevolumen*</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>48/6</td> <td>2,0 ml</td> <td>80,0 µl</td> </tr> <tr> <td>24/3</td> <td>1,0 ml</td> <td>40,0 µl</td> </tr> <tr> <td>Pr. brønd</td> <td>0,045 ml</td> <td>1,8 µl</td> </tr> </tbody> </table> <p>*Disse værdier inkluderer det anbefalede ekstravolumen.</p>	Antal test/rækker	Probediluent-volumen*	Probevolumen*	48/6	2,0 ml	80,0 µl	24/3	1,0 ml	40,0 µl	Pr. brønd	0,045 ml	1,8 µl
Antal test/rækker	Probediluent-volumen*	Probevolumen*											
48/6	2,0 ml	80,0 µl											
24/3	1,0 ml	40,0 µl											
Pr. brønd	0,045 ml	1,8 µl											

	<ul style="list-style-type: none"> • Pipettér lavrisiko HPV-proben i probediluent ved at placere pipettespidsen mod rørets indvendige væg lige over væskeoverfladebuen og uddriv indholdet. Spidsen må ikke neddyppes i probediluenten. • Ryst i mindst 5 sekunder ved maksimal hastighed for at blande grundigt. Der skal dannes en synlig hvirvel. Mærk som lavrisiko-probeblending, og opbevar i en ren, lukket beholder, indtil den skal bruges. Ubrugt probeblending skal bortskaffes. 												
Højrisiko HPV-probeblending	Skal fremstilles som lavrisiko HPV-probeblending ovenfor. Afmærk som "Højrisiko HPV-probeblending". Ubrugt probeblending skal bortskaffes.												
Kombineret-probecocktail	Skal fremstilles som lavrisiko HPV-probe og højrisiko HPV-probeblandinger, der er beskrevet ovenfor. Tilsæt hele indholdet af fortyndet lavrisiko HPV-probeblending til røret med fortyndet højrisiko HPV-probeblending. Bland grundigt ved at ryste i mindst 5 sekunder ved maksimal hastighed. Der skal dannes en synlig hvirvel. Afmærk som "Kombineret-probecocktail." Ubrugt probeblending skal bortskaffes.												
Vaskebuffer	<p>Under capture-trinet fremstilles:</p> <p>For Hybrid Capture System Automated Plate Washer (automatiseret pladevaskeapparat) kan vaskebufferen fremstilles som beskrevet ovenfor og opbevares i en ren, lukket beholder, eller der kan fremstilles 1 l ad gangen, som placeres i Automated Plate Washers vasketanke. For blandingsvolumener - se nedenstående tabel:</p> <p>Se brugermanualen for Automated Plate Washer (automatiseret pladevaskeapparat) for pleje- og vedligeholdelsesvejledning.</p> <p>Advarsel: Vaskebufferkoncentrat er giftigt ved indtagelse. Brug særligt arbejdstøj, egnede beskyttelseshandsker og beskyttelsesbriller/ansigtsskærm under arbejdet. Tilsæt vand til vaskebufferkoncentratet, når det klargøres, for at minimere eksponering.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Mængde vaskebuffer koncentrat</th> <th>Mængde destilleret eller demineraliseret vand</th> <th>Endelig volumen af vaskebuffer</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>33,3 ml</td> <td>966,7 ml</td> <td>1 l</td> </tr> <tr> <td>66,6 ml</td> <td>1,933,4 ml</td> <td>2 l</td> </tr> <tr> <td>100 ml</td> <td>2,900 ml</td> <td>3 l</td> </tr> </tbody> </table> <p>Bemærk: Det er meget vigtigt, at strømmen altid er tilsluttet til Automated Plate Washer. Herved tillades det, at vedligeholdelsesskylning kan udføres, når enheden har været ude af brug i otte timer.</p> <p>Før hver analysekørsel skal det sikres, at Automated Plate Washers affaldstank er tom, og at dens skylletank er fyldt med destilleret eller demineraliseret vand.</p> <p>For den manuelle pladevask-metode:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bland vaskebufferkoncentratet grundigt. • Fortynd 100-ml Wash Buffer Concentrate (vaskebufferkoncentrat) med 2,9 l destilleret eller demineraliseret vand i vaskeapparatet og bland grundigt (slutvolumen skal være 3 l). • Forsegil beholderen for at undgå kontaminering og fordampning. <p>Efter fremstilling er vaskebufferen stabil i tre måneder, når den opbevares ved 2-30°C. Mærk den med den nye udløbsdato. Hvis vaskebufferen har været afkølet, skal den opnå en ligevægtstemperatur på 20-25°C før brug.</p> <p>Det anbefales, at vaskeapparatet og dets slanger rengøres med 0,5 % natriumhypochloritopløsning og skylles grundigt igennem med destilleret eller demineraliseret vand en gang hver tredje måned for at forhindre mulig kontaminering med alkalisk fosfatase, som findes i bakterier og skimmelsvampe.</p>	Mængde vaskebuffer koncentrat	Mængde destilleret eller demineraliseret vand	Endelig volumen af vaskebuffer	33,3 ml	966,7 ml	1 l	66,6 ml	1,933,4 ml	2 l	100 ml	2,900 ml	3 l
Mængde vaskebuffer koncentrat	Mængde destilleret eller demineraliseret vand	Endelig volumen af vaskebuffer											
33,3 ml	966,7 ml	1 l											
66,6 ml	1,933,4 ml	2 l											
100 ml	2,900 ml	3 l											

VOLUMENER TIL BRUGSKLARE REAGENSER**Detection Reagent
1 og Detection
Reagent 2****Umiddelbart før brug:**

Bland reagensen grundigt, og afmål derefter omhyggeligt det behørigt volumen Detection Reagent 1 eller Detection Reagent 2 i en ren reagensbeholder ved at følge nedenstående retningslinjer. For at undgå kontaminering må disse reagenser **IKKE** returneres til de originale flasker: **Eventuelt overskydende materiale skal bortskaffes efter brug**. Hvis der ikke anvendes en 8-kanalspipette, kan en passende repetitionspipette anvendes i stedet for. I dette tilfælde skal alikvoter af reagensen fyldes i et polypropylenrør af tilstrækkelig størrelse til at indeholde det påkrævede volumen, som anvist nedenfor.

**Antal
prøver/rækker****Volumen detektions-
reagens 1 eller 2**

96/12

flaskeindhold

72/9

7,0 ml

48/6

5,0 ml

24/3

3,0 ml

1 test

0,125 ml

PRØVETAGNING OG -HÅNTERING

Cervixprøver, der indsamles og transporteres med *digene* HC2 DNA Collection Device (der består af en cervixbørste og *digene* prøvetransportmedium) eller prøver, der indsamles med et indsamlingsudstyr af børstetypen eller børste/spatelkombination og placeres i PreservCyt Solution, eller cervixprøver taget i Sure Path Preservative Fluid, er de eneste prøver, som anbefales til brug med *digene* HC2 HPV DNA Test. Prøver, som tages med andet prøvetagningsudstyr eller transporteres i andre transportmedier, er ikke blevet kvalificeret til brug med denne analyse. Dette kits ydeevnekaraktistikker er kun blevet etableret med de to angivne prøvetagningskits. Cervikale prøver skal tages før applikationen af eddikesyre eller jod, hvis der udføres en kolposkopisk undersøgelse. Se *digene* HC2 DNA Collection Device brugsvejledningen for yderligere metoder til prøvetagning og håndtering.

CERVIXPRØVER I STM

STM-prøver kan opbevares i op til to uger ved rumtemperatur og sendes til testlaboratoriet uden afkøling. Prøver skal afsendes i en isoleret beholder vha. et døgntransportfirma eller transportfirma, der kan levere inden for 2 dage. På testlaboratoriet skal prøver opbevares ved 2-8°C, hvis analysen skal udføres inden for en uge. Hvis analysen skal udføres mere end 1 uge senere, opbevares prøverne ved -20°C i op til 3 måneder (se *Bemærkninger* under *Cervixbiopsier* inden nedfrysning). Prøvetransportmediet (STM) er blevet tilsat et konserveringsmiddel for at hæmme bakterievækst og bibeholde DNA'ets integritet. Det er **ikke beregnet** til at bevare organismers eller cellers levedygtighed. *digene* HC2 DNA Collection Device må ikke bruges til at indsamle prøver fra gravide kvinder.

CERVIKALE BIOPSIER

Frisk indsamlede cervixbiopsier på 2-5 mm i diameter kan ligeledes analyseres med *digene* HC2 HPV DNA Test. Biopsiprøver skal øjeblikkeligt anbringes i 1,0 ml STM og opbevares i frossen tilstand ved -20°. Biopsiprøver kan sendes ved 2-30°C og leveres næste dag til testlaboratoriet og opbevares ved -20°C, indtil de bearbejdes. Biopsier, der er mindre end 2 mm i diameter, bør ikke anvendes.

Bemærkninger: For at forhindre at hætterne springer af prøverør, som sendes eller opbevares i frossen tilstand:

- Før prøver, der tidligere har været nedfrosne, sendes, skal hætterne dækkes med Parafilm. Prøver kan forsendes i frossen tilstand eller ved 20-25°C.
- Når prøver tages ud af fryseren til testning, skal hætterne øjeblikkeligt udskiftes med skruelhætter til prøvetagningsrør.

CERVIXPRØVER I PRESERVCYT SOLUTION

Prøver, som er taget med et indsamlingsudstyr af børstetypen eller børste/spatelkombination og anbragt i PreservCyt Solution til brug ved udførelse af ThinPrep® Pap Test-præparatglas, kan bruges i *digene* HC2 HPV DNA Test. Prøver skal tages på rutinemæssig måde og ThinPrep Pap Test-præparatglas skal tilberedes i henhold til Hologic-vejledningen.

Bemærk: Der skal være mindst 4-ml PreservCyt Solution til overs til *digene* HC2 HPV DNA Test. Hvis prøver, hvor der er mindre end 4-ml tilbage efter Pap-testen, er blevet tilberedt, vil prøven måske ikke indeholde tilstrækkeligt materiale, og være falsk-negativ *digene* HC2 HPV DNA Test.

PreservCyt Solution-prøver kan opbevares i op til tre måneder ved mellem 2°C og 30°C efter de tages og inden de bearbejdes til *digene* HC2 HPV DNA Test. PreservCyt-opløsningsprøver kan ikke fryses. Der henvises til *PreservCyt-prøvefremstillingsprocedure*.

CERVIXPRØVER I SUREPATH PRESERVATIVE FLUID

(KUN højrisiko HPV-DNA-test)

Manuel prøveklargøring af SurePath-prøver udføres med post-gradient-cellepillen, der er resultatet af klargøringen af SurePath-smear-test-objektglassene. Klargør SurePath-smear-test-objektglassene iht. de relevante anvisninger for BD PrepStain[®]-objektglasprocessor.

Vigtigt: Umiddelbart efter klargøring af SurePath-smear-test-objektglasset skal der pipetteres 2,0 ml SurePath Preservative Fluid i centrifugerøret med restcellepillen. Dette bevarer integriteten af post-gradient-cellepillen for udførelse af *digene* HC2 HPV DNA Test.

Post-gradient-cellepillen med SurePath Preservative Fluid kan opbevares i op til 4 uger ved 2–30°C før prøveklargøring til *digene* HC2 HPV DNA Test.

Post-gradient-cellepille SurePath-prøver klargøres som anført i denne brugsvejledning. Resultatet af den manuelle prøveklargøring er en denatureret prøve, der er klar til at gå videre til testens hybridiseringstrin.

TESTPROCEDURE

Prøver kan indeholde smittefarlige stoffer og skal håndteres i henhold hertil. *digene* HC2 HPV DNA Test HPV DNA Test kan udføres manuelt, som beskrevet i denne brugsvejledning, eller med Rapid Capture System instrumentet til højvolumen-prøvekapacitetstestning.

HØJVOLUMEN-PRØVEKAPACITETSTESTNING MED RAPID CAPTURE SYSTEM

Rapid Capture System er et almindeligt anvendt, automatiseret pipetterings- og fortyndingssystem, som kan anvendes med *digene* HC2 HPV DNA Test til højvolumen-prøvekapacitetstestning. Dette system kan håndtere op til 352 prøver på otte timer, inklusiv en 3,5-timers periode under hvilken brugerindgreb ikke er nødvendig; op til 704 prøveresultater kan genereres på 13 timer. Denaturering af de prøver, som tilberedes til testning, udføres selvstændigt af RCS'en, inden prøverne anbringes på RCS-plattformen. Kemiluminescenssignalpåvisning og resultatsrapportering udføres vha. offline-DML-instrumentet, som er fælles for både den manuelle metode og RCS-metoden. Proceduretrinene i Hver af *digene* HC2 HPV DNA Test udføres i præcis samme rækkefølge som den manuelle testprocedure. RCS-applikationen gør det muligt at trininddele bearbejdningen af op til 4 mikrotiterplader, der hver især indeholder prøver samt de nødvendige kvalitetskontroller og kalibratorer.

Ved anvendelse af Rapid Capture System henvises der til *Brugermanualen for Rapid Capture System*, som leveres med instrumentet, sammen med denne brugsvejledning, til den nødvendige proceduremæssige og beskrivende information.

MANUEL METODE

Opstilling

1. Hvis Microplate Heater I (varmeplade for mikrotiterplade) anvendes, **skal den varme op i mindst 60 minutter for at nå en ligevægtstemperatur på $65 \pm 2^\circ\text{C}$ fra kold start.** Se *Brugermanualen for Microplate Heater I (varmeplade for mikrotiterplade)* for detaljer.
2. Kontrollér, at vandbadets temperatur er 65°C , og at der er tilstrækkeligt vand til at dække hele indholdet i prøverørene.
3. Tag prøverne og **alle** nødvendige reagenser ud af køleskabet, **inden analysen påbegyndes.** Lad dem nå op på $20\text{-}25^\circ\text{C}$ i løbet af 15 til 30 minutter.

Bemærk: Tilbered PreservCyt Solution-prøver og SurePath-prøver, inden prøver, der er blevet denatureret tidligere, og kitreagenser bringes op på rumtemperatur.

4. Brug *digene* analysesoftwaren til at oprette et analysepladelayout. Der henvises til den behørigte brugsvejledning for vejledning om, hvordan et pladelayout oprettes.
5. Anbring kalibratorer, kvalitetskontroller og prøver, der skal testes, i et prøverørstativ i den samme rækkefølge, som de vil blive testet i. **Den negative kalibrator, lavrisiko HPV-kalibratore og højrisiko HPV-kalibrator skal testes FØRST.** Den negative kalibrator (NC), lavrisiko HPV-kalibrator (LRC) eller højrisiko HPV-kalibrator (HRC), lavrisiko kvalitetskontrol (QC1-LR), højrisiko kvalitetskontrol (QC2-HR) samt prøver skal køres i en kolonnekonfiguration til 8 mikrotiterpladebrønd. Se *layout-eksemplet* nedenfor.

Layout-eksempel for kørsel af 24 mikrotiterpladebrønde:			
Række	Kolonne		
	1	2	3
A	NC	Prøve 1	Prøve 9
B	NC	Prøve 2	Prøve 10
C	NC	Prøve 3	Prøve 11
D	LRC eller HRC	Prøve 4	Prøve 12
E	LRC eller HRC	Prøve 5	Prøve 13
F	LRC eller HRC	Prøve 6	Prøve 14
G	QC1-LR	Prøve 7	Prøve 15
H	QC2-HR	Prøve 8	Prøve 16

6. Hvis kombineret-probecocktail-metoden (CPC) anvendes, skal NC, LRC og HRC testes tredobbelt med kombineret-probecocktail i den samme mikrotiterplade. Brug brønd A1, B1 og C1 til NC og brønd D1, E1, F1, G1, H1 og A2 til henholdsvis LRC og HRC. Brug brønd B2 og C2 til henholdsvis QC1-LR- og QC2-HR-kvalitetskontroller og prøverne, der starter i D2. **CPC-proceduren er ikke blevet valideret til brug med Rapid Capture System.**
7. For to-probsmetoden skal lavrisiko HPV-probeblendingstestene udføres på mikrotiterpladens venstre side og højrisiko HPV-probeblendingstestene på den højre side.

Test FØRST den negative kalibrator (NC) og lavrisiko-kalibratoren (LRC) tredobbelt med lavrisiko HPV-probeblendingen. Test derefter kvalitetskontroller (QC1-LR og QC2-HR) og prøver enkeltvist, ligeledes med lavrisiko HPV-probeblendingen. Anbring NC-replikater i A1, B1, C1; LCR-replikater i D1, E1, F1, QC1-LR i G1, QC2-HR i H1 og prøverne begyndende i A2.

Test DEREFTER NC og højrisiko-kalibratoren (HRC) tredobbelt med højrisiko HPV-probeblendingen. Test derefter QC1-LR- og QC2-HR-prøver enkeltvist, ligeledes med højrisiko HPV-probeblendingen. Anbring NC-replikaterne i A7, B7, C7; HCR-replikater i D7, E7, F7, QC1-LR i G7, QC2-HR i H7 og prøverne begyndende i A8. Se layout-eksemplet ovenfor.

Se den relevante brugsvejledning for korrekt kalibrator/kvalitetskontrol/prøve-opstilling i softwaren.
8. Som alternativ kan der anvendes to separate mikrotiterplader til kalibrators, kvalitetskontroller og prøver testet med lavrisiko - og højrisiko HPV-probe. NC og LRC testes tredobbelt og QC1-LR og QC2-HR testes enkeltvist med lavrisiko HPV-probeblending i én mikrotiterplade, NC og HRC testes tredobbelt, og QC1-LR og QC2-HR testes enkeltvist med højrisiko HPV-probeblending i en anden mikrotiterplade. Brug brønd A1, B1 og C1 til NC og brønd D1, E1 og F1 til henholdsvis LRC eller HRC. Brug brønd G1 og H1 til henholdsvis QC1-LR- og QC2-HR-kvalitetskontroller.
9. Prøver kan testes enkeltvist med kombineret-probecocktail, hvis CPC-metoden anvendes eller enkeltvist med lavrisiko HPV-probeblending og enkeltvist med højrisiko HPV-probeblending, hvis to-probsmetoden anvendes.

DENATURERING

Bemærkninger:

- **Advarsel:** Denatureringsreagens er ætsende. Udvis forsigtighed og anvend puddefri handske under håndtering.
- **Vigtigt:** Cervixprøver kan indeholde blod eller andet biologisk materiale, som kan maskere de farveændringer, der sker ved tilsætning af denatureringsreagens. Prøver, som har en mørk farve inden tilsætning af denatureringsreagens, vil måske ikke fremvise den korrekte farve på dette trin. I disse tilfælde vil manglende udvisning af korrekt farveændring ikke påvirke analysens resultater. Korrekt blanding kan bekræftes ved at observere kalibratorernes og kvalitetskontrollerens farveændringer.
- Under denaturerings- og hybridiseringstrinene skal det kontrolleres, at vandbadets vandniveau er højt nok til, at hele indholdet i prøverørerne vil være under vand.
- Kalibrators, kvalitetskontroller og prøver kan tilberedes under denatureringstrinet og opbevares ved 2-8°C natten over eller ved -20°C i op til 3 måneder. Der kan maksimalt udføres 3 fryse-tø-cykluser med maksimalt 2 timer ved stuetemperatur under hver tø-cyklus. Blandes godt før anvendelse.
- Efter denaturering og inkubering anses prøverne ikke længere for at være infektiøse.²⁶ Laboratoriepersonale skal imidlertid stadig overholde nationale/lokale forordninger.
- Prøveindsamlingsudstyret må ikke fjernes inden denaturering.
- For at undgå falsk-positive resultater er det absolut afgørende, at alt kalibrator-, kvalitetskontrol- og STM-prøvemateriale kommer i kontakt med denatureringsreagensen. Blanding efter tilsætning af denatureringsreagens er et kritisk trin: **Sørg for, Multi-Specimen Tube Vortexer 2 (hvirvelryster til flerprøverør) er indstillet på 100 (maksimal hastighed), og at en synlig væskehvirvel observeres under blanding, så væsken skyller hele rørets indvendige overflade.** Hvis der rystes manuelt, skal det sikres, at hver kalibrator, kvalitetskontrol og

prøve blandes individuelt ved at rysteblende i mindst 5 sekunder ved fuld hastighed, så væskehvirvlen skyller hele rørets indvendige overflade, hvorefter der skal vendes op og ned på røret én gang.

Kalibrаторer, kvalitetskontroller og STM-prøvefremstillingsprocedure

1. Tag hætterne af kalibrаторer, kvalitetskontroller og STM-prøverør, og bortskaf dem.

Bemærk: Hætter, der fjernes fra prøverørene, betragtes som potentielt smittefarlige. Bortskaf i henhold til lokale/nationale bestemmelser.

2. Pipettér denatureringsreagens med indikatorfarvestof i hver kalibrатор, kvalitetskontrol eller STM-prøve vha. en repetitions- eller justérbar pipette. Vær forsigtig med ikke at berøre siderne af røret, da krydskontaminering af prøver kan forekomme. Det nødvendige denatureringsreagensvolumen er lig halvdelen af prøvevolumenet. Det præcise volumen for hver kalibrатор-, kvalitetskontrol- og prøvetype er anført i nedenstående tabel.

Fortynd tilbagebleven denatureringsreagens i flaske før bortskaffelse i henhold til nationale/lokale laboratorieprocedurer.

Kalibrатор, kvalitetskontrol eller prøve	Nødvendigt denatureringsreagensvolumen
Negativ kalibrатор	1000 µl
Lavrisiko eller højrisiko HPV-kalibrатор	500 µl
Lavrisiko eller højrisiko kvalitets-kontroller	500 µl
Cervixprøve	500 µl

3. Bland prøverne ved at følge en af de to metoder, som er beskrevet nedenfor.

Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2-metode

Bemærk: *digene* HC2 DNA Collection Device-prøver, der blandes med MST Vortexer 2 (hvirvelryster) **skal** hybridiseres vha. hybridiseringsmikrotiterplade- og Microplate Heater I-metoden.

- a) Tildæk kalibrатор, kvalitetskontroller og STM-prøverørene med DuraSeal rørforseglingsfilm ved trække filmen hen over rørene i stativet.
- b) Anbring stativlåget på de filmtildækkede rør, og lås det fast vha. de to sideclips. Skær filmen af med skæreenheden.
- c) Anbring stativet på Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2, og fastgør det med klemmen. Sørg for, at hastigheden er indstillet på 100 (maksimal hastighed) og drej tænd/sluk-knappen til "ON"-position (tændt). Ryst rørene i 10 sekunder.

Manuel individuel rørrystningsmetode

- a) Sæt rene skruehætter til prøvetagningsrør på kalibrатор, kvalitetskontroller og STM-prøverør.
- b) Bland hvert enkelt rør grundigt ved at ryste det individuelt i mindst 5 sekunder ved høj hastighed.
- c) Vend op og ned på hvert prøverør én gang for at skylle rørets indvendige sider, hætte og kant.
- d) Sæt røret tilbage i stativet.

Uanset hvilken rystningsmetode der anvendes, **skal der observeres en væskehvirvel inden i hvert rør under blandingen, for at sikre, at væsken skyller hele rørets indvendige overflade ren.** Kalibrаторer, kvalitetskontroller og prøver skal blive violette.

4. Inkubér rørene i stativet i et vandbad, der er $65 \pm 2^\circ\text{C}$ varmt, i 45 ± 5 minutter (denaturerede kalibrаторer, kvalitetskontroller og prøver kan testes umiddelbart derefter eller opbevares som beskrevet under Bemærkninger ovenfor). Fremstil HPV-probeblending(er) under denne inkubation. Se afsnittet *Reagensfremstilling og -opbevaring*.

PreservCyt Solution-prøvefremstillingsprocedure

Bemærkninger:

- Der henvises til *digene* HC2-prøvekonversionskittets brugsvejledning for udførlige detaljer.
- Bearbejdning af en 4 ml alikvot af PreservCyt Solution producerer nok til 2 test ved manuel testning. Den minimale mængde, der kan bearbejdes, er 4 ml.
- Tilbered PreservCyt Solution-prøver i partier på 36 eller færre, da pillerne ellers kan løsgøres, når supernatanten dekanteres. Dette er vigtigt for at vedligeholde cellepillens integritet under dekanteringstrinet. Hvis der klargøres yderligere hætteglas med PreservCyt-opløsning, skal de først klargøres, når klargøringen af det første batch er færdig.

Reagensfremstilling

Benyt enten den Denaturation Reagent (denatureringsreagens (DNR)), som følger med *digene* HC2 HPV DNA Test (se *Reagensfremstilling og -opbevaring*) eller den DNR, der følger med *digene* HC2-prøvekonversionskittet. For at fremstille den denatureringsreagens, der følger med *digene* HC2-prøvekonversionskittet, skal der tilsættes 3 dråber indikatorfarvestof til DNR-flasken, hvorefter der blandes grundigt. Opløsningen skal være en ensfarvet, mørkilla farve. Bestem volumenkrav vha. tabel 1.

Tabel 1

Volumenkrav: Reagensfremstilling

Antal test	PreservCyt Solution-volumen	Konversionsbuffervolumen
1-2	4 ml	0,4 ml
3	6 ml	0,6 ml
4	8 ml	0,8 ml
5	10 ml	1,0 ml
6	12 ml	1,2 ml

1. Afmærk et *digene* HC2-prøvekonversionsrør, 10 ml konisk Sarstedt rør eller et 15 ml VWR eller Corning konisk rør, med det behørigt prøveidentificeringsnummer.
2. Håndtering af én prøve ad gangen:
 - a. Ryst hætteglasset med PreservCyt kraftigt med håndkraft, indtil cellerne synes at være spredt ensartet.
 - b. Du skal straks pipettere den korrekte volumen PreservCyt-prøve ned i det mærkede rør, da celler synker til bunds meget hurtigt. Afpipetter PreservCyt-solution i bunden af det koniske rør for at minimere den mængde celled materiale, som klæber fast på rørets inderside.
3. Tilsæt det behørigt volumen af prøvekonversionsbuffer til hvert rør (se tabel 1).
4. Sæt hættten på igen, og bland derefter indholdet i rørene grundigt vha. en rysteblander med påmonteret skål.

Bemærk: MST Vortexer 2-proceduren er ikke blevet valideret til hvirvling af PreservCyt-opløsningsprøver med prøvekonverteringsbuffer før centrifugering, og den må derfor ikke anvendes til dette trin.
5. Centrifuger rørene i en svingspandcentrifuge ved $2900 \pm 150 \times g$ i 15 ± 2 minutter.

6. Under centrifugeringen klargøres Specimen Transport Medium/denatureringsreagensblandingen (STM/DNR) i forholdet 2:1 i hen hold til Tabel 2.

Bemærk: STM/DNR-blandingen skal friskfremstilles hver dag testen udføres.

- a. For at bestemme den samlede volumen STM/DNR-blanding, der er påkrævet, anvendes startvolumen af PreservCyt-opløsningsprøven som en guide og dernæst ganges STM- og DNR-"pr. rør"-volumener med antallet af prøver, der skal behandles (se tabel 2).

Tabel 2
Volumenkrav: STM/DNR-

Antal test	PreservCyt Solution-volumen	STM-volumen pr. rør for endelig STM/DNR-blanding*	DNR-volumen pr. rør for endelig STM/DNR-blanding*	STM/DNR-blanding tilsat til rør
1-2	4 ml	120 µl	60 µl	150 µl
3	6 ml	170 µl	85 µl	225 µl
4	8 ml	220 µl	110 µl	300 µl
5	10 ml	270 µl	135 µl	375 µl
6	12 ml	320 µl	160 µl	450 µl

* Volumenerne, som er anført i disse kolonner, må ikke tilsættes direkte til prøverøret.

- b. Bland opløsningen grundigt ved at ryste den.
7. Tag rørene ud af centrifugen ét ad gangen, og anbring dem i et stativ eller et konversionsstativ. Der skal være en pink/orange pille i bunden af hvert rør.
- Bemærk:** Prøver, som ikke indeholder synlige piller efter centrifugering, er ikke acceptable til testning og skal bortskaffes.
8. Håndtering af hvert rør individuelt:
- Fjern hættten og læg den til side på et rent stykke fnugfri køkkenrulle.
 - Dekantér forsigtigt supernatanten.
 - Oprethold den omvendte stilling på røret, og dup den forsigtigt (ca. 6 gange) på et absorberende stykke fnugfri køkkenrulle, indtil væsken ikke længere drypper fra røret. Anvend et rent område af køkkenrullestykket hver gang. **Undgå**, at cellepillerne glider ned ad røret under aftrykningen på papirservietter.
- Bemærkninger:**
- Dup ikke på det samme område af det absorberende stykke fnugfri køkkenrulle mere end én gang.
 - Det er vigtigt at fjerne den maksimale mængde PreservCyt-opløsning ved dupning. Det er imidlertid normalt at se tilbagebleven PreservCyt-opløsning efter dupning.
- Placér røret i et stativ eller et konversionsstativ.

RYSTNING OG DENATURERING

Manuel rystprocedure

- Tilsæt det behørigte volumen STM/DNR til hver pille (se tabel 2). Sæt hættter på rørene, og opslæm pillerne ved at ryste hvert enkelt rør individuelt i mindst 30 sekunder ved den højeste hastighed. Hvis en pille er svær at opslæmme, rystes der i yderligere 10-30 sekunder, eller indtil pillen rives løs fra bunden af røret. Hvis en pille forbliver uopløst efter yderligere rystning (2 minutter maksimum), skal prøveidentifikationen noteres, hvorefter der fortsættes til næste trin.
- Anbring rørene i et stativ.

3. Inkubér stativet i et vandbad på $65 \pm 2^\circ\text{C}$ i 15 ± 2 minutter. Sørg for, at vandbadets vandniveau er højt nok til at dække al væsken i rørene.
4. Tag stativet med prøver op af vandbadet, og ryst prøverne individuelt i 15-30 sekunder.
Bemærk: Sørg for, at alle piller er fuldstændig opslæmmet på dette punkt. Prøver, som stadigvæk indeholder synlige piller, er ikke acceptable til testning og skal bortskaffes.
5. Sæt stativet tilbage i $65 \pm 2^\circ\text{C}$ vandbadet, og fortsæt denatureringen i yderligere 30 ± 3 minutter.
6. Gå videre til trin *Hybridisering* som beskrevet nedenfor eller se *Valgfrit stoppunkt* for, hvordan de denaturerede prøver opbevares og behandles.

Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2-procedure (hvirvelryster til flerprøverør)

Bemærkninger:

- Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2-proceduren er valideret til bearbejdning af PreservCyt Solution-prøver efter centrifugering og dekantering af supernatanten.
 - Kun MST Vortexer 2 er beregnet til bearbejdning af PreservCyt Solution-prøver.
 - Konversionsstativ og låg er særligt udformet til at rumme *digene* HC2-prøvekonversionsrør (VWR eller Corning 15 ml koniske rør). Der må kun anvendes én rørtype på konversionsstativet ad gangen. Andre mærker er ikke valideret til denne brug.
 - Streng overholdelse af de specificerede rystningstider for konversionsstativ og låg er påkrævet.
 - Konversionsstativ og låg kan ikke anvendes til rystning af *digene* HC2 DNA-testkit kalibratorer, kvalitetskontroller og kvalitetskontroller. STM-rørenes højde forhindrer tilstrækkelig rystning ved brug af konversionsstativ og låg.
1. Efter aftrykning af alle afmærkede 15 ml koniske rør skal hver især anbringes i dets korrekte position i konversionsstativet.
 2. Tilsæt det behørigte volumen STM/DNR-blanding til hver pille (se tabel 2).
 3. Tildæk de 15 ml koniske rør med DuraSeal-rørforsglingsfilm ved at trække filmen hen over rørene i stativet.
 4. Anbring racklåget over de filmdækkede rør, og lås låget på plads med to sideklemmer. Skær filmen af med skæreenheden, når låget sidder forsvarligt fast.
 5. Før det røde håndtag op, så det er i vandret position.
 6. Anbring konversionsstativ og låg på MST Vortexer 2, så det største indkærvede hjørne af konversionsstativet er placeret i det højre, forreste hjørne. Anbring stativ og låg på MST Vortexer 2-plattformen, indtil det sidder helt fast inden for styrekanterne. Fastgør raket på plads ved at flytte armen med det røde håndtag ned i lodret stilling. Dette vil låse raket på plads.
 7. Sørg for, at hastigheden er indstillet på 100 (maksimal hastighed), og at pulseringsvippekontakten er i "OFF"-position (slukket).
 8. Tænd for Vortexer-kontakten. **Ryst rørene i 30 sekunder.**
 9. Drej vortexerens (hvirvelrysterens) tænd-sluk-knap til "OFF" (slukket) position.
 10. Fjern konverteringsraket og låget fra MST Vortexer 2 ved at løfte op i armen med det røde håndtag.
 11. Inkubér stativet i et vandbad på $65 \pm 2^\circ\text{C}$ i 15 ± 2 minutter. Sørg for, at vandniveauet helt dækker al væske i alle rør.
 12. Efter 15 minutters inkubation fjernes raket med prøver fra vandbadet.
 13. Tør overskydende vand af stativet, inden det anbringes i MST Vortexer 2, for at undgå vandstænk.
 14. Fastgør konversionsstativ og låg på MST Vortexer 2, som beskrevet i *trin 6*.
 15. Sørg for, at hastigheden er indstillet på 100, og drej vortexerens tænd/sluk-knap til "ON"-position (tændt). **Ryst rørene i 1 minut.**

16. Sluk for vortexer-kontakten.

Bemærk: MST Vortexer 2-proceduren standardiserer blandingshastighed, tider og proces og eliminerer behovet for visuel kontrol for cellepiller, hvilket er påkrævet, hvis den manuelle systemetode anvendes.

17. Sæt stativet tilbage i $65 \pm 2^\circ\text{C}$ vandbadet, og fortsæt denatureringen i 30 ± 3 minutter.

18. Fjern racket fra vandbadet, tør racket, og fastgør det til vortexeren.

19. Drej vortexerens (hvirvelrysterens) tænd-sluk-knap til "ON"-position (tændt). **Ryst i 10 sekunder ved maksimal hastighed.**

20. Drej vortexerens (hvirvelrysterens) tænd-sluk-knap til "OFF"-position (slukket). Tag racket ud.

21. Fjern straks racklåget og DuraSeal-filmen fra prøverne.

22. Gå videre til trin *Hybridisering* som beskrevet nedenfor, eller se *Valgfrit stoppunkt* for, hvordan de denaturerede prøver opbevares og behandles.

SurePath Specimen Preparation Procedure (KUN højrisiko HPV DNA-test)

Efter cytologisk behandling fortsættes på følgende måde:

1. Sørg for, at den observerede væskemængde svarer til 2,8 ml.

FORSIGTIG: Hvis restcellepillen ser ud til at indeholde mindre end 1 ml væske, er det muligt, at SurePath Preservative Fluid ikke blev tilsat efter cytologi, og prøven er IKKE egnet til højrisiko HPV DNA-test.

2. Sørg for, at prøverne er udlignet til rumtemperatur.

3. Centrifuger prøven i en svingende spandrotor ved $800 \pm 15 \times g$ i 10 ± 1 minut.

4. Fjern rørene fra centrifugen.

5. Dekanter omhyggeligt supernatanten straks efter centrifugeringen, og tryk forsigtigt hvert rør (~3 gange) mod en absorberende papirserviet for at fjerne overskydende væske. Observer pillen i hvert rør. **Lad ikke cellepillerne glide ned ad røret under aftrykningen.**

6. Anbring rørene i stativet.

7. Tilsæt 200 μl STM til hver pille vha. en repetitions- eller justérbar pipette.

Bemærk: Rørene kan blandes uden hætter.

8. Opslæm hver pille ved at ryste hvert enkelt rør i 15 sekunder ved høj hastighed. Hvis det er vanskeligt at opslæmme pillen, skal den rystes i yderligere 5 til 30 sekunder, eller indtil pillen flyder fri af bunden af røret og ser ud til at opløses.

9. Pipettér 100 μl tilberedt denatureringsreagens (med indikatorfarvestof) til hver prøve vha. en repetitions- eller justérbar pipette.

FORSIGTIG: Vær forsigtig med ikke at berøre siderne af røret, da krydskontaminering af prøver kan forekomme.

Ved bortskaffelse af resterende denatureringsreagent skal den gældende lovgivning for bortskaffelse af korroderende stoffer overholdes.

10. Bland hvert rør grundigt ved rystning enkeltvis ved høj hastighed i 5 sekunder.

Bemærk: Rørene kan blandes uden hætter.

Mærk de 15 ml koniske rør med det behørigt prøveidentifikationsnummer og -type (eksempel "SP" for SurePath prøvetype), og anbring dem i et stativ.

Bemærk: Ved anvendelse af Rapid Capture System til halvautomatisk analysebehandling, VWR eller Corning skal der anvendes 15 ml koniske rør af hensyn til korrekt placering i *digene* Conversion Rack (sølvfarvet stativ).

11. Overfør hele rørets indhold til et 15 ml konisk rør med skruehætte vha. en 7-ml overførselspipette med standardspids til engangsbrug eller tilsvarende¹.
12. Sæt hætter på de 15 ml koniske rør.
13. Inkubér i et 65 ± 2°C vandbad i 90 ± 5 minutter.

FORSIGTIG: Denne inkubationstid er længere end påkrævet til andre godkendte prøvetyper.

14. Hvis HPV-test skal fuldføres på samme dag, skal *digene* HC2 DNA Test-kalibrаторer denatureres ifølge denne brugsvejledning.
15. Fjern prøvestativet fra vandbadet.

Valgfrit stoppunkt

Efter denaturering kan STM-prøver og konverterede PreservCyt- og SurePath-prøver opbevares ved 2-8°C natten over eller ved -20°C i op til 3 måneder. Ved afkøling natten over kan prøver efterlades i konversionsstativet, hvis der påføres ny DuraSeal film, og stativlåget udskiftes. Før opbevaring ved -20 °C skal racklåg og DuraSeal-film fjernes og hætterne anbringes på rørene. I begge tilfælde skal prøverne nå en ligevægtstemperatur på rumtemperatur (20-25°C) og rystes grundigt, før der fortsættes til hybridiseringsstrinet.

Bemærk: Denaturerede prøver må ikke opbevares eller afsendes på tøris.

Der kan maksimalt udføres 3 fryse-tø-cykluser med maksimalt 2 timer ved stuetemperatur under hver tø-cyklus.

HYBRIDISERING: KOMBINERET-PROBECOCTAIL (CPC) OG TO-PROBSMETODER

Bemærkninger:

- HPV-probeblandinger er tykflydende. Sørg for, at Probe Mix blandes grundigt, og at den påkrævede mængde dispenseres fuldstændigt i hver mikrotiterpladebrønd. Se afsnittet *Reagensfremstilling og -opbevaring*.
- Hvis den denaturerede prøve er blevet opbevaret ved -20°C, skal prøven optøs til 20-25°C og rystes grundigt, inden hybridiseringen påbegyndes.
- Opvarm Microplate Heater I til 65 ± 2°C i mindst 60 minutter før brug. Se *brugsvejledningen til Microplate Heater I* for yderligere vejledning efter behov.

Hybridiseringsmetode med hybridiseringsplade og Microplate Heater I

Bemærk: Prøver, der indsamles med *digene* HC2 DNA Collection Device i STM og bearbejdes med MST Vortexer 2-metoden, kan **kun** hybridiseres vha. Microplate Heater I-metoden.

1. Tag en hybridiseringsmikrotiterplade, og mærk den.
2. Fjern kalibrаторer, kvalitetskontroller og prøver fra vandbadet efter inkubation. Hvis MST Vortexer 2 anvendes, skal hele stativet med STM-prøver rystes i mindst 5 sekunder ved den maksimale hastighedsindstilling. For PreservCyt Solution- eller SurePath-prøver skal hele konversionsstativet rystes i mindst 10 sekunder ved den maksimale hastighedsindstilling. Alternativt kan hvert enkelt rør rystes individuelt i mindst 5 sekunder.
3. Pipettér 75 µl af hver kalibrатор, kvalitetskontrol eller prøve i **bunden** af tomme hybridiseringsmikrotiterpladebrønde ved at følge det pladelayout, som blev oprettet ved *opstillingen*. Undgå at berøre brøndenes sider, og begræns luftbobledannelse. Brug en ren,

¹ QIAGEN verifikations-test anvendte 15 ml koniske rør af mærket VWR

ekstralang pipettespids til hver overførsel for at undgå krydskontaminering af kalibrаторer, kvalitetskontroller og prøver. Fjern ikke prøveindsamlingsudstyret fra prøvetransportrøret. Denaturerede prøver kan lukkes med skruehætter til prøveindsamlingsrør og opbevares med prøveindsamlingsudstyret i rørene. De originale hætter kan sættes på de denaturerede PreservCyt-prøver.

Bemærk: Falsk-positive resultater kan forekomme, hvis prøvealiquoter ikke overføres omhyggeligt. Under prøveoverførslen må pipettespidsen ikke berøre indersiden af røret, når 75 µl aliquoten fjernes.

4. Når den sidste prøve er blevet overført, skal pladen tildækkes med et pladelåg, hvorefter **hybridiseringsmikrotiterpladen skal inkuberes i 10 minutter ved 20-25°C**.
5. Den tilberedte og grundigt omrystede probeblanding aliquoterer i en engangsreagensbeholder. Pipettér omhyggeligt 25 µl probeblanding i hver brønd, der indeholder kalibrаторer, kvalitetskontroller og prøver, med en 8-kanalspipette og nye spidser for hver række. Dispensér probevolumenet i hver hybridiseringsbrønd, idet tilbagesprøjtning undgås. Undgå at berøre brøndens sider. Anbring pladelåget på mikrotiterpladen, hvor det skal forblive under hele denatureringsinkubationen.
6. Dæk hybridiseringsmikrotiterpladen med et pladelåg og ryst Hybrid Capture System Rotary Shaker (rotationsryster) I ved en indstilling på 1100 ± 100 o/m i 3 ± 2 minutter. *Kalibrаторer, kvalitetskontroller og prøver skal blive gule efter omrystning*. Brønde, som forbliver violette, har måske ikke modtaget den korrekte mængde probeblanding. Tilsæt yderligere 25 µl probeblanding til prøver, som forbliver violette, og ryst igen. Hvis brøndene forbliver violette efter denne procedure, skal prøverne testes igen.

Bemærkninger:

- Efter rystning skal PreservCyt Solution-prøver blive lyserøde/pink i stedet for gule.
 - Sørg for ikke at sprøjte, når hybridiseringsmikrotiterpladen placeres i Microplate Heater I.
7. Inkubér i en opvarmet Microplate Heater I, der er nået op på en ligevægtstemperatur på $65 \pm 2^\circ\text{C}$, i 60 ± 5 minutter.

Hybridiseringsmetode med mikrorør og vandbad

Bemærkninger:

- Bearbejdningen af prøver, der er indsamlet med *digene* HC2 DNA Collection Device i STM, vha. MST Vortexer 2-metoden for blanding og vandbadsmetoden for hybridisering **er ikke blevet valideret**. Prøver, der indsamles med *digene* HC2 DNA Collection Device i STM og bearbejdes med MST Vortexer 2-metoden, kan **kun** hybridiseres vha. Microplate Heater I-metoden.
 - Hvis den denaturerede prøve er blevet opbevaret ved -20°C , skal prøven optøs til $20-25^\circ\text{C}$ og rystes grundigt, inden hybridiseringen påbegyndes.
1. Mærk og anbring det påkrævede antal rene hybridiseringsmikrorør i mikrorørsracket.
 2. Fjern kalibrаторer, kvalitetskontroller og prøver fra vandbadet efter inkubationen. Ryst hvert enkelt rør individuelt i mindst 5 sekunder umiddelbart inden aliquoter fjernes.
 3. Pipettér 75 µl af hver kalibrатор, kvalitetskontrol eller prøve i **bunden** af tomme hybridiseringsmikrorør ved at følge det pladelayout, som blev oprettet ved opstillingen. Undgå at berøre mikrorørens sider, og begræns luftbobledannelse. Brug en ren, ekstralang pipettespids til hver overførsel for at undgå krydskontaminering af kalibrаторer, kvalitetskontroller og prøver. Det er ikke nødvendigt at fjerne prøveindsamlingsudstyret fra prøvetransportrøret. Denaturerede prøver kan lukkes med skruehætter til prøveindsamlingsrør og opbevares med prøveindsamlingsudstyret i rørene.

Bemærk: Falsk-positive resultater kan forekomme, hvis prøvealiquoter ikke overføres omhyggeligt. Under prøveoverførslen må pipettespidsen ikke berøre indersiden af røret, når 75 µl aliquoten fjernes.

4. Når den sidste prøve er blevet overført, **skal hybridiseringsmikrorørene inkuberes i 10 minutter ved 20-25°C.**
5. Den tilberedte og grundigt omrystede probeblanding aliquoteres i en engangsreagensbeholder. Pipetter omhyggeligt 25 µl probeblanding i hvert mikrorør, der indeholder kalibratorer, kvalitetskontroller og prøver, med en 8-kanalspipette og nye spidser for hver række. Dispensér probevolumenet i hvert hybridiseringsmikrorør, idet tilbagesprøjtning undgås. Undgå at berøre rørenes sider. Inspicér stativet nedefra for at sørge for, at alle rør har modtaget den korrekte mængde probeblanding.
6. Dæk mikrorørene med pladeforseglingsfolie. Anbring stativlåget oven på stativet. Ryst mikrorørstativet på Rotary Shaker I (rysteblander) ved en indstilling på 1100 ± 100 o/m i 3 ± 2 minutter. *Kalibratorer, kvalitetskontroller og prøver skal blive gule efter omrystning.* Rør, som forbliver violette, har måske ikke modtaget den korrekte mængde probeblanding. Tilsæt yderligere 25 µl probeblanding til prøver, som forbliver violette, og ryst igen. Hvis rørene forbliver violette efter denne procedure, skal prøverne gentestes.

Bemærk: Efter omrystning skal PreservCyt Solution-prøver blive lyserøde/pink i stedet for gule.

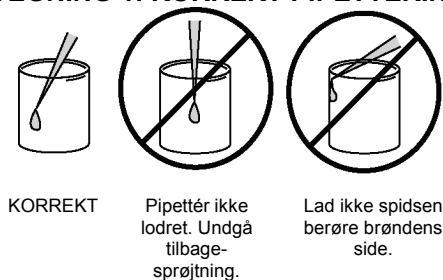
7. Inkubér i et $65 \pm 2^\circ\text{C}$ vandbad i 60 ± 5 minutter. Sørg for, at vandbadets vandniveau er højt nok til, at hele hybridiseringsblandingen vil være under vand. Mikrorørsstativet vil flyde i vandbadet.

Bemærk: Opret et pladelayout vha. *digene*-analyseprogrammet, hvis dette ikke er blevet gjort tidligere.

HYBRID CAPTURE

1. Fjern alle andre end det nødvendige antal capture-mikrotiterpladebrønde fra pladestativet. Returnér de ubrugte mikrotiterpladebrønde til den originale pose, og genforsegl den. Mærk hver kolonne med 1, 2, 3. . . med en filtpen. . . Mærk mikrotiterpladen med en behørig identifikation. Prøverne vil blive tilsat til brøndene i henhold til det layout-eksempel, som blev udarbejdet under opstillingen.
2. Fjern forsigtigt hybridiseringsmikrotiterpladen, der indeholder kalibratorer, kontroller og prøver fra Microplate Heater I. Fjern omgående pladelåget, og anbring det på en ren overflade. Alternativt kan mikrorørstativet tages op af vandbadet. Fjern omgående stativlåget, og træk langsomt pladeforseglingsfolien op og hen over stativet.
3. Overfør hele indholdet (ca. 100 µl) af kalibratorer, kvalitetskontroller og prøver fra hybridiseringsmikrotiterpladebrønde eller mikrorør til bunden af den tilsvarende capture-mikrotiterpladebrønd med en 8-kanalspipette. Brug nye pipettespidser på 8-kanalspipetten for hver overført kolonne og udtøm hver pipettespids godt for at sikre en komplet prøveoverførsel. Hvis det ønskes, kan pipetten støttes ved at hvile **midt** af pipettespidsen på den øverste kant af capture-mikrotiterpladebrøndene (se *tegning 1*).

TEGNING 1: KORREKT PIPETTERING



4. Dæk capture-mikrotiterpladen med et pladelåg eller pladeforseglingsfolie, og omryst på Rotary Shaker (rotationsryster) I ved en indstilling på 1100 ± 100 o/m ved $20-25^\circ\text{C}$ i 60 ± 5 minutter.

5. Tilbered vaskebuffer og kontrollér skylle- og affaldstank på Automated Plate Washer (automatiseret pladevaskeapparat) i løbet af denne inkubering. Se afsnittet Reagensfremstilling og -opbevaring.
6. Når capture-trinet er udført, fjernes capture-mikrotiterpladen fra Rotary Shaker I, hvorefter pladelåget eller pladeforseglingsfolien forsigtigt fjernes. Fjern væsken fra brøndene ved at hælde den ned i en vask, vend pladen helt over vasken, og omryst den kraftigt med en nedadgående bevægelse, idet man er forsigtig med ikke at forårsage tilbagesprøjtning ved at dekantere for tæt ved vaskens bund. **Pladen må ikke vendes om igen**; brug nogle Kimtowels-klude, eller lignende frugtfrie papirservietter, som trækpapir ved at banke pladen bestemt 2-3 gange på disse. Sørg for, at al væske er blevet fjernet fra brøndene, og at toppen af pladen er tør.

HYBRID-DETEKTION

Bemærkninger:

- Foretag tilsætninger på tværs af pladen fra venstre-til-højre med en 8-kanalspipette.
 - Det anbefales, at den omvendte pipetteringsteknik anvendes for at sikre, at reagensleveringen er så ensartet som mulig. Med denne teknik bliver pipettespidserne først overfyldt vha. det andet stop på pipettens opsugnings-/dispenseringskontrol (stempel). Se procedure nedenfor. Tør spidserne på engangsreagensbeholder for at fjerne overskydende reagens før levering på plade.
 - Hvis det ønskes, kan pipetten støttes ved at hvile midten af pipettespidserne på den øverste kant af mikrotiterpladebrøndene. Vær forsigtig med ikke at berøre mikrotiterpladebrøndenes sider, da dette kan medføre, at prøver krydskontamineres. Der henvises til tegning 1, som blev vist tidligere.
1. Det behørigt volumen af Detection Reagent 1 alikvoteret i en engangsreagensbeholder (se afsnittet *Reagensfremstilling og -opbevaring* angående vejledning). Pipetter omhyggeligt 75 µl Detection Reagent 1 i hver brønd på capture-mikrotiterpladen med en 8-kanalspipette og omvendt pipetteringsteknik.

Omvendt pipetteringsprocedure:

- a) Sæt spidser på 8-kanalspipette og kontrollér, at alle spidser sidder godt fast.
 - b) Tryk pipetestemplet forbi det første stop til det andet stop.
 - c) Før spidserne ned i Detection Reagent 1-opløsningen.
 - d) Udløs stemplet langsomt, så opløsningen fylder spidserne.
 - e) Dispensér opløsningen i mikrotiterpladebrøndene (75 µl) ved at trykke stemplet ned til det første stop. Stemplet må ikke udløses, før pipettespidserne er blevet ført ned i Detection Reagent 1-opløsningen igen.
 - f) Genfyld spidserne og gentag indtil alle brønde er fyldt. Påfyld mikrotiterpladens brønde fra venstre til højre. Kontrollér, at alle brønde er blevet fyldt, ved at observere den lyserøde farves intensitet. Alle brønde skal have samme intensitet.
2. Dæk pladerne med pladelåg eller plastfilm (eller lignende), og inkubér ved 20-25°C i 30-45 minutter.

VASK

Vask capture-pladen ved at følge en af de to metoder, som er beskrevet nedenfor.

Automated Plate Washer-metode

Bemærk: Automated Plate Washer skal altid være tændt (**ON**). Kontrollér, at skylletanken er fyldt, og affaldstanken er tom. Automated Plate Washer skyller rutinemæssigt systemet for at rengøre det. Se brugsvejledningen til Automated Plate Washer for yderligere vejledning.

FØR HVER BRUG:

- Kontrollér, at vasketanken er fyldt til mindst 1 l-mærket med vaskebufferopløsning. Hvis ikke, skal der fremstilles vaskebufferopløsning. Se afsnittet Reagensfremstilling og -opbevaring.
- Kontrollér, at skylletanken er fyldt med demineraliseret eller destilleret vand.
- Kontrollér, at affaldstanken er fyldt og dækslet sidder helt fast.
- Automated Plate Washer vil automatisk spæde sig selv før hver vask og skylle efter hver vask.

1. Fjern pladelåg, og anbring pladen på Automated Plate Washer-platformen.
2. Kontrollér, at apparatet er tændt, og at displayet viser "Digene Wash Ready" (Digene vask parat) eller "P1".

Bemærk: Hvis kun en del af en række capture-brønde bruges, vil det være nødvendigt at anbringe tomme mikrotiterpladebrønde i capture-pladen for at udfylde kolonnen inden vask.

3. Vælg det antal rækker, der skal vaskes ved at trykke på "Rows"-tasten (række) og derefter på "+" eller "-" for at justere dette antal. Tryk på "Rows"-tasten for at gå tilbage til "Digene Wash Ready" eller "P1".
4. Tryk på "Start/Stop" (Start/stop) for at begynde.
5. Pladevaskeapparatet vil udføre seks påfyldnings- og udsugningscykler, som tager ca. 10 minutter. Der vil være en kort pause i løbet af programmet, så vær forsigtig med ikke at fjerne pladen for tidligt. Når Automated Plate Washer er færdig med at vaske, står der "Digene Wash Ready" eller "P1".
6. Tag mikrotiterpladen ud af pladevaskeapparatet, når programmet er afsluttet. Pladen skal have et hvidt udseende og der skulle ikke være nogen lyserød væske tilbage i mikrotiterpladebrøndene.

Manuel vask-metode

1. Fjern Detection Reagent 1 fra brøndene ved at anbringe rene Kimtowels klude eller lignende fnugfrie papirservietter oven på pladen, og vende den forsigtigt om. Før den vendes, skal det sikres, at papiret er i kontakt med hele pladens overflade. Lad pladen dræne af i 1-2 minutter. Brug rene Kimtowels klude eller lignende fnugfrie papirservietter som trækpapir. Vær omhyggelig med at bortskaffe brugte papirservietter for at undgå kontaminering med alkalisk fosfatase i de efterfølgende trin.
2. Vask pladen manuelt 6 gange vha. vaskeapparatet. Hver brønd vaskes ved at oversvømme den for at fjerne Detection Reagent 1 fra toppen af brønden. Vasken påbegyndes ved brønd A1 og fortsættes i et slangemønster til højre og nedad. Når alle brønde er blevet fyldt, skal væsken dekanteres ned i en vask med en kraftig nedadgående bevægelse. Den anden vask påbegyndes ved brønd H12 og fortsættes i et slangemønster til venstre og opad. Denne sekvens på 2 afvaskninger gentages 2 gange mere til i alt 6 afvaskninger pr. brønd.
3. Efter afvaskning trykkes pladen af ved at vende den om på rene Kimtowels-klude eller lignende fnugfrie papirservietter og banke bestemt på den 3-4 gange. Udskift papirservietterne, og tryk pladen af igen. Lad pladen dræne af i 5 minutter med bunden opad. Tryk pladen endnu en gang.
4. Pladen skal have et hvidt udseende, og der skulle ikke være nogen lyserød væske tilbage i mikrotiterpladebrøndene.

SIGNALAMPLIFIKATION

BEMÆRKNINGER:

- Brug et par nye handsker til håndtering af Detection Reagent 2.
- For at undgå kontaminering af Detection Reagent 2 skal **kun** den mængde reagens, som er nødvendig for at udføre analysen, alikvoterer i engangsreagensbeholderen. Se afsnittet Reagensfremstilling. **Detection Reagent 2 må ikke hældes tilbage på den originale flaske. Ubrugt materiale skal bortskaffes efter brug.**
- Tilsætning af Detection Reagent 2 skal udføres uden afbrydelse. Inkubationstiden for alle brønde skal være så tæt på hinanden som mulig.
- Vær forsigtig med ikke at berøre mikrotiterpladebrøndens sider eller stænke reagens tilbage på spidserne, da dette kan medføre, at prøver krydskontamineres (se *tegning 1*).

1. Pipetter omhyggeligt 75 µl Detection Reagent 2 i hver brønd på capture-mikrotiterpladen med en 8-kanalspipette, som beskrevet tidligere. *Alle mikrotiterpladebrønde skal blive gule.* Kontrollér, at alle brønde er blevet fyldt, ved at observere farvens intensitet. Alle brønde skal have samme intensitet.
2. Dæk mikrotiterpladerne med et pladelåg eller plastfilm (eller lignende), og inkubér ved 20-25°C i 15 minutter. Undgå direkte sollys.
3. Aflæs mikrotiterpladen på DML-instrumentet umiddelbart efter 15 minutters inkubering (og ikke senere end 30 minutters inkubering).
4. Den analysespecifikke softwareprotokol gør det muligt at indlæse relevant analyseinformation direkte i softwaren.
5. Hvis der ikke blev anvendt en fuld mikrotiterplade, skal de brugte mikrotiterpladebrønde fjernes fra mikrotiterpladeholderen, hvorefter holderen skal skylles grundigt med destilleret eller demineraliseret vand, tørres og gemmes til den næste analyse.

VERIFIKATIONSKRITERIER FOR ANALYSEKALIBRERING

Verificering af analysekalibrering udføres for at sikre, at reagenser og de leverede kalibrator- og kvalitetskontrolmaterialer fungerer korrekt og tillader nøjagtig bestemmelse af analysens cut-off-værdi. *digene* HC2 HPV DNA Test kræver kalibrering ved hver analyse, hvilket betyder, at det er nødvendigt at verificere hver analyse med de følgende kriterier. Denne kontrolprocedure kan ikke erstatte intern kvalitetskontrol. *digene*-analysesoftwarens analyseprotokoller kontrollerer automatisk nedenstående kriterier.

- 1. Negativ kalibrator**
Den negative kalibrator skal testes tredobbelt i hver testanalyse. Den negative kalibrator middelværdi skal være ≥ 10 og ≤ 250 RLU for at gå videre. De negative kalibratorresultater skal fremvise en variationskoefficient (%CV) på ≤ 25 %. Hvis %CV er > 25 skal kontrolværdien med den RLU-værdi, der ligger længst fra middelværdien kasseres som en outlier (vildskud), hvorefter middelværdien genberegnes med de to resterende kontrolværdier. Hvis forskellen mellem middelværdien og hver af de to værdier er ≤ 25 %, skal der fortsættes til trin 2. Hvis dette ikke er tilfældet, vil verifikationen af analysekalibrering være ugyldig, og analysen skal gentages for alle patientprøver. I så tilfælde skal patientprøveresultater ikke rapporteres.
- 2. kalibratore**
Kalibratoren(erne) skal testes tredobbelt i hver analyse. For CPC skal begge kalibratore testet tredobbelt. Kalibratorresultaterne skal fremvise en variationskoefficient (%CV) på ≤ 15 %. For CPC skal %CV af LRC, HRC og LRC-HRC kombineret fremvise en %CV på ≤ 15 %. Hvis %CV er > 15 skal kalibratorværdien med den RLU-værdi, der ligger længst fra middelværdien kasseres som en outlier (vildskud), hvorefter middelværdien genberegnes med de resterende kalibratorværdier. Kun 1 LRC og 1 HRC replikat må slettes. Hvis kalibratorenes %CV er ≤ 15 %, skal der fortsættes til trin 3. Hvis dette ikke er tilfældet, vil verifikationen af analysekalibrering være ugyldig, og analysen skal gentages for alle patientprøver. I så tilfælde skal patientprøveresultater ikke rapporteres.

Den ovenfor beskrevne verifikation af analysekalibrering for kalibratorene udføres automatisk af *digene*-analysesoftwaren og printes i dataanalyserapporten. ***digene*-analysesoftwaren til HPV verificerer automatisk, at lavrisiko og højrisiko HPV-kalibratorenes %CV er ≤ 15 %.** Version v1.0.2 og v1.0.3 af *digene* vil imidlertid IKKE ugyldiggøre analysen, medmindre kalibratorenes %CV er > 25 . Brugeren skal derfor manuelt verificere, at den %CV, der beregnes af *digene*-analysesoftwaren, er ≤ 15 % og fortsætte som anført for situation 1 i nedenstående tabel. Hvis kalibratorreplikaternes %CV er mellem 15 og 25, henvises der til vejledningen i situation 2 eller 3 i nedenstående tabel, hvorefter der fortsættes med den angivne "Brugeraktion".

Situation	Rapport %CV for LRC- og/eller HRC-replikater	Aktion taget af <i>digene</i> -analysesoftwaren	Brugeraktion
1	$\leq 15\%$	Analyse rapporteret som "Gyldig"	Resultater kan rapporteres; ingen yderligere aktion påkrævet.
2	Mellem 15 % og 25 %	Ingen outliers (vildskud) fjernet og analyse rapporteret som "Gyldig"	Fjern den kalibrator-RLU-værdi, der ligger længst fra middelværdien. Genberegnet kalibratorens %CV med de to resterende værdier. Hvis %CV for de resterende RLU-værdier er > 15 %, vil analysen være ugyldig. Resultaterne må ikke rapporteres. Hvis %CV for de resterende RLU-værdier er ≤ 15 %, skal analysens cut-off-værdi genberegnes, hvorefter RLU/cut-off-forholdet for hver prøve genberegnes vha. denne cut-off-værdi. Disse genberegne værdier kan rapporteres.
3	Mellem 15 % og 25 %	Én outlier (vildskud) pr. kalibrator fjernet og analyse rapporteret som "Gyldig"	Analysen er ugyldig. Resultaterne må ikke rapporteres. Analysen skal gentages.
4	$> 25\%$	Én outlier (vildskud) fjernet og analyse rapporteret som "Ugyldig"	Analysen er ugyldig. Resultaterne må ikke rapporteres. Analysen skal gentages.

For manuelt at beregne %CV, som påkrævet i situation 2 ovenfor, skal brugeren dividere de resterende replikat-RLU-værdiers standardafvigelse (STDEV)(n-1) med middelværdien af de resterende replikat-RLU-værdier (LRC eller HRC eller begge) og gange resultatet med 100.

For at beregne %CV vha. Microsoft® Excel® (leveret med den tidligere version af *digene*-analysesoftwaren) kan brugeren beregne kalibratorreplikaternes standardafvigelse med formlen *STDEV* og bestemme kalibratorens gennemsnits-RLU-værdi vha. formlen *AVERAGE*. Når disse to værdier foreligger, skal *STDEV* divideres med *AVERAGE*, hvorefter resultatet ganges med 100 for at få %CV.

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

Kontakt den lokale QIAGEN repræsentant med spørgsmål vedrørende beregning af %CV'er, genberegning af analyse-cut-off eller genberegning af prøvernes RLU/cut-off.

For at bestemme kalibrator-reproducérbarhed og bedømme den frekvens, hvormed manuelle genberegninger kan være nødvendige, blev resultaterne fra tre kliniske evalueringer, som omfattede 152 analyseserier med *digene* HC2 HPV DNA Test, kompileret. Resultaterne viste, at den gennemsnitlige %CV for disse 152 serier var 8,1. Ved at tage alle tre kalibratorreplikater pr. testserie i betragtning blev der observeret en kalibrator-reproducérbarhed på >15 %CV for blot 17 ud af 152 serier (11,2 %), hvoraf 10 af disse 17 testserier medførte en %CV på mellem 15-25 (situation 2). For de 17 testserier, som gav en %CV >15, blev en enkelt outlier (vildskud) fjernet, hvorefter %CV blev genberegnet. Efter Brugeraktion for Situation 2 forblev kun én af testseriens %CV >15, hvilket dermed ugyldiggjorde testserien. %CV'er for de resterende 151 testserier blev beregnet for en gennemsnitlig %CV på 6,0.

- Resultaterne af kalibratorgennemsnitsværdi (LRC eller HRC) og den negative kalibratorgennemsnitsværdi (NC) bruges til at beregne LRC/NC- eller HRC/NC-forholdet for hver probe. Tidligere versioner (v1.0.2 og v1.0.3) af *digene*-analysesoftwaren beregner ikke de acceptable områder korrekt. Disse forhold skal opfylde de følgende kriterier for at verificere analysekalibreringen, før prøveresultaterne kan fortolkes:

CPC-METODE	TO-PROBSMETODE
Kontrol af analysekalibrering Acceptable områder	Kontrol af analysekalibrering Acceptable områder
$2,0 \leq LRC\bar{x}/NC\bar{x} \leq 15$	$2,0 \leq LRC\bar{x}/NCLR\bar{x} \leq 15$ (LR-side)
$2,0 \leq HRC\bar{x}/NC\bar{x} \leq 15$	$2,0 \leq HRC\bar{x}/NCHR\bar{x} \leq 15$ (HR-side)
$2,0 \leq (LRC \text{ og } HRC) \bar{x}/NC\bar{x} \leq 15$	

- Beregn de behørig LRC \bar{x} /NC \bar{x} - eller HRC \bar{x} /NC \bar{x} -forhold for hvert probesæt. Hvis forholdene er $\geq 2,0$ og ≤ 15 , skal der fortsættes til næste trin. Hvis nogen af forholdene er $< 2,0$ eller > 15 , er analysen ugyldig for den specifikke probe og skal gentages. Gentag alle patientprøver i serien.

Bemærk: Acceptable områder for den negative kalibrator og de positive kalibratører er kun blevet fastslået for et DML-instrument.

CUT-OFF-BEREGNING

Når en analyse er blevet valideret i overensstemmelse med ovenstående kriterier, er cut-off-værdierne for bestemmelse af positive prøver som følger:

- 1) Kombineret-probecocktailmetode:
$$\frac{(\text{LRC-replikater} + \text{HRC-replikater})}{\text{antal replikater}}$$
- 2) To-probsmetode:
$$\begin{aligned} \text{Lavrisiko-HPV-probe-cut-off} &= \text{LRC}\bar{x} \\ \text{Højrisiko-HPV-probe-cut-off} &= \text{HRC}\bar{x} \end{aligned}$$

Cut-off-beregningseksempler					
for:		Lavrisiko- eller højrisiko-HPV-probe To-probsmetode	Lavrisiko-HPV-probe CPC-metode	Højrisiko-HPV-probe CPC-metode	Kombineret HPV-probe CPC-metode
	NC RLU-værdier	LRC- eller HRC-RLU-værdier	LRC-RLU-værdier	HRC-RLU-værdier	LRC- og HRC-RLU-værdier
	97	312	330	235*	330
	101	335	305	295	305
	91	307	385	279	385
					295
					235*
					279
RLU-middelværdier	96	318	340	287*	318,8*
%CV	4,9	4,7	12,0	3,9*	13,0
$\text{LRC}\bar{x}/\text{NC}\bar{x}$	I/R	3,31	3,54	3,00	3,32

RLU-middelværdien for den positive kalibrator bestemmer analysens cut-off-værdi. Den positive cut-off-værdi er derfor $(\text{LRC}\bar{x}) = 318$.

* Middel %CV for alle 6 replikater var 16,8. Replikat med en værdi på 235 blev slettet som en outlier (vildskud). %CV for de resterende replikater var 13,0 med en middelværdi på 318,8. Den indledende %CV for HRC var 11,5.

Alle prøve-RLU-værdier skal omregnes til en kvotient af den behørig cut-off-værdi. For eksempel skal alle analyser, som testes med lavrisiko-HPV-probe udtrykkes som prøve-RLU/lavrisiko-cut-off-værdi. Det samme kan gøres med prøver, som testes med højrisiko-HPV-probe eller CPC-probe.

Bemærkninger: RLU/CO-værdier og positive/negative resultater for alle prøver er rapporteret i DML-instrumentets *dataanalyserapport*.

For Rapid Capture System instrumentapplikationen er RCS HPV softwareprotokollen blevet programmeret til at anvende en kalibreringsjusteringsfaktor (Calibration Adjustment Factor (CAF)) på 0,8 til de gyldige positiv kalibratorreplikaters RLU-middelværdi. Denne CAF er nødvendig for, at analysens præstationsegenskaber kan forblive de samme som for den manuelle testprocedure. Denne ændring gælder kun for analyser, der udføres vha. Rapid Capture-systemapplikationen. Derfor er det vigtigt at vælge den korrekte softwareprotokol til hver specifikke testmetode for at kunne generere nøjagtige testresultater. Alle prøve-RLU-værdier skal omregnes til en kvotient af den behørig cut-off-værdi (CO). For eksempel skal alle analyser udtrykkes som prøve-RLU/CO-værdi.

KVALITETSKONTROL

Kvalitetskontrolprøver leveres med *digene* HC2 HPV DNA Test. Se den relevante brugsvejledning angående vejledning i, hvordan kvalitetskontrollernes lotnumre og udløbsdatoer indtastes. Disse kvalitetskontroller skal inkluderes i hver testserie, og hver kvalitetskontrolls RLU/CO-værdi skal være inden for de følgende acceptable områder, for at serien kan anses for at være gyldig. **Hvis kvalitetskontrollerne ikke falder inden for disse områder, er analysen ugyldig og skal gentages.** Der må ikke rapporteres patientresultater for ugyldige serier.

Kvalitetskontrol	HPV-type	Forventet resultat (RLU/cut-off-værdi) Lavisiko-HPV-probe			
		Minimum	Maksimum	Gennemsnit	%CV
QC1-LR	Lavisiko (HPV 6)	2	8	5,0	25
QC2-HR	Højrisiko (HPV 16)	0,001	0,999	0,5	25

Kvalitetskontrol	HPV-type	Forventet resultat (RLU/cut-off-værdi) Højrisiko-HPV-probe			
		Minimum	Maksimum	Gennemsnit	%CV
QC1-LR	Lavisiko (HPV 6)	0,001	0,999	0,5	25
QC2-HR	Højrisiko (HPV 16)	2	8	5,0	25

Kvalitetskontrol	HPV-type	Forventet resultat (RLU/cut-off-værdi) CPC-HPV-probe			
		Minimum	Maksimum	Gennemsnit	%CV
QC1-LR	Lavisiko (HPV 6)	2	8	5,0	25
QC2-HR	Højrisiko (HPV 16)	2	8	5,0	25

1. Kvalitetskontrolmaterialerne, som leveres med kittet, er klonede HPV-DNA-targets og stammer ikke fra vildtype-HPV. Det er den samme type materiale, som bruges til kalibratorer leveret med *digene* HC2 HPV DNA Test.
2. Dette kvalitetskontrolmateriale vil ikke fungere som en behørig kontrol for bearbejdning af PreservCyt Solution eller SurePath Preservative Fluid.
3. Kvalitetskontrollerne, som leveres med dette testkit, skal bruges til intern kvalitetskontrol. Yderligere kvalitetskontroller kan testes i overensstemmelse med lokale og/eller nationale forordninger eller akkrediterende organisationer.

FORTOLKNING AF PRØVERESULTATER

Bemærk: *digene* HC2 HPV DNA Tests cut-off på 1 pg/ml svarer til 100.000 HPV-kopier/ml eller 5.000 HPV-kopier pr. analyse.

1. STM-prøver med RLU/cut-off-værdiforhold $\geq 1,0$ **med kun lavrisiko-HPV-probe** anses som "Positive" for 1 eller flere af HPV-type 6, 11, 42, 43 eller 44.
2. STM-prøver med RLU/cut-off-værdiforhold $\geq 1,0$ **med kun højrisiko HPV-probe** anses som "Positive" for 1 eller flere af HPV-type 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 og 68.
3. Hvis en prøves RLU/CO-forhold er $\geq 1,0$ og $< 2,5$ ved testning af PreservCyt-prøver, anbefaler QIAGEN, at prøven gentestes. Hvis det initiale gentestningsresultat er positivt ($\geq 1,0$ RLU/CO), kan prøven rapporteres som positiv, og ingen yderligere gentestning er påkrævet. Hvis det første gentestningsresultat er negativt ($< 1,0$), skal der udføres endnu en gentestning (tredje resultat) for at generere et endeligt resultat. Resultatet af den anden gentestning anses så som det endelige resultat og skal rapporteres.
4. Hvis en prøves RLU/cut-off-forhold er tæt på, men mindre end 1,0 og højrisiko-HPV-infektion mistænkes, skal alternative testmetoder og/eller en ny prøve overvejes.
5. STM-prøver med RLU/cut-off-værdiforhold $\geq 1,0$ for både lavrisiko- og højrisiko-HPV-probe anses som "Positive" for 1 eller flere HPV typer fra hver probegruppe.
6. STM-prøver med RLU/cut-off-værdiforhold $\geq 1,0$ med kombineret-probecocktail anses som "Positive" for 1 eller flere af HPV-type 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 og 68.
7. Prøver med RLU/cut-off-værdiforhold $\geq 1,0$ for kombineret-probecocktail eller både lavrisiko og højrisiko HPV-probe anses som "Negative" eller "No HPV DNA detected" (intet HPV-DNA påvist) for de 18 testede HPV-typer. HPV DNA-sekvenser er enten manglende, eller HPV DNA-niveauerne er under analysens detektionsgrænse.

YDEEVNEKARAKTERISTIKKER

DATA DER UNDERSTØTTER LAVRISIKO- OG HØJRISIKO-HPV-INDIKATION

Klinisk screening af patienter med ASC-US Pap-smear-resultater for at bestemme behovet for henvisning til kolposkopi

En undersøgelse kaldet "Utility of HPV DNA Testing for Triage of Women with Borderline Pap Smears" (brug af HPV DNA-testning til opdeling af kvinder med borderline Pap-smears) blev udført i USA i 1996 under ledelse af Kaiser Foundation Research Institute og Kaiser Permanente Medical Group. Cervixprøver til rutinemæssige Pap-smears og *digene* HC2 HPV DNA Testning blev indsamlet fra kvinder, der modtog behandling på adskillige Kaiser-klinikfaciliteter. De indledende Pap-smears blev evalueret i henhold til Bethesda-klassificeringen. For tilsvarende cervixcancer screeningsterminologi i det Europæiske Fællesskab henvises der til European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening⁴⁰. Kvinder (15 år og ældre) med ASC-US (atypical cells of undetermined significance) Pap-smear-resultater, returnerede for kolposkopi og biopsi. Kolposkopisk rettede histologiske prøver blev undersøgt af patologer, og en observationsdiagnose blev foretaget. Alle histologiske prøver blev endvidere evalueret af en uafhængig patolog, og eventuelle uoverensstemmelser mellem den indledende og uafhængige evaluering blev afgjort af en tredje patolog.

HPV DNA Testning blev udført på den indledende prøve, og kun højrisiko-HPV-probe blev anvendt. HPV-DNA-testning blev udført med en prototype af *digene* HC2 HPV DNA Test, som indeholdt prøber til 11 af de 13 HPV-typer, der er inkluderet i højrisiko-HPV-proben, men som ikke indeholdt prøber for HPV-type 59 og 68. Denne forskel ville ikke forventes at medføre signifikant forskellige ydeevneprofiler for de to analyser.

HPV-testresultater og histologiske diagnoser var tilgængelige for 885 kvinder med ASC-US Pap smears. For flertallet af patienternes vedkommende blev testningen udført med prøver, der var indsamlet i både STM og PreservCyt Solution. Pga. ligheden mellem *digene* HC2 HPV DNA Tests ydeevnekaraktistikker for STM og PC-media vil kun ydeevnen for PreservCyt Solution blive vist.

Tabel 3 viser, at blandt patienter med en ASC-US-henvist Pap-smear, er *digene* HC2 HPV DNA Tests negative prædiktive værdi for at have HSIL eller sværere sygdom ved kolposkopi 99 %.

Tabel 3
Sammenligning af *digene* HC2 HPV DNA Test versus konsensus-histologi
ASC-US-henvist Pap-population
Kaiser-undersøgelse, PreservCyt Solution-prøver

	HSIL eller sværere sygdom på kolposkopitidspunkt			Samlet
		+	-	
Høj-risiko-HPV	+	66	317	383
	-	5	497	502
	Samlet	71	814	885

Sensitivitet [TP/(TP+FN)] = 93,0 % (66/71)

95 % CI = 84,3 til 97,7

Specificitet [TN/(TN+FP)] = 61,1 % (497/814)

95 % CI = 57,7 til 64,4

Sygdomsprævalens = 8,0 % (71/885)

Analysens positive prædiktive værdi = 17,2 % (66/383)

Analysens negative prædiktive værdi = 99,0 % (497/502)

Tabel 4 viser de teoretiske positive og negative prædiktive værdier baseret på forskellige prævalenser af en initial ASC-US, som findes at være HSIL eller sværere baseret på højrisiko-HPV-proberesultater.

Tabel 4
Teoretisk positiv og negativ prædiktiv værdi
Højrisiko-HPV-probe
ASC-US-Pap-smear-resultater

Teoretisk prævalens af HSIL	Initialt ASC-US-Pap-smear-resultat	
	Analysens positive prædiktive værdi	Analysens negative prædiktive værdi
5	11,2	99,4
10	21,0	98,7
15	29,7	98,0
20	37,4	97,2
25	44,3	96,3
30	50,6	95,3

Tabel 5 illustrerer variationen mellem de forskellige aldersgrupper, som denne undersøgelse omfatter:

Tabel 5
Kaiser-undersøgelserdata
***digene* HC2 højrisiko-HPV-DNA-testpræstation versus konsensushistologi**
Resultater (HSIL)
Aldersspecifikke karakteristikker

	Alder <30	Alder 30-39	Alder >39
n	287	233	365
Sygdomsprævalens (%)	12,2	11,2	2,7
Sensitivitet (%)	100,00 (35/35)	88,46 (23/26)	80,00 (8/10)
95 % konfidensinterval	90,0-100	69,9-97,6	44,4-97,5
Specificitet (%)	31,4 (79/252)	66,2 (137/207)	79,15 (281/355)
95 % konfidensinterval	25,7-37,5	59,3-72,6	74,6-83,3
Negativ prædiktiv værdi (%)	100 (79/79)	97,86 (137/140)	99,29 (281/283)
Positiv prædiktiv værdi (%)	16,83 (35/208)	24,73 (23/93)	9,76 (8/82)

Klinisk sensitivitet og specificitet til bestemmelse af risikoen for high-grade-sygdom hos kvinder med LSIL- eller HSIL-Pap-smears

En multicenter-klinisk undersøgelse, som anvendte *digene*-HC2 HPV DNA Test, blev udført med prøver, som blev indsamlet fra adskillige store hospitaler og lægecentre kolposkopiklinikker (3 steder), med en stor prævalens af cervixsygdomme og HPV, i den vestlige og sydlige del af USA. HPV-testning blev udført på 3 undersøgelsessteder, der ikke var tilknyttet de kolposkopiklinikker, som prøverne blev indsamlet fra. Populationen for denne kliniske undersøgelse bestod af kvinder, der havde fået konstateret enten LSIL eller HSIL baseret på en nylig Pap-smear og henvist til opfølgingskolposkopi. Af de 702 patienter, som deltog, havde 327 Pap-smear-resultater, der var sværere end ASC-US, og for hvilke tilstrækkelig information forelå; 96 af disse havde en endelig sygdomsstatus på HSIL eller sværere. Exfolierede cervixcelleprøver blev taget med enten *digene* HC2 DNA Collection device og anbragt i STM, eller med et børsteudstyr og skyllet i PreservCyt Solution. Prøver blev indsamlet på tidspunktet for kolposkopi. Prøver blev testet med *digene* HC2 HPV DNA Test og resultaterne blev sammenlignet med den sygdomsstatus, som var blevet bestemt for hver patient. Sygdomsstatus var baseret på resultaterne af histologisk evaluering, men hvis histologien var negativ eller ved fravær af et histologisk resultat blev sygdomsstatus imidlertid bestemt vha. cytologi på det tidspunkt den kolposkopiske undersøgelse blev udført (se tabel 6). *digene* HC2 HPV DNA Test blev udført på 3 store lægecentre i hovedstadsområder,

som ikke var tilknyttet de steder, hvor prøverne blev indsamlet ved kolposkopi. Cytologi blev udført på et patologisk referencelaboratorium, og histologien blev udført på de institutioner, som udførte kolposkopen. Testresultater blev sammenlignet med sygdomsstatus for at vurdere testens sensitivitet, specificitet og negative og positive prædiktive værdier for at påvise high-grade cervikal neoplasi. Pga. ligheden mellem *digene* HC2 HPV DNA Tests ydeevne karakteristikker for STM og PC-media vil kun ydeevnen for PreservCyt blive vist.

Der blev ikke observeret nogen forskel på højrisiko HPV-probe-resultater fra STM-prøver og PreservCyt Solution-prøver. Den følgende tabel viser resultaterne af højrisiko HPV-proben for denne population:

Tabel 6
Patientsygdomsstatus-algoritme

Cytologieresultat	Histologieresultat	Sygdomsstatus
NEG	NEG eller ikke udført*	NEG
LSIL	NEG	LSIL
HSIL	NEG	HSIL
Cancer	NEG	HSIL+
NEG	LSIL	LSIL
LSIL	Ikke udført*	LSIL
LSIL	LSIL	LSIL
HSIL	LSIL	LSIL
Cancer	LSIL	LSIL
NEG	HSIL	HSIL
LSIL	HSIL	HSIL
HSIL	HSIL	HSIL
HSIL	Ikke udført*	HSIL
Cancer	HSIL	HSIL
NEG	Cancer	HSIL+
LSIL	Cancer	HSIL+
HSIL	Cancer	HSIL+
Cancer	Ikke udført*	HSIL+
Cancer	Cancer	HSIL+

* Biopsi og/eller endocervikal curettage (ECC) ikke udført, fordi ingen abnormiteter blev observeret ved kolposkopi, eller fordi histologieresultater ikke var tilgængelige.

Tabel 7 og 8 repræsenterer *digene* HC2 HPV DNA Tests ydeevne, som bestemt vha. 327 PreservCyt-prøver, hvoraf 96 blev indsamlet fra kvinder, som havde fået konstateret high-grade-cervixsygdom. Sammenligninger blev udført for alle undersøgelsespatienter med henviste abnorme Pap-smear-resultater. Sammenligninger er vist for PreservCyt-prøver testet med højrisiko-HPV-probe

Tabel 7
Resultater af højrisiko-HPV-probe

Henvist Pap-smear-resultat	Endelig sygdomsstatus						Total
	HSIL		LSIL		Negativ		
	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	
Højrisiko-HPV-resultater							
LSIL	44	4	78	33	28	37	224
HSIL	45	3	29	14	5	7	103
Samlet	89	7	107	47	33	44	327
	96		154		77		

Tabel 8 viser, at *digene* HC2 HPV DNA Test vha. højrisiko-HPV-probe demonstrerede en samlet sensitivitet på omkring 93 % til identificering af kvinder med high-grade-neoplas i en population, som er blevet henvist til kolposkopi på grundlag af en Pap-smear-diagnose på LSIL, HSIL eller ækvivalent. Testen påviste også en negativ prædiktiv værdi på næsten 93 % i denne population.

Tabel 8
Ydeevnekarakteristikker
digene HC2 højrisiko-HPV-test blandt henviste patienter
 LSIL-Pap-smear-diagnose eller sværere og en endelig sygdomsstatus på HSIL

Højrisiko-HPV-proberesultat	Henvist Pap-LSIL eller -HSIL → HSIL-sygdom			Samlet
		+	-	
+		89	140	229
-		7	91	98
Samlet		96	231	327

Sensitivitet [TP/(TP+FN)] = 92,7 % (89/96)

95 % CI = 85,6 til 97,0

Specificitet [TN/(TN+FP)] = 39,4 % (91/231)

95 % CI = 33,1 til 46,0

Sygdomsprævalens for henvist LSIL til endelig HSIL = 21,4 %

Sygdomsforekomst for henvist HSIL til endelig HSIL = 46,6 %

Samlet positiv prædiktiv værdi = 38,9 % (89/229)

Samlet negativ prædiktiv værdi = 92,8 % (91/98)

Skønt *digene* HC2 HPV DNA Tests specificitet forekom noget lav, forventes der ikke nogen streng korrelation mellem fravær af neoplas og et negativt HPV-resultat. HPV-DNA kan forekomme hos kvinder, som ikke er progredieret til higher grade-sygdom. Når HPV Polymerase Chain Reaction (polymerasekædereaktion) (PCR)-testning (en analyse som kun bliver brugt i forskningsøjemed) blev udført på prøver med positive HPV-testresultater, og hvis tilsvarende sygdomsstatus var mildere end low-grade-neoplas, var rent faktisk næsten 75 % positive.

Tabel 9 viser de teoretiske højrisiko-HPV-probe-positive og -negative prædiktive værdier for en initial LSIL eller HSIL, som findes at være HSIL eller sværere sygdom baseret på kolposkopi.

Tabel 9
Teoretisk positiv og negativ prædiktiv værdi
Højrisiko-HPV-probe
Initiale LSIL- eller HSIL-Pap-smear-resultater

Teoretisk prævalens af HSIL	Initialt LSIL- eller HSIL-Pap-smear-resultat	
	Analyse positiv Prædiktiv værdi	Analyse negativ Prædiktiv værdi
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

DATA, DER UNDERSTØTTER DEN PRIMÆRE HØJRISIKO-HPV-SCREENINGSINDIKATION

Klinisk ydeevne ved screening af patienter med normale Pap-smear-resultater som hjælp til risikovurdering for patientbehandling

Resultaterne af otte uafhængige kliniske undersøgelser, som blev udført af prominente medicinske, akademiske og offentlige institutioner på centre i USA og andre lande, er beskrevet nedenfor. Undersøgelserne benyttede de etablerede Pap-metoder, som allerede blev brugt i de pågældende lande, hvor undersøgelsen blev udført. Bethesda-klassificeringssystemet blev anvendt til at fortolke Pap-resultaterne i alle undtagen to tilfælde. High-grade-cervixsygdom blev ydermere diagnosticeret ved brug af kolposkopivejledt biopsi i hver undersøgelse. Disse undersøgelser vurderede den kliniske nyttevirkning af *digene* HC2 højrisiko-HPV-DNA-testen i sammenligning med Pap-smear for ældre kvinder (generelt over 30-35 år gamle). Alle undtagen én undersøgelse udførte ligeledes prospektiv HPV-testning med *digene* HC2-højrisiko-HPV-DNA-test.

Undersøgelserne var tværsnitsundersøgelser af generelle populationscreeninger, der anvendte *digene* HC2 højrisiko-HPV-DNA-testen, medmindre andet er anført nedenfor. Som angivet blev 2 af de 8 screeningsundersøgelser udført i USA, 2 i Europa, 2 i Latinamerika, 1 i Afrika og 1 i Asien.

digene HC2 højrisiko-HPV-DNA-testens ydeevne som observeret fra seks tværsnitsundersøgelser er opsummeret i tabel 10 og 11 for kvinder, der er 30 år gamle og derover, og som har fået konstateret histologisk bekræftet high-grade cervikal neoplasia (defineret som CIN3 eller sværere).

Tabel 10
Ydeevnevurderinger af *digene* HC2-højrisiko-HPV-DNA-testen
Sensitivitet og specificitet

Population	n	Sensitivitet (%)			Specificitet (%)		
		PAP alene	HPV alene	HPV + PAP	PAP alene	HPV alene	HPV + PAP
Vesteuropa 1	7.592	51,6 (14/27)	96,3 (26/27)	100 (27/27)	98,5 (7.453/7.565)	96,2 (7.275/7.565)	95,1 (7.193/7.565)
		95 % CI	32,0-71,3	81,0-99,9	87,2-100	98,2-98,8	95,7-96,6
Latinamerika 1	6.115	58,4 (45/77)	94,8 (73/77)	97,4 (75/77)	98,7 (5.962/6.038)	93,9 (5.669/6.038)	93,4 (5.637/6.038)
		95 % CI	46,68-69,6	87,2-98,6	90,9-99,7	98,4-99,0	93,3-94,5
Latinamerika 2 [†]	6.176	77,9 (53/68)	89,7 (61/68)	94,1 (64/68)	94,1 (5.745/6.108)	94,0 (5.742/6.108)	89,9 (5.490/6.108)
		95 % CI	66,2-87,1	79,9-95,8	85,6-98,4	93,4-94,6	93,4-94,6
Afrika	2.925	84,1 (90/107)	89,7 (96/107)	92,5 (99/107)	86,4 (2.436/2.818)	80,0 (2.253/2.818)	76,4 (2.152/2.818)
		95 % CI	75,8-90,5	82,4-94,8	85,8-96,7	85,1-87,7	78,4-81,4
Asien	1.936	97,6 (41/42)	100 (42/42)	100 (42/42)	76,3 (1.445/1.894)	83,0 (1.572/1.894)	68,0 (1.287/1.894)
		95 % CI	87,4-99,9	91,6-100,0	91,6-100,0	74,3-78,2	81,2-85,0
USA 1	1.040	50,0 (1/2)	100 (2/2)	100 (2/2)	97,6 (1.013/1.038)	96,2 (999/1.038)	95,5 (991/1.038)
		95 % CI	1,26-98,7	15,8-100,0	15,8-100,0	96,5-98,4	94,9-97,3

[†] HC2-data hvis tilgængelige, i modsat tilfælde er HCS-data blevet anvendt; data kombineret.

Tabel 11
Ydeevnevurderinger af *digene* HC2-højrisiko-HPV-DNA-testen
Positiv og negativ prædiktiv værdi

Population	n		Prævalens (%)	Positiv prædiktiv værdi (%)			Negativ prædiktiv værdi (%)		
			CIN 3	PAP alene	HPV alene	HPV + PAP	PAP alene	HPV alene	HPV + PAP
Vesteuropa ¹	7.592		0,36 (27/7.592)	11,1 (14/126)	8,23 (26/316)	6,77 (27/399)	99,83 (7.453/7.466)	99,99 (7.275/7.276)	100,0 (7.193/7.193)
		95 % CI	0,23-0,52	6,21-17,9	5,45-11,8	4,51-9,69	99,70-99,91	99,92-100,0	99,95-100,0
Latinamerika ¹	6.115		1,26 (77/6.115)	37,2 (45/121)	16,5 (73/442)	15,8 (75/476)	99,47 (5.962/5.994)	99,93 (5.669/5.673)	99,96 (5.637/5.639)
		95 % CI	0,99-1,57	28,6-46,4	13,2-20,3	12,6-19,4	99,25-99,63	99,82-99,98	99,87-100,0
Latinamerika ^{2†}	6.176		1,10 (68/6.176)	12,7 (53/416)	14,3 (61/427)	9,4 (64/682)	99,74 (5.745/5.760)	99,88 (5.742/5.749)	99,93 (5.490/5.494)
		95 % CI	0,86-1,39	9,69-16,3	11,1-18,0	7,30-11,8	99,57-99,85	99,75-99,95	99,81-99,98
Afrika	2.925		3,66 (107/2.925)	19,1 (90/472)	14,5 (96/661)	12,9 (99/765)	99,31 (2.436/2.453)	99,51 (2.253/2.264)	99,63 (2.152/2.160)
		95 % CI	3,01-4,40	15,6-22,9	11,9-17,4	10,6-15,5	98,89-99,60	99,13-99,76	99,27-99,84
Asien	1.936		2,17 (42/1.936)	8,37 (41/490)	11,5 (42/364)	6,47 (42/649)	99,93 (1.445/1.446)	100,0 (1.572/1.572)	100,0 (1.287/1.287)
		95 % CI	1,57-2,92	6,07-11,2	8,44-15,3	4,70-8,65	99,62-100,0	99,77-100,0	99,71-100,0
USA ¹	1.040		0,19 (2/1.040)	3,85 (1/26)	4,88 (2/41)	4,08 (2/49)	99,90 (1.013/1.014)	100,0 (999/999)	100,0 (991/991)
		95 % CI	0,02-0,69	0,10-19,6	0,60-16,5	0,50-14,0	99,45-100,0	99,63-100,0	99,63-100,0

[†] HC2-data hvis tilgængelige, i modsat tilfælde er HCS-data blevet anvendt; data kombineret.

På tværs af alle undersøgelser er der en ensartet, og ofte signifikant, sensitivetsforbedring med *digene* HC2- højrisiko-HPV-DNA-testen i sammenligning med Pap alene. På samme måde som sensitiviteten overstiger HPV's negative prædiktive værdi (NPV) den, som Pap alene giver i alle tilfælde, og er næsten 100 %. Denne NPV demonstrerer den høje sandsynlighed for fravær af high-grade-cervixsygdom eller cancer hos cytologisk normale kvinder, der er fri for HPV-infektion.

Skønt *digene* HC2-højrisiko-HPV-DNA-testens specificitet er lavere end for Pap alene, har sandsynlighedsforholdsberegning vist, at den specificitetsnedgang, der er blevet observeret, ikke er tilstrækkelig signifikant til at påvirke testens kliniske anvendelighed til at identificere kvinder, som kun er udsat for en lille eller slet ingen risiko for at have eller udvikle cervixsygdom. Det er ikke desto mindre vigtigt, at beslutningen om at henvise en patient til kolposkopi, er baseret på alle kliniske oplysninger og risikoplysninger samt patientanamnese, som er tilgængelig for lægen. Vigtige variabler omfatter en anamnese på HPV-infektion og/eller abnorme Pap-smears, alder ved første samleje, antal af seksuelle partnere og samtidige seksuelt overførte sygdomme.^{27,28}

Skønt forekomsten af high-grade-sygdom ikke varierer signifikant blandt de undersøgelser, som ydeevnen blev bestemt med, kan prævalensen af HPV-infektion i en population have en effekt på ydeevnen og varierer typisk med patientpopulationen. Det er ydermere blevet påvist, at forekomsten af HPV-infektion falder drastisk med alderen.^{28, 30-37, 41} Positive prædiktive værdier falder ved testning af populationer med lav prævalens af infektion eller individer med lille risiko herfor.

Longitudinale analyser blev udført ved brug af resultater fra to undersøgelser; den ene blev udført i USA af National Cancer Institute (NCI) i Portland, Oregon og den anden i Frankrig på Laboratoire Pol Bouin C.H.U. de Reims. Disse longitudinale analyser blev udført for at vise, at Pap-negative/HPV-negative patienter er udsat for en lavere risiko for at have cervixsygdom i sammenligning med traditionelt definerede lavrisikokvinder, hvis HPV-status ikke er kendt, og sammenlignet med Pap-negative/HPV-positive patienter.

Resultaterne af disse longitudinale analyser er præsenteret i tabel 12 og 13 nedenfor.

Tabel 12
Resultatresumé: NCI og Frankrig
Relativ risiko for high-grade-sygdom

Undersørgelsesgruppe	Alder	Lavrisikoklassifikation	n	Tilfælde af CIN 3+	Rate (pr. 100 patientår)	Relativ risiko (95 % CI)
NCI	30 og derover	Pap normal, HPV negativ	12.054	28	0,043	0,897 (0,596, 1,348)
		Efterfølgende normale Paps*	9.429	19	0,048	1,000
	Alle	Pap normal, HPV negativ	17.594	48	0,056	0,678 (0,514, 0,894)
		Efterfølgende normale Paps*	13.392	44	0,082	1,000
Frankrig	30 og derover	Pap normal, HPV negativ	1.690	3	0,084	0,849 (0,307, 2,35)
		Efterfølgende normale Paps*	2.026	4	0,099	1,000
	Alle	Pap normal, HPV negativ	2.180	3	0,066	0,491 (0,221, 1,09)
		Efterfølgende normale Paps*	2.650	7	0,136	1,000

*Tre normale årlige Paps over ca. 2 år

Tabel 13
Resultatresumé: NCI og Frankrig
Sygdomsrater stratificeret efter HPV-status ved baseline

Undersørgelsesgruppe	Alder	Baselinestatus	n	Tilfælde af CIN 3+	Rate (pr. 100 patientår)	Relativ risiko (95 % CI)
NCI	30 og derover	Pap normal, HPV positiv	1.078	24	0,451	10,50 (6,13, 18,0)
		Pap normal, HPV negativ	12.054	28	0,043	1,00
	Alle	Pap normal, HPV positiv	2.561	63	0,096	10,64 (7,33 – 15,5)
		Pap normal, HPV negativ	17.594	48	0,056	1,00
Frankrig	30 og derover	Pap normal, HPV positiv	419	14	2,346	27,3 (8,41, 88,3)
		Pap normal, HPV negativ	1696	3	0,084	1,00
	Alle	Pap normal, HPV positiv	619	22	2,520	37,0 (11,8, 116)
		Pap normal, HPV negativ	2180	3	0,066	1,00

HPV-testresultatets kliniske anvendelighed vises yderligere med den forøgede risiko for cervixsygdom hos HPV-positive kvinder i sammenligning med HPV-negative kvinder.

ANALYSESENSITIVITET

Et ikke-klinisk panel af klonet HPV plasmid DNA blev testet for at fastslå, om hver af de 18 HPV-typer kan påvises af *digene* HC2 HPV DNA Test og for at fastslå analysens analytiske sensitivitet for hver enkelt af HPV-typerne. Hver HPV-målkoncentration (100 pg/ml, 10 pg/ml, 2,5 pg/ml, 1 pg/ml, 0,5 pg/ml og 0,2 pg/ml) af hver af de 18 HPV DNA-typer (6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 og 68) blev kørt tredobbelt med lavrisiko-HPV-probe eller højrisiko-HPV-probe som behørigt. Middelsignalet i RLU for hver koncentration af hver HPV-type blev beregnet og sammenlignet med den positive kalibrator for den behørig side af analysen.

Den påviselige grænse for hver HPV-type i STM er vist i tabel 14. De påviselige grænser varierede fra 0,62 pg/ml til 1,39 pg/ml afhængigt af den testede HPV-type. Alle HPV typer var påviselige ved et anslået niveau på 1,09 pg HPV DNA-mål pr. 1-ml STM-prøve. Den påviselige middelgrænse for alle 18 HPV DNA typer var 1,09 pg/ml med en standardafvigelse på 0,05.

Tabel 14
Resumé af *digene* HC2 HPV DNA Tests påviselige sensitivitetegrænser for hver HPV-DNA-type i STM

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

KOMBINERET-PROBECOCKTAIL (CPC) YDEEVNE

Det samme ikke-kliniske HPV plasmid DNA-panel, som er beskrevet ovenfor, blev testet for at fastslå den analytiske sensitivitet af hver af 18 HPV typer i *digene* HC2 HPV DNA Test i henhold til kombineret-probecocktailprotokollen (CPC), der beskrives i denne indlægsseddel. CPC-protokollens analytiske sensitivitet varierede fra 0,58 pg/ml til 1,39 pg/ml og alle HPV typer var påviselige ved et anslået niveau på 0,95 pg/ml HPV DNA-mål pr. 1-ml prøve. Den påviselige middelgrænse for alle 18 HPV typer var 0,95 pg/ml med en standardafvigelse på 0,07. Denne sensitivitet svarer til den analytiske sensitivitet, som blev fundet for *digene* HC2 HPV DNA Tests to-probsmetode.

ÆKVIVALENS MELLEM STM- OG PRESERV CYT SOLUTION-PRØVER

Ækvivalens mellem STM- og PreservCyt Solution-prøver blev undersøgt for ækvivalent udvinding af HPV 18 DNA fra omkring 10^6 positive HeLa-celler indeholdende integrerede HPV 18 genomer injiceret i STM og i en negativ cellepool i PreservCyt Solution. Hver prøvetype blev behandlet i henhold til deres behørigt behandlings-/denatureringsprocedurer, som er beskrevet på denne brugsvejledning og testet med *digene* HC2 HPV DNA Test vha. højrisiko-HPV-probe. Resultaterne viste, at udvindingen af HPV 18 DNA fra humane carcinomaceller er ækvivalent for de to medier, og at PreservCyt Solution-fremstillingsproceduren ikke har indvirkning på *digene* HC2 HPV DNA Tests analytiske sensitivitet.

KORRELLATION AF SUREPATH-PRØVERESULTATER MED STM-PRØVER I EN KLINISK POPULATION

Der blev foretaget en tofaset klinisk evaluering med 6 prøvetagningscentre og 3 teststeder i USA. Patienter på en STD-klinik, en obstetri-/gynækologiklinik, en kolposkopiklinik, et hospital eller et familieplanlægningscenter var berettiget til deltagelse iht. foruddefinerede inklusions- og eksklusionskriterier. Undersøgelsesfasen, der havde til formål at fastlægge en passende *digene* HC2 højrisiko-HPV-DNA-analyse-cut-off til brug sammen med SurePath-prøver, resulterede i ca. 400 tilmeldte patienter. Den kliniske valideringsfase, der resulterede i ca. 1500 tilmeldte patienter til validering af den valgte analyse-cut-off-værdi, begyndte, efter at en foreløbig analyse af gennemførligheden viste, at en analyse cut-off værdi på 1,0 RLU/CO vha. SurePath-prøver var i acceptabel overensstemmelse med STM-prøveresultater.

I begge evalueringsfaser blev parrede SurePath- og STM-cervixprøver taget fra hver deltager af hunkøn, der havde givet sit samtykke. SurePath-prøver blev derefter sendt til et cytologilaboratorium til tilberedning af præparater. Efter den cytologiske tilberedning, blev den resterende SurePath-prøve og den tilsvarende STM-prøve testet ved *digene* HC2 højrisiko-HPV-DNA-test vha. en analyse-cut-off på 1,0 RLU/CO.

Tabel 15 viser korrelationen af SurePath resultatet med den parrede STM-prøve, observeret i de endelige resultater til brug for dataanalyse, udtaget af den samlede population.

Tabel 15
SurePath-resultaternes overensstemmelse med STM
(alle aldre og cytologisk klassifikation)
(n = 1490)

Positiv overensstemmelse % 95 % CI (n/N)		Negativ overensstemmelse % 95 % CI (n/N)	
Alle positive	Meget positiv delmængde (RLU/CO $\geq 2,5$)	Alle negative	Lav negativ delmængde RLU/CO (<0,80)
93,5 90,7, 95,6 (401/429)	96,4 94,1, 98,0 (378/392)	95,3 93,8, 96,5 (1.011/1.061)	96,0 94,6, 97,1 (1.002/1.044)

Disse resultater forudsiger, at denne relative analysefølsomhed og specificitet ved anvendelse af SurePath-prøver i høj grad vil korrelere med den, der blev opnået med STM-prøvetypen, som vist ved den lave grænseværdi på 95 % konfidensinterval for såvel positiv som negativ overensstemmelse.

REPRODUCERBARHED

En multicenter reproducérbarhedsundersøgelse blev udført for at fastslå reproducérbarheden mellem dage, mellem undersøgelsessteder og *digene* HC2 HPV DNA Tests samlede reproducérbarhed vha. et panel af HPV-DNA-mål og HPV-positive og HPV-negative kliniske prøver.

Tre eksterne laboratorier udførte testningen med *digene* HC2 HPV DNA Testkit med samme lotnummer på 3 forskellige dage med et identisk reproducérbarhedspanel. Reproducérbarhedspanelet omfattede følgende prøver: 12 denaturerede kliniske STM-prøvepools, 3 ikke-denaturerede kliniske PreservCyt Solution-prøvepools, negativ kalibrator og positive lavrisiko- og højrisikokalibratorer med koncentrationer på 0,5 pg/ml, 1 pg/ml, 2,5 pg/ml, 5 pg/ml og 10 pg/ml. Alle panelmedlemmer blev testet tredobbelt hver dag vha. både højrisiko-HPV-probe og CPC-metoder. Resultaterne er vist i tabel 16.

Tabel 16
Resumé over samlede statistikker for *digene* HC2 HPV DNA Tests
multicenter-reproducérbarhed

Statistisk mål	HØJRISIKO-HPV-PROBE	Kombineret-probecocktail (CPC)	Kombinerede resultater af højrisiko-HPV-probe og CPC^a
Andel af forventede positiver med et observeret positivt resultat	100 % (99,0–100,0)	99,8 % (98,92–100,0)	99,9 % (99,38–100,0)
Andel af forventede negativer med et observeret negativt resultat	99,0 % (97,49-99,73)	98,9 % (96,79-99,77)	99,0 % (97,88-99,58)
Overensstemmelse	99,5 % (98,70-99,86)	99,5 % (98,70-99,86)	99,5 % (99,0-99,78)
Kappa	0,990	0,989	0,990

^aTal i parenteser angiver 95 % konfidensintervaller. Samlede data er en kombination af alle kørsler på alle steder.

Dette angiver, at *digene* HC2 HPV DNA Tests reproducérbarhed med kliniske prøver indsamlet i STM er meget god.

KRYDSREAKTIVITET

KRYDSREAKTIVITETSPANEL

En gruppe bakterier, vira og plasmider, som almindeligvis findes i den kvindelige anogenitalkanal, såvel som en samling cutaneotropiske HPV-typer, for hvilke kloner var tilgængelige, blev analyseret for at fastslå om krydsreaktivitet ville forekomme med de HPV-prober, som blev anvendt i *digene* HC2 HPV DNA Test. Alle mikroorganismer blev analyseret ved koncentrationer på 1×10^5 og 1×10^7 organismer pr. ml. Renset DNA fra vira og plasmider blev analyseret ved en koncentration på 4 ng/ml.

Nedenfor er en liste over de bakterier, der blev testet. Alle bakterier testede negative i *digene* HC2 HPV DNA Test.

<i>Acinetobacter anitratus</i>	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>
<i>Acinetobacter lwoffii</i> (ATCC 17908)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (ATCC 19424)
<i>Bacteroides fragilis</i> (ATCC 25285)	<i>Neisseria lactamica</i> (NRL 2118)
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> (ATCC 13077)
<i>Candida albicans</i> (ATCC 14053 eller 10231)	<i>Neisseria sicca</i> (ATCC 29256)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 21117, 8427, 33420)
<i>Escherichia coli</i> (HB101)*	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (Cowan-stamme)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Streptococcus faecalis</i> (ATCC 14508)
<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC 27762)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Treponema pallidum</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
<i>Mobiluncus curtisii</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
<i>Mobiluncus mulieris</i>	
<i>Mycoplasma hominis</i>	

* Både den *E. coli*-stamme, som blev brugt til at dyrke plasmider (HB101), og en klinisk rendyrkning af *E. coli* blev analyseret.

Nedenfor er en liste over testet virus- eller plasmid-DNA eller humanserum:

Adenovirus 2	Humant Papillomvirus type 1
Cytomegalovirus	Humant Papillomvirus type 2
Epstein-Barr Virus	Humant Papillomvirus type 3
Hepatitis B overflade antigen-positiv serum	Humant Papillomvirus type 4
Herpes Simplex I	Humant Papillomvirus type 5
Herpes Simplex II	Humant Papillomvirus type 8
Human Immunodeficiency Virus (HIV, RT DNA)	Humant Papillomvirus type 13
Simian Virus type 40 (SV40)	Humant Papillomvirus type 30
	pBR322

De eneste vira eller plasmider, som fremviste krydsreaktivitet i *digene* HC2 HPV DNA Test var HPV type 13 og plasmid-pBR322. HPV 13-DNA reagerede kun med lavrisiko-HPV-probe. HPV 13 påvises ofte i læbelæsioner hos visse etniske grupper, men er ikke blevet påvist i anogenitalkanal.²⁹ Den krydsreaktivitet, som blev observeret mellem HPV 13 og *digene* HC2 HPV DNA Tests lavrisiko-HPV-probe, forventes derfor ikke at forårsage et klinisk forvirrende resultat for anogenitale prøver. Krydsreaktivitet mellem pBR322 og *digene* HC2 HPV DNA Tests lavrisiko- og højrisiko-HPV-prober er ikke uventet, da det er vanskeligt at fjerne al vektor-pBR322-DNA, når HPV-insert isoleres. Tilstedeværelsen af pBR322 homologe sekvenser er blevet rapporteret i humane genitalprøver og falsk-positive resultater kunne forekomme, hvis høje niveauer af bakterieplasmider er til stede.²⁹⁸ kliniske prøver, der testede positive med *digene* HC2 HPV DNA Tests lavrisiko- og højrisiko-HPV-prober, viste imidlertid, at ingen af de positive resultater skyldtes pBR322 ved testning med en pBR322-probe. Sandsynligheden for at *digene* HC2 HPV DNA Test giver et falsk-positivt resultat, der skyldes homologe pBR322-sekvenser i kliniske prøver, forekommer derfor at være lav.

KRYDSHYBRIDISERING

Alle de 18 HPV-typer blev testet med både lavrisiko- og højrisiko-HPV-prober ved koncentrationer på 4 ng/ml HPV-DNA. Alle HPV-målene forventedes at være positive med den behørig probegruppe, hvorimod ingen af prøverne forventedes at være positive med den modsatte probegruppe. Denne undersøgelse viste, at der sker en ringe krydshybridisering mellem HPV type 6 og 42 (lavrisiko HPV-typer) og højrisiko-probegruppen (højrisiko-HPV-probe). Prøver med høje niveauer (4 ng/ml eller derover af HPV 6 eller HPV 42 DNA) kan være positive for begge probegrupper. Den kliniske signifikans af dette er, at patienter med 4 ng/ml eller derover af HPV 6- eller HPV 42-DNA kan blive henvist til kolposkopi.

Det er ydermere blevet påvist, at højrisiko-HPV-proben kan krydsreagere med HPV type 40, 53 og 66. Disse typer er sjældne, og der foreligger utilstrækkeligt bevis for at kunne fastslå den eksakte korrelation mellem infektion med disse typer og udviklingen af high-grade-sygdom³⁸. Patienter, hvis prøver indeholder høje niveauer af disse HPV-DNA-typer, kan fejlagtigt blive henvist til kolposkopi. Det er også blevet rapporteret i litteraturen, at komplekse prober, der ligner den, der bliver anvendt i denne test, kan forårsage falsk-positive resultater pga. krydshybridisering med HPV type 11, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 eller MM9.³⁹ Skønt adskillige af disse HPV-typer er sjældne eller nyere typer, som man kun sjældent kommer ud for ved high-grade-sygdom, kan patienter, hvis prøver indeholder høje niveauer af disse HPV-DNA-typer, fejlagtigt blive henvist til kolposkopi.

BLOD OG ANDRE SUBSTANSERS EFFEKT PÅ STM-PRØVER

Effekten af blod og andre potentielt forstyrrende definerede eller ikke-definerede substanser blev evalueret i *digene* HC2 HPV DNA Test. Fuldblod, udskylning, svampedræbende creme og antikonceptionscreme (stoffer, som ofte kan findes i cervixprøver) blev tilsat STM-negative og positive prøver (kliniske prøvepools og ikke-kliniske prøver) i koncentrationer, som kan findes i cervixprøver. Der blev ikke observeret nogen falsk-positive resultater med nogen af de fire stoffer ved nogen koncentration overhovedet. Et falsk-negativt resultat kan imidlertid blive rapporteret for kliniske prøver med HPV-DNA-niveauer, som ligger tæt på analysens positive cut-off (1 pg/ml), hvis høje niveauer af svampedræbende creme eller antikonceptionscreme var til stede. Det er imidlertid meget usandsynligt, at en klinisk prøve vil bestå næsten udelukkende af et af disse stoffer, eftersom cervix rutinemæssigt renses, inden der tages prøver til Pap-smear- og HPV-testning.

BLOD OG ANDRE SUBSTANSERS EFFEKT PÅ PRESERV CYT SOLUTION-PRØVER

Effekten af blod og andre potentielt forstyrrende definerede eller ikke-definerede substanser, som potentielt kan være til stede i PreservCyt Solution-kliniske prøver, blev evalueret i *digene* HC2 HPV DNA Test. Fuldblod, udskylning, svampedræbende creme og antikonceptionscreme (stoffer, som ofte kan findes i cervixprøver) blev tilsat til PreservCyt Solution negative og positive kliniske prøvepools i koncentrationer, som kan findes i cervixprøver. Der blev ikke observeret nogen falsk-positive eller falsk-negative resultater med nogen af de 4 stoffer ved nogen koncentration overhovedet. Stoffer, som naturligt er til stede i nogle kliniske prøver, vil heller ikke hæmme *digene* HC2 HPV DNA Tests påvisning af HPV-DNA.

digene HC2 HPV DNA TESTS REPRODUCERBARHED MED KLINISKE PRØVER INDSAMLET I STM

digene HC2 HPV DNA Tests reproducérbarhed med kliniske prøver indsamlet i STM blev fastslået i en undersøgelse, hvori der anvendtes 20 kliniske pools (10 positive og 10 negative), der blev fremstillet ved at kombinere cervixbørsteprøver indsamlet i STM, og som tidligere var blevet denatureret og testet. Prøver blev testet i replikater a 4 hver dag i 5 dage, i alt 20 replikater, pr. prøve. Testning blev udført vha. kombineret-probecocktailmetoden. Middelværdier, standardafvigelse og 95 % konfidensintervaller omkring middelværdien (CI'er) blev beregnet for hver prøve inden for den enkelte dag og i 5 dage og er vist i tabel 17.

Tabel 17
Middel RLU/CO med konfidensintervaller og procent positive
(faldende rækkefølge efter middel RLU/CO)

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

For de 5 prøver med en middel RLU/CO på 20 % eller derover over cut-off (nr. 1-5), var 100 ud af 100 replikater (100,0 %) positive. For de 5 prøver med en middel RLU/CO inden for 20 % over eller under analysens cut-off (nr. 6-10), var 60 ud af 100 (60 %) af replikaterne positive og 40 ud af 100 (40 %) negative. For de 10 prøver med en middel RLU/CO på mere end 20 % under analysens cut-off, var 200 ud af 200 (100 %) af replikaterne negative.

Prøver med en middel RLU/CO på 20 % eller derover over cut-off var således positive 100 % af gangene, mens prøver med en middel RLU/CO på 20 % eller mere under cut-off, var negative 100 % af gangene, hvilket indikerer, at prøver, der er 20 % eller mere væk fra cut-off kan forventes at give konsistente resultater. Prøver, der var tæt på cut-off, gav et næsten lige antal positive og negative resultater. Disse data viser, at STM-prøver giver reproducérbare resultater med *digene* HC2 HPV DNA Test.

***Digene* HC2 HPV DNA TESTS REPRODUCERBARHED MED KLINISKE PRØVER INDSAMLET I PRESERVCYT SOLUTION**

digene HC2 HPV DNA Tests reproducérbare med kliniske prøver indsamlet i PreservCyt Solution blev fastslået i en undersøgelse, hvori der anvendtes 24 falske prøver ved en koncentration, der omfattede en række forskellige HPV-DNA-koncentrationer. Prøverne bestod af PreservCyt Solution og leukocytter med og uden HPV 16-plasmidindeholdende bakterier.

Prøverne blev testet i replikater på 4 hver dag i 5 dage med i alt 20 replikater pr. prøve. På hver af undersøgelsens 5 dage blev en 8 ml alikvot fra hver prøve bearbejdet og testet i henhold til *digene* HC2-prøvekonversionskittets brugsvejledning ved brug af højrisiko HPV-probe alene. Middelværdier, standardafvigelser og 95 % konfidensintervaller (CI'er) blev beregnet for hver prøve inden for den enkelte dag og for alle 5 dage samt replikater. Middel RLU/CO, konfidensinterval omkring middelværdien og procentandelen af positive replikater er vist i tabel 18 for hver prøve i faldende rækkefølge baseret på middel RLU/CO.

Tabel 18
Middel RLU/CO med konfidensintervaller og procent positive
(faldende rækkefølge efter middel RLU/CO)

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

For de 6 prøver med en middel RLU/CO på 20 % eller mere over cut-off (nr. 1-6), var 114 af 120 replikater (95,0 %) positive. For de 7 prøver med en middel RLU/CO inden for 20 % over eller under analysens cut-off (nr. 7-13), var 88 ud af 139 (63,3 %) af replikaterne positive og 51 ud af 139 (36,7 %) negative. For de 4 prøver inden for 10 % over eller under cut-off (nr. 10-13), var 41 ud af 79 (51,9 %) af replikaterne positive og 38 (48,1 %) negative. For de 11 prøver med en middel RLU/CO på mere end 20 % under analysens cut-off, var 220 ud af 220 (100 %) af replikaterne negative.

Prøver med en middel RLU/CO på 20 % eller derover over cut-off var således positive mere end 95 % af gangene, mens prøver med en middel RLU/CO på 20 % eller mere under cut-off var negative 100 % af gangene, hvilket indikerer, at prøver, der er 20 % eller mere væk fra cut-off, kan forventes at give konsistente resultater. Prøver, der var tæt på cut-off, gav et næsten lige antal positive og negative resultater. Disse data viser, at PreservCyt Solution-prøver giver reproducérbare resultater med *digene* HC2 HPV DNA Test.

***digene* HC2 HØJRISIKO-HPV-DNA-TESTENS REPRODUCÉRBARHED MED PRØVER TAGET MED SUREPATH PRESERVATIVE FLUID**

Der blev foretaget evalueringer af reproducérbaheden for at karakterisere 3 forskellige laboratoriers evne til at opnå sammenlignelige diagnoseresultater på forskellige dage og med forskellige kørsler ud fra et identisk sæt prøver med kendt positiv/negativ HPV-status ved anvendelse af en analyse-cut-off på 1,0 RLU/CO. Prøvepanelet til analyse af reproducérbahed bestod af 5 positive HPV-prøver, 2 prøver med HPV DNA-koncentrationer tæt på analyse-cut-off og 5 negative HPV-prøver.

Panelmedlemmerne blev tilberedt ved kombination af unikke SurePath-patientprøver med en kendt negativ og positiv HPV-status til opnåelse af de ønskede RLU/CO-værdier. Hvert panelmedlem blev testet dobbelt to gange hver dag over en periode på fem dage på hvert af de fem deltagende laboratorier.

Tabel 19
Reproducérbarhedsanalyse af SurePath-prøver
Kvantative resultater efter panelmedlem

Panelmedlem	Middel RLU/CO	Forventet resultat	HPV-positiv n (%)	HPV-negativ n (%)
1	0,20	negativ	0 (0)	60 (100)
2	0,21	negativ	0 (0)	60 (100)
3	0,22	negativ	0 (0)	60 (100)
4	0,28	negativ	2 (3,3)	58 (96,7)
5	0,36	negativ	2 (3,3)	58 (96,7)
6	0,83	negativ	13 (21,7)	47 (78,3)
7	1,17	positiv	26 (43,3)	34 (56,7)
8	19,47	positiv	60 (100)	0 (0)
9	25,65	positiv	60 (100)	0 (0)
10	81,52	positiv	60 (100)	0 (0)
11	154,18	positiv	60 (100)	0 (0)
12	765,29	positiv	60 (100)	0 (0)

REPRODUCÉRBARHED FOR SUREPATH-RESULTATER VED ANVENDELSE AF RAPID CAPTURE SYSTEM TIL ANALYSEBEHANDLING

SurePath-prøveresultaternes reproducérbarhed ved anvendelse af Rapid Capture System til analysebehandling blev sammenlignet med de opnåede resultater ved manuel analysebehandling. Der blev foretaget to sammenligningstest på separate alikvoter af den samme behandlede prøve.

Tabel 20
SurePath-resultaternes overensstemmelse inden for prøven med RCS
(RCS vs. manuel analyse)

Positiv overensstemmelse % 95 % CI (n/N)		Negativ overensstemmelse % 95 % CI (n/N)	
Alle positive	Meget positiv delmængde (RLU/CO ≥2,5)	Alle negative	Lav negativ delmængde RLU/CO (<0,80)
99,0 417/421 97,6, 99,7	100 375/375 99,0, 100	97,7 1.057/1.079 96,9, 98,7	98,7 1.050/1.064 97,8, 99,28

PROCEDUREBEGRÆNSNINGER

Til *in vitro*-diagnostisk brug

Der henvises til *brugermanualen til Rapid Capture System* for til yderligere procedurebegrænsninger, der er specifikke for dette højvolumen-prøvekapacitet-testningssystem.

- *digene* HC2 HPV DNA Test for human papillomavirus type 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 og 68 anbefales ikke til evaluering af mistænkt seksuelt misbrug.
- Forekomsten af HPV-infektion i en population kan have en effekt på ydeevnen. Positive prædiktive værdier falder ved test af populationer med lav prævalens eller personer uden infektionsrisiko.
- Et negativt resultat udelukker ikke muligheden for HPV-infektion, da meget lave infektionsniveauer eller prøvetagningsfejl kan forårsage et falsk-negativt resultat.
- *digene* HC2 HPV DNA Test skelner mellem 2 grupper af HPV-typer: HPV 6/11/42/43/44 og 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68. Den vil ikke skelne mellem virustyperne inden for disse grupper.
- *digene* HC2 HPV DNA Test kan kun bruges med cervixprøver, der er indsamlet med *digene* HC2 DNA Collection Device eller med biopsier, der er indsamlet i STM, eller cervixprøver, der er indsamlet med indsamlingsudstyr af børstetypen eller børste-/spatelkombination og placeret i PreservCyt Solution, eller cervixprøver taget med SurePath Preservative Fluid. Biopsiprøver må kun analyseres, hvis de øjeblikkeligt placeres i STM og opbevares ved -20°C, indtil de analyseres.
- *Digene* HC2 DNA Collection Device må ikke bruges til at indsamle prøver fra gravide kvinder.
- Infektion med HPV er ikke en definitiv indikator for tilstedeværelse af high-grade-cervixsygdom, ej heller antyder det, at high-grade-sygdom eller cancer vil udvikle sig.
- Der findes en ringe krydshybridisering mellem HPV type 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 og MM9 og højrisiko-HPV-proben. Patienter, hvis prøver indeholder høje niveauer af disse HPV-typer, kan fejlagtigt blive henvist til kolposkopi³⁸.
- *digene* HC2 HPV DNA Test er udformet til at påvise lavrisiko- og højrisiko-HPV-typer, inklusive 39, 58, 59 og 68. Analytiske undersøgelser, som blev udført af QIAGEN ved brug af klonet HPV-plasmid DNA, viste, at denne analyse påviser disse typer ved niveauer fra 0,62 pg/ml til 1,39 pg/ml. Dette svarer til påvisningskarakteristikkerne for de andre HPV-typer, som *digene* HC2 HPV DNA Test retter sig mod. QIAGEN var kun i stand til at validere påvisningen af disse HPV-typer i et begrænset antal kliniske prøver. På grund af den lave prævalens af disse typer blandt den almindelige population (som påvist af Bosch et. Al³⁶), er *digene* HC2 HPV DNA Tests ydeevnekarakteristikker mht. påvisning af HPV type 39, 58, 59 og 68 ikke blevet statistisk bekræftet.
- Hvis høje koncentrationer af svampedræbende creme, antikonceptionscreme eller udskylning er til stede på det tidspunkt, hvor prøven bliver indsamlet til HPV-testning, er der sandsynlighed for, at der fås et falsk-negativt resultat, hvis disse prøver indeholder HPV-DNA-niveauer, som giver RLU/CO-værdier tæt på analysens cut-off.
- Krydsreaktivitet mellem både *digene* HC2 HPV DNA Test-proben og plasmid pBR322 er mulig. Tilstedeværelsen af pBR322 homologe sekvenser er blevet rapporteret i humane genitalprøver, og falsk-positive resultater vil kunne forekomme, hvis høje niveauer af bakterieplasmider er til stede.

LITTERATURHENVISNINGER

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

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

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

GUIDE TIL PROBLEMLØSNING

Observation	Sandsynlige årsager	Opløsninger
Forkert eller ingen farveændring observeret under denaturering.	<p>Denatureringsreagens ikke fremstillet korrekt eller</p> <p>Denatureringsreagens ikke tilsat.</p> <p>Prøve indeholder blod eller andet materiale, der maskerer farveændringen.</p> <p>Prøvens pH kan være usædvanlig sur.</p>	<p>Kontrollér, at denatureringsreagensen indeholder indikatorfarvestof og har en mørkviolet farve.</p> <p>Kontrollér, at denatureringsreagensen er blevet tilsat prøven, ved at måle prøvevolumenet (1,5 ml er forventet). Hvis volumenet indikerer, at denatureringsreagensen ikke er blevet tilsat, skal den behørigt tilsætning udføres, hvorefter der blandes og fortsættes med analysen, hvis den korrekte farveændring observeres.</p> <p>Den eksakte, beskrevne farveændring forventes ikke med disse prøvetyper; <i>digene</i> HC2 HPV DNA Tests resultater skulle ikke blive påvirket negativt.</p> <p>Hvis ingen af de andre årsager gør sig gældende, kan prøven være usædvanlig sur, hvorved den forventede farveændring ikke vil forekomme. Indsaml en ny prøve inden eddikesyre påføres på cervix, eftersom ukorrekt prøve-pH vil have negativ effekt på testresultaterne.</p>
Kvalitetskontroller giver ukorrekte resultater	<p>Ukorrekt softwareprotokol valgt til test (f.eks. CPC-protokol anvendt til to-metode)</p> <p>Omvendt placering af QC1-LR og QC2-HR</p> <p>Omvendt placering af LRC og QC1-LR og/eller HRC og QC1-HR</p>	<p>Hvis softwareprotokollen er ukorrekt for den test, der udføres, skal pladen aflæses igen inden for 30 minutter efter, at Detection Reagent 2 tilsættes, med den korrekte protokol.</p> <p>Test prøverne igen.</p> <p>Test prøverne igen.</p>
Forkert farveændring observeret under hybridisering.	<p>Utilstrækkelig blanding af probeblanding og denaturerede kalibratorer, kontroller og/eller prøver; eller probeblanding ikke tilsat; eller ukorrekt reagensvolumen tilsat.</p> <p>Prøve indeholder blod eller andet materiale, der maskerer farveændringen.</p> <p>Prøve havde <1000 µl STM.</p>	<p>Ryst hybridiseringsmikrotiterplade eller mikrorørstativ i yderligere 2 minutter. Hvis der er brønde, som forbliver violette, skal de tilsættes yderligere 25 µl af den behørigt probeblanding, hvorefter de blandes godt. Hvis den korrekte farveændring ikke forekommer ved tilsætning og genblanding, og prøven ikke indeholder blod eller andre substanser, skal prøven gentestes.</p> <p>Den eksakte, beskrevne farveændring forventes ikke med disse prøvetyper; <i>digene</i> HC2 HPV DNA Tests resultater skulle ikke blive påvirket negativt.</p> <p>Kontrollér mængden af den oprindelige prøve. Volumen skal være 1350 µl ± 20 µl (efter der udtages 75 µl for lav- og højrisiko-HPV-prober). Hvis volumenet er <1350 µl, vil den oprindelige prøve have indeholdt <1000 µl STM. Udtag en ny prøve.</p>

Observation	Sandsynlige årsager	Opløsninger
<p>Analyse opfylder ikke valideringskriterier. Intet signal observeret i kalibrator, kvalitetskontroller eller prøver.</p>	<p>Ingen probe tilsat til probediluent.</p> <p>Probe kontamineret med RNase under tilberedningen.</p> <p>Utilstrækkelig blanding af probe og probediluent.</p> <p>Utilstrækkelig blanding af fortyndet probe og denatureret prøve.</p> <p>Forkert tid eller temperatur under hybridiseringstrinet.</p> <p>Utilstrækkelig blanding under capture-trin.</p> <p>Ombyggede prober/probeblandinger/hybridiseringsrør.</p> <p>Hvis det forsømmes at tilsætte den korrekte mængde Detection Reagent 1 eller at inkubere for den specificerede periode.</p> <p>Hvis det forsømmes at tilsætte den korrekte mængde Detection Reagent 2 eller at inkubere for den specificerede periode.</p> <p>Fejlfunktion af luminometer eller forkert programmering.</p>	<p>Fremstil probeblandinger som beskrevet i dennebrugsvejledning. Mærk rørene omhyggeligt.</p> <p>Anvend aerosolbarriere-pipettespidser, når proben pipetteres, og handsker. Brug kun rene, nye engangsreagensbeholdere.</p> <p>Når proben er blevet tilsat probediluenten, skal der blandes grundigt ved at omryste i mindst 5 sekunder ved høj hastighed. Der skal dannes en synlig hvirvel.</p> <p>Når probeblanding og prøve er blevet tilsat alle hybridiseringsmikrotiterpladebrønde eller mikrorør, skal de rystes på Rotary Shaker I ved en indstilling på 1100 ± 100 o/m i 3 ± 2 minutter. Kontrollér, at farven ændres fra violet til gul i alle rør/mikrotiterpladebrønde.</p> <p>Hybridisér i 60 ± 5 minutter ved $65 \pm 2^\circ\text{C}$. Kontrollér vandbadets eller Microplate Heater I's temperatur. Sørg for, at Microplate Heater I eller vandbadet er indstillet til at opvarme prøver til den korrekte temperatur, og opvarm i 60 minutter inden brug. Kontrollér, at vandniveauet er tilstrækkeligt højt til at opvarme prøver til den rigtige temperatur. Vandbade skal kalibreres jævnlige.</p> <p>Omryst på Rotary Shaker I i 60 ± 5 minutter ved $20-25^\circ\text{C}$, som beskrevet i denne brugsvejledning. Bekræft Rotary Shaker I's hastighed ved at kalibrere den, som beskrevet i afsnittet Kalibrering af rystehastighed i <i>brugervejledningen til Rotary Shaker I</i>.</p> <p>Fremstil probeblandinger omhyggeligt, og mærk probeblandingsrør i overensstemmelse hermed. Vær omhyggelig med at tilsætte den korrekte probe til det korrekte sæt hybridiseringsrør. Mærk probeblandingsrør, hybridiseringsrør og/eller stativer for at reducere muligheden for ombytning.</p> <p>Pipettér 75 µl Detection Reagent 1 i hver brønd med en 8-kanalspipette. Inkubér ved $20-25^\circ\text{C}$ i 30-45 minutter.</p> <p>Pipettér 75 µl Detection Reagent 2 i hver brønd med en 8-kanalspipette. Inkubér ved $20-25^\circ\text{C}$ i 15 til 30 minutter.</p> <p>Se den relevante brugsvejledning for yderligere anvisninger, eller kontakt den lokale QIAGEN-repræsentant.</p>

Observation	Sandsynlige årsager	Opløsninger
<p>Forhøjede RLU-værdier i kalibrator, kvalitetskontroller og/eller prøver (≥200 RLU'er i mange eller alle brønde).Analyse opfylder måske ikke valideringskriterier.</p>	<p>Denatureringsreagens ikke tilsat; eller ukorrekt volumen af reagens tilsat; eller utilstrækkelig blanding af denatureringsreagens og prøver/kalibratore.</p> <p>Lyslækage i luminometer. Dør ikke lukket helt tæt. Forsøgling rundt om døren gået i stykker.</p> <p>Kontaminering af Detection Reagent 2 eller Capture-mikrotiterpladebrønde med Detection Reagent 1 eller eksogent alkalisk phosphatase.</p> <p>Kontamineret vaskebuffer.</p> <p>Kontamineret Automated Plate Washer I.</p> <p>Utilstrækkelig vaskning af Capture-mikrotiterpladebrønde efter Detection Reagent 1 inkubering.</p> <p>Kontaminering af mikrotiterpladebrønde med Detection Reagent 1.</p> <p>Hybridiseringsopløsning trykket af på samme område af Kimtowels-klude eller lignende fnugfrie papirservietter.</p> <p>Forkerte aftrykningssservietter anvendt.</p>	<p>Kontrollér, at repetitionspipetten leverer korrekt mængde, inden denatureringsreagens tilsættes. Kalibrerede pipetter er absolut nødvendige. Tilsæt det halve volumen denatureringsreagens til hvert rør og bland grundigt. For at undgå falsk-positive resultater skal det sikres, at væsken vasker hele rørets indvendige overflade. Kalibratore, kvalitetskontroller og prøver skal blive violette efter tilsætning af denatureringsreagens.</p> <p>Kontrollér luminometerets baggrundslæsning ved at aflæse en tom mikrotiterplade. En aflæsning på over 50 RLU indikerer, at der er lyslækage. Se den relevante brugsvejledning for yderligere anvisninger, eller kontakt den lokale QIAGEN-repræsentant.</p> <p>Se kontamineringskontrol i dette afsnit om problemløsning.</p> <p>Se kontamineringskontrol i dette afsnit om problemløsning.</p> <p>Se kontamineringskontrol i dette afsnit om problemløsning.</p> <p>Vask mikrotiterpladebrøndene grundigt 6 gange med vaskebuffer, idet brøndene fyldes til oversvømmelse hver gang, eller anvend Automated Plate Washer I. Der må ikke kunne ses nogen rester af den lyserøde væske i brøndene efter vask. <i>Se brugsvejledningen til Automated Plate Washer (automatiseret pladevaskeapparat) for vejledning vedrørende kontamineringsstestning eller funktionsforstyrrelse.</i></p> <p>Kontrollér, at alle arbejdsflader er rene og tørre. Vær forsigtig ved brug af Detection Reagent 1. Undgå aerosoler.</p> <p>Der må ikke trykkes af på brugte Kimtowels-klude eller lignende brugte fnugfrie papirservietter.</p> <p>Tryk af på rene Kimtowels-klude eller lignende fnugfrie papirservietter.</p>
<p>Lave PC/NC-forhold eller højt antal af lav-positive prøver med forhold <2,0 (>20 %). Analyse opfylder måske ikke valideringskriterier.</p>	<p>Utilstrækkelig prøvetilberedning.</p> <p>Probe ikke blandet tilstrækkeligt eller utilstrækkelig mængde probe tilsat til analyser.</p> <p>Utilstrækkelig mængde fortyndet probe tilsat til hvert hybridiseringsmikrorør.</p> <p>Tab af detektionsreagens 1-aktivitet.</p> <p>Utilstrækkelig capture.</p> <p>Utilstrækkelig vask.</p> <p>Kontamineret vaskebuffer.</p>	<p>Tilsæt den korrekte mængde denatureringsreagens, og bland grundigt vha. vortexer. For at undgå falsk-positive resultater skal det sikres, at væsken vasker hele rørets indvendige overflade. For PreservCyt Solution-prøver skal det sikres, at der blandes korrekt, og at cellepillen er helt genopslemmet før denatureringsinkubation. Der henvises til <i>digene</i> HC2-prøvekonversionskittets brugsvejledning for protokoldetaljer. Der skal ses en tydelig farveændring fra klar til mørkviolet. Inkubér i 45 ± 5 minutter ved 65 ± 2 °C.</p> <p>Fremstil probem blandinger som beskrevet. Bland grundigt ved rystning, idet det sikres, at der dannes en synlig hvirvel. Probem blandinger skal tilsættes til rør med en positiv fortrængningspipette eller en flerkanalspipette for at sikre nøjagtig levering.</p> <p>Kontrollér, at 8-kanalspipetten leverer korrekt, inden probem blandning tilsættes hybridiseringsmikrotiterplade eller mikrorør. Tilsæt 25 µl probem blandning til alle mikrotiterpladebrønde eller mikrorør, der indeholder denaturerede kalibratore, kontroller og kliniske prøver. Kontrollér, at 8-kanalspipetten leverer korrekt, inden probem blandning tilsættes hybridiseringsmikrotiterpladebrønde. Farven skal ændres fra mørkviolet til gul ved tilsætning og grundig blanding med probem blandning. PreservCyt Solution-prøver skal blive lyserøde/pink i stedet for gule.</p> <p>Detection Reagent 1 skal opbevares ved 2-8°C. Skal anvendes inden udløbsdatoen, som er angivet på den yderste æskes mærkat.</p> <p>Capture-trinet skal udføres vha. Rotary Shaker I ved en indstilling på 1100 ±100 o/m. Valider rysterhastigheden vha. kalibrering.</p> <p>Vask mikrotiterpladebrøndene grundigt 6 gange med vaskebuffer, idet brøndene fyldes til oversvømmelse hver gang, eller anvend Automated Plate Washer I.</p> <p>Se kontamineringskontrol i dette afsnit om problemløsning.</p>

Observation	Sandsynlige årsager	Opløsninger
<p>Serie af positive prøver med RLU-værdier, der er næsten ens.</p>	<p>Kontaminering af capture-mikrotiterpladebrønde under analysehåndtering.</p> <p>Kontaminering af detektionsreagens 2.</p> <p>Funktionsforstyrrelse på Automated Plate Washer.</p>	<p>Tildæk capture-mikrotiterplade under alle inkubationer. Undgå at udsætte rør for aerosolkontaminering under udførelse af analysen. Bær pulverfri engangshandsker under manipulationerne.</p> <p>Vær forsigtig med ikke at kontaminere stamopløsningen, når Detection Reagent 2 pipetteres i capture-mikrotiterpladebrønde. Vær forsigtig med at undgå at kontaminere Detection Reagent 2 med aerosoler fra Detection Reagent 1 eller laboratoriestøv osv.</p> <p>Se kontamineringskontrol i det afsnit om problemløsning, eller se <i>brugsvejledningen til Automated Plate Washer (automatiseret pladevaskeapparat)</i> for vejledning vedrørende kontamineringstestning eller funktionsforstyrrelse.</p>
<p>Brede %CV'er mellem replikater.</p>	<p>Unøjagtig pipettering.</p> <p>Utilstrækkelig blanding.</p> <p>Ufuldstændig overførsel af væske fra hybridiseringsmikrorør til capture-mikrotiterpladebrønde.</p> <p>Ukorrekte vaskeforhold.</p> <p>Kontaminering af mikrotiterpladebrønde med Detection Reagent 1.</p>	<p>Kontrollér pipette for at sikre, at reproducérbare volumener leveres. Pipetter skal kalibreres rutinemæssigt.</p> <p>Bland grundigt i alle trin. Omryst inden denatureringsinkubation og efter tilsætning af probeblanding. Kontrollér, at der dannes en synlig hvirvel.</p> <p>Udvis forsigtighed under overførselstrin fra hybridiseringsmikrotiterpladebrønde eller mikrorør til capture-mikrotiterpladebrønde for at sikre, at reproducérbare volumener overføres.</p> <p>Vask mikrotiterpladebrøndene grundigt 6 gange med vaskebuffer, idet brøndene fyldes til oversvømmelse hver gang, eller anvend Automated Plate Washer og behørigt protokoller for denne.</p> <p>Kontrollér, at alle arbejdsflader er rene og tørre. Vær forsigtig ved brug af Detection Reagent 1. Undgå aerosoler.</p>
<p>Falsk positive resultater opnået fra kendte negative prøver.</p>	<p>Detektionsreagens 2 kontamineret.</p> <p>Kontaminering af mikrotiterpladebrønde med Detection Reagent 1.</p> <p>Aftrykning på samme område af Kimtowels klude eller lignende fnugfri papirservietter for adskillige rækker.</p> <p>Utilstrækkelig prøvetilberedning.</p> <p>Ukorrekte vaskeforhold.</p> <p>Kontaminering af pipettespids med ikke-denatureret materiale under overførsel af denatureret prøve til mikrotiterpladebrønd, som anvendes til HPV-probehybridisering.</p>	<p>Vær forsigtig med ikke at krydskontaminere prøver idet Detection Reagent 2 alikvoterer mellem prøver. Hvis kun en del af et kit skal anvendes, skal det nødvendige volumen for den pågældende analyse alikvoteres i en ren engangsreagensbeholder inden pipetten fyldes.</p> <p>Vask mikrotiterpladebrøndene grundigt 6 gange med vaskebuffer, idet brøndene fyldes til oversvømmelse hver gang, eller anvend Automated Plate Washer I. Der må ikke kunne ses nogen rester af den lyserøde væske i mikrotiterpladebrøndene efter vask.</p> <p>Der må ikke aftrykkes på et område, som allerede er blevet brugt, da det kan medføre, at prøver kontamineres.</p> <p>Tilsæt den korrekte mængde denatureringsreagens, og bland grundigt vha. vortexer. For at undgå falsk-positive resultater skal det sikres, at væsken vasker hele rørets indvendige overflade vha. enten den manuelle metode eller MST Vortexer 2-metoden (for den manuelle omrystemetode skal der vendes op og ned på prøverør én gang). For PreservCyt Solution-prøver skal det sikres, at der blandes korrekt, og at cellepillen er helt genopslåmmet før denatureringsinkubation. Der henvises til <i>dtgene</i> HC2-prøvekonversionskittets brugsvejledning for protokoldetaljer. En tydelig farveændring til mørkviolet skal noteres for alle prøver. Inkubér i 45 ± 5 minutter ved 65 ± 2°C. SurePath-prøver skal inkuberes i 90 ± 5 minutter ved 65 ± 2°C.</p> <p>Vask mikrotiterpladebrøndene grundigt 6 gange med vaskebuffer, idet brøndene fyldes til oversvømmelse hver gang, eller anvend Automated Plate Washer og behørigt protokoller for denne.</p> <p>Prøvebearbejdningsprocedurernes denatureringstrin skal udføres som anført i denne brugsvejledning. Ukorrekt omrystning af prøve, rørvinkel og omrystning kan resultere i ufuldstændig denaturering af ikke-specifikke RNA:DNA-hybrider, som er endogene for cervixprøver. Især ved anvendelse af PreservCyt Solution-prøver eller SurePath Preservative Fluid er det sandsynligt, at disse hybrider er til stede på indersiden af prøvedenatureringsrøret. For at forhindre mulig overførsel af dette ikke-denaturerede celledmateriale må mikropipettespiden ikke berøre indersiden af prøvedenatureringsrøret under overførsel af den denaturerede prøve til det mikrorør eller den mikrotiterpladebrønd, der anvendes til HPV-probehybridisering.</p>

Observation	Sandsynlige årsager	Opløsninger
Forhøjede negative kalibrator-RLU-værdier (> 200 RLU'er). Resten af analysen udføres som forventet.	<p>Detection Reagent 2 blev inkuberet ved en temperatur på over 20-25°C.</p> <p>Detection Reagent 2 blev inkuberet længere end 30 minutter.</p> <p>Kontaminering af Detection Reagent 2 eller vaskebuffer med alkalisk phosphatase eller Detection Reagent 1.</p>	<p>Kør testen igen, og sørg for, at capture- og detektionstrin inkuberes ved 20-25°C.</p> <p>Aflæs plade efter 15 minutters inkubation (og ikke senere end 30 minutters inkubation) ved 20-25°C.</p> <p>Se kontamineringskontrol i dette afsnit om problemløsning.</p>
Analyse opfylder ikke valideringskriterier. Forhøjet PC/NC-forhold	Omvendt placering af HRC og QC2-HR og/eller LRC og QC1-LR	Test prøverne igen. Læs omhyggeligt etiketterne på kalibrator- og kvalitetskontrol-prøveglassene for at undgå omvendt placering af disse reagenser.

KONTAMINERINGSKONTROL

Evalueret reagens	Kontamineringskontrolprocedure	Fortolkning af resultater
Bemærk: Vær forsigtig ved pipettering af Detection Reagent 2 for at undgå kontaminering. Brug handsker, og undgå at berøre nogen steder på pipettespidserne.		
Detection Reagent 2	<ul style="list-style-type: none"> Pipetter 75 µl med alikvotet, resterende eller originalt hætteglas med Detection Reagent 2 i en tom Capture Microplate-brønd. Inkubér ved 20-25°C i 15 minutter. Undgå direkte sollys. Indlæs Microplate-brøndene i luminometeret. <p>Bemærk: Test af Detection Reagent 2 i 3 replikater giver den optimale vurdering af ydeevnen.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Detection Reagent 2 Control skal være < 50 RLU'er. Hvis Detection Reagent 2-værdierne er < 50 RLU'er, kan Detection Reagent 2 anvendes til at gentage analysen. Hvis der er kontaminering (>50 RLU'er), skal der anskaffes et nyt kit, og analysen skal gentages.
Vaskebufferapparat og/eller vandkilde	<ul style="list-style-type: none"> Pipetter 75 µl Detection Reagent 2 i 4 separate Capture Microplate-brønde. Mærk brøndene med 1-4. Brønd 1 fungerer som Detection Reagent 2-kontrol. Pipetter 10 µl vaskebuffer fra vaskeflaske i brønd 2. Lad vaskebufferen flyde gennem vaskerøret. Pipetter 10 µl vaskebuffer fra røret i brønd 3. Tag en alikvot af det vand, som er brugt til at klargøre vaskebufferen. Pipetter 10 µl af vandet i brønd 4. Inkubér ved 20-25°C i 15 minutter. Undgå direkte sollys. Aflæs Microplate-brøndene i luminometeret. 	<ul style="list-style-type: none"> Detection Reagent 2 Control (brønd 1) skal være < 50 RLU'er. Sammenlign RLU-værdien fra brønd 2, 3 og 4 med Detection Reagent 2 kontrol RLU-værdien (brønd 1). De individuelle RLU-værdier for brønd 2, 3 og 4 må ikke overstige 50 RLU'er af Detection Reagent 2 kontrol RLU-værdi (brønd 1). Værdier, der overskrider 50 RLU'er af Detection Reagent 2-kontrol, angiver kontaminering. Se Reagensfremstilling og -opbevaring angående anvisninger til rengøring og vedligeholdelse af vaskeapparatet.
Automated Plate Washer	<ul style="list-style-type: none"> Pipetter 75 µl Detection Reagent 2 i 5 separate Capture Microplate-brønde. Mærk brøndene med 1-5. Brønd 1 fungerer som Detection Reagent 2-kontrol. Pipetter 10 µl vaskebuffer fra pladevaskeflasken mærket <i>Wash</i> i brønd 2. Pipetter 10 µl af skyllevæsken fra pladevaskeflasken mærket <i>Rinse</i> i brønd 3. Tryk på tasten Prime på pladevaskerens tastatur, og lad vaskebufferen flyde gennem rørene. Pipetter 10 µl af vaskebufferen fra renden i brønd 4. Tryk på tasten Prime på pladevaskerens tastatur, og lad skyllevæsken flyde gennem rørene. Pipetter 10 µl af vaskebufferen fra renden i brønd 5. Afdæk og inkubér i 15 minutter ved 20-25°C. Undgå direkte sollys. Aflæs Microplate-brøndene i luminometeret. 	<ul style="list-style-type: none"> Detection Reagent 2 Control (brønd 1) skal være < 50 RLU'er. Sammenlign RLU-værdien fra brønd 2, 3, 4 og 5 med Detection Reagent 2 kontrol RLU-værdien (brønd 1). De individuelle RLU-værdier for brønd 2, 3, 4 og 5 må ikke overstige 50 RLU'er af Detection Reagent 2 kontrol RLU-værdien (brønd 1). Værdier, der overstiger 50 RLU'er af DR2-kontrol, angiver kontaminering af pladevaskeren. Se <i>brugsvejledningen til Automated Plate Washer</i>, Decontamination Procedure.

QIAGEN KONTAKTINFORMATION

Brug det Kontaktinformationsark, som er vedlagt dette produkt, til at kontakte den lokale QIAGEN-repræsentant.

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

Registrerede navne, varemærker osv., som anvendes i dette dokument, må ikke betragtes som ubeskyttet af lovgivningen, selvom de ikke specifikt er mærket som sådan.

Dette produkt og dets anvendelsesmetode er dækket af en eller flere af de følgende patenter:

USA HPV-patientnr.

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

USA Hybrid Capture-patentnummer

6,228,578B1

Resumé af digene HC2 HPV DNA Test

VIGTIGT: Det er vigtig at have et grundigt kendskab til den detaljerede procedure, før dette resumé bruges.

	Procedure	
	Manuel omrystemetode	Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2-metode
DENATURERING (Der henvises til <i>digene</i> HC2-prøvekonversionskittets brugsvejledning vedr. PreservCyt Solution-prøver)	<p>Mærk hybridiseringsmikrorør. Fremstil denatureringsreagens.</p> <p>↓</p> <p>Pipetter denatureringsreagens (volumen er lig halvdelen af prøvevolumen) i kalibratorer, kvalitetskontroller og prøver. Ryst hver prøve, kalibrator og kvalitetskontrol individuelt i 5 sekunder ved høj hastighed (se brugsvejledning for nærmere oplysninger). Kontrollér, at alle rør er violette.</p> <p>↓</p> <p>Inkubér i 45 ± 5 minutter ved 65 ± 2°C.</p> <p>↓</p> <p>Fremstil HPV-probeblanding</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p>	<p>Mærk hybridiseringsplade. Fremstil denatureringsreagens.</p> <p>↓</p> <p>Pipetter denatureringsreagens (volumen er lig halvdelen af prøvevolumen) i kalibratorer, kvalitetskontroller og prøver. Kontrollér, at alle rør er violette.</p> <p>↓</p> <p>Tildæk stativ med film og låg.</p> <p>↓</p> <p>Ryst i 10 sekunder.</p> <p>↓</p> <p>Inkubér i 45 ± 5 minutter ved 65 ± 2°C.</p> <p>↓</p> <p>Fremstil HPV-probeblanding</p> <p>↓</p>
HYBRIDISERING Kombineret-probecocktail-metode	<p>Vandbadsmetode</p> <p>Bland denatureret prøve grundigt, og pipetter 75 µl i rør.</p> <p>↓</p> <p>Inkubér i 10 minutter ved 20-25°C.</p> <p>↓</p> <p>Pipetter 25 µl kombineret-probecocktail i hybridiseringsmikrorør.</p> <p>↓</p> <p>ELLER</p> <p>Bland denatureret prøve grundigt, og pipetter 75 µl i "LR"-rør. Bland denatureret prøve grundigt og pipetter 75 µl i "HR"-rør.</p> <p>↓</p> <p>Inkubér i 10 minutter ved 20-25°C.</p> <p>↓</p> <p>Pipetter 25 µl lavrisiko HPV-probeblanding i "LR"-rør. Pipetter 25 µl højrisiko HPV-probeblanding i "HR"-rør.</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>Tildæk mikrorør med pladeforseglingsfolie, og omryst Rotary Shaker I ved en indstilling på 1100 ± 100 o/m i 3 ± 2 minutter. Kontrollér, at alle rør er gule.</p> <p>↓</p> <p>Inkubér i 60 ± 5 minutter ved 65 ± 2°C. Forbered capture-mikrotiterplade</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p>	<p>Microplate Heater I-metode</p> <p>Bland denatureret prøve grundigt, og pipetter 75 µl i mikrotiterpladebrønde.</p> <p>↓</p> <p>Inkubér i 10 minutter ved 20-25°C.</p> <p>↓</p> <p>Pipetter 25 µl kombineret-probecocktail i hybridiseringsmikrotiterpladebrønde.</p> <p>ELLER</p> <p>Bland denatureret prøve grundigt og pipetter 75 µl i "LR"-mikrotiterpladebrønde og 75 µl i "HR"-mikrotiterpladebrønde.</p> <p>↓</p> <p>Inkubér i 10 minutter ved 20-25°C.</p> <p>↓</p> <p>Pipetter 25 µl lavrisiko HPV-probeblanding i "LR"-mikrotiterpladebrønde. Pipetter 25 µl højrisiko-HPV-probeblanding i "HR"-mikrotiterpladebrønde.</p> <p>↓</p> <p>Tildæk mikrotiterplade med pladelåg, og omryst Rotary Shaker I ved en indstilling på 1100 ± 100 o/m i 3 ± 2 minutter. Kontrollér, at alle rør er gule.</p> <p>↓</p> <p>Inkubér i 60 ± 5 minutter ved 65 ± 2°C. Forbered capture-mikrotiterplade.</p> <p>↓</p>
HYBRID CAPTURE	<p>Overfør indholdet fra alle hybridiseringspladebrønde eller mikrorør til den tilsvarende brønd i capture-mikrotiterpladen med en 8-kanalspipette. Tildæk med et pladelåg eller pladeforseglingsfolie. Omryst ved 1100 ± 100 o/m og 20-25°C i 60 ± 5 minutter. Tilbered vaskebuffer.</p> <p>↓</p> <p>Dekantér og tryk capture-mikrotiterplade af (se brugsvejledning for oplysninger).</p> <p>↓</p>	
HYBRID-DETEKTION	<p>Pipetter 75 µl Detection Reagent 1 i hver af capture-mikrotiterpladens brønde. Tildæk capture-mikrotiterplade med pladelåg, plastfilm eller lignende. Inkubér ved 20-25°C i 30-45 minutter. Vask pladen ved at følge den relevante metode.</p> <p>↓</p>	
VASK	<p>Manuel vask-metode</p> <p>Dekantér og tryk capture-mikrotiterpladen af (se brugsvejledning for oplysninger).</p> <p>↓</p> <p>Vask 6 gange.</p> <p>↓</p> <p>Aftryk på frugrie papirservietter</p> <p>↓</p>	<p>Automated Plate Washer-metode</p> <p>Placér pladen i pladevasker, og tryk på "START/STOP" for at begynde.</p> <p>↓</p> <p>Gå til næste trin.</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p>
SIGNAL-AMPLIFIKATION	<p>Pipetter 75 µl Detection Reagent 2 i hver af capture-mikrotiterpladens brønde. Inkubér ved 20-25°C i 15 - 30 minutter.</p> <p>↓</p>	
AFLÆSNING	<p>Aflæs capture-mikrotiterplade på DML-instrument.</p> <p>↓</p> <p>Bekræft analyse, og fortolk prøveresultater.</p>	