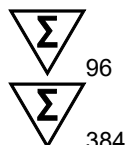


decembrie 2018

Instrucțiuni de utilizare *digene*[®] HC2 High-Risk HPV DNA Test



IVD

Un test de hibridizare a acidului nucleic in vitro cu amplificare de semnal folosind chemiluminiscență cu microplăci pentru detecția calitativă a 13 tipuri de ADN de virus papiloma uman (Human Papillomavirus, HPV) de mare risc în eșantioane cervicale și vaginale

A se utiliza cu:

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



REF

5197-1330 (kit cu 1 placă)
618111 (kit cu 4 plăci)



QIAGEN
19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874
SUA

EC REP

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
GERMANIA

1058538RO Rev. 13

Cuprins

Domeniul de utilizare.....	8
Rezumatul și explicarea produsului.....	9
Informații despre agenții patogeni	10
Principiul procedurii	10
Prepararea probelor utilizând QIASymphony SP.....	12
Prepararea probelor folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit	12
Prepararea probelor folosind QIASymphony DSP AXpH DNA Kit	13
Testarea folosind Rapid Capture System	13
Materiale furnizate.....	15
Kit cu 1 placă	15
Kit cu 4 placă	15
Conținutul kitului.....	16
Materiale necesare, dar nefurnizate	17
Echipamente și materiale pentru diagnosticare in vitro	17
Echipamente și materiale de uz general în laborator	18
Echipamente și materiale suplimentare pentru prepararea probelor de PreservCyt.....	19
Echipamente și materiale suplimentare pentru prepararea probelor de SurePath.....	19
Avertizări și precauții	20
Avertismente	20
Eșantioane	20
Azidă de sodiu	21
Buffer N2	21
Testare automatizată cu RCS.....	21
Fraze de siguranță și de risc pentru componente	22
Precauții	23
Depozitarea și manipularea reactivilor	24
Componentele kitului	24

Reactivi preparați	24
Recoltarea și prepararea probelor	25
Eșantioane cervicale și vaginale în STM	25
Biopsii cervicale	26
Eșantioane cervicale în PreservCyt Solution	26
Eșantioane cervicale în SurePath Preservative Fluid	27
Prepararea automată a probelor de eșantioane SurePath	28
Prepararea automată a probelor de tip peleți celulari post-gradient SurePath	28
Prepararea manuală a probelor de tip peleți celulari post-gradient SurePath	29
Procedură.....	30
Prepararea reactivilor.....	30
Reactiv de denaturare	32
Reactiv de denaturare 2	33
Amestec de sondă	34
Soluție tampon de spălare	35
Crearea configurației de placă	36
Prepararea probelor.....	38
Prepararea probelor de eșantioane PreservCyt folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit	38
Prepararea probelor de eșantioane SurePath și peleți celulari post-gradient SurePath folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit	39
Prepararea probelor de eșantioane PreservCyt folosind QIASymphony DSP AxpH DNA Kit	39
Prepararea manuală a probelor de eșantioane PreservCyt	39
Prepararea manuală a probelor de peleți celulari post-gradient SurePath	40
Denaturarea și hibridizarea probelor preparate folosind QIASymphony SP.....	41
Denaturarea calibratoarelor, a substanțelor de control al calității și a eluațiilor de ADN pentru testarea manuală	42
Punct de oprire opțional al eluațiilor de ADN	43
Hibridizarea eluațiilor de ADN.....	43
Denaturarea și hibridizarea eșantioanelor în STM și a probelor sub formă de peleți celulari post-gradient PreservCyt și SurePath preparate manual	44

Denaturarea calibratoarelor, a substanțelor de control al calității și a eșantioanelor în STM	44
Punctul de oprire opțional al probelor în STM preparate și al probelor sub formă de peleți celulari post-gradient PreservCyt și SurePath preparate manual.....	46
Hibridizarea probelor în STM preparate și al probelor sub formă de peleți celulari post-gradient PreservCyt și SurePath preparate manual	47
Hibridizarea folosind o microplacă și Microplate Heater I.....	47
Hibridizarea folosind microtuburi și baia de apă.....	49
Hybrid capture.....	50
Detectie hibrid	52
Spălare	53
Metoda cu Automated Plate Washer	53
Metoda de spălare manuală	54
Amplificarea semnalului	55
Măsurarea microplăcii de capturare și generarea rezultatelor	55
Interpretarea rezultatelor	56
Rezultatele testării eșantioanelor în STM	56
Rezultatele testării eșantioanelor SurePath	56
Rezultatele testării eșantioanelor PreservCyt	56
Valoare RLU/CO apropiată de 1,0	57
Alte tipuri de HPV.....	57
Verificarea calibrării testului	57
Calibrator negativ	57
Calibrator pozitiv	58
Calibrator pozitiv mediu/calibrator negativ mediu.....	58
Calculul valorii de prag.....	58
Substanțe de control al calității	58
Limitări.....	60
Caracteristici de performanță	62
Performanța clinică la screeningul pacientelor cu frotiu normal de Papanicolau este un ajutor în evaluarea riscului pentru managementul pacientelor	62

Performanță clinică la screeningul pacientelor cu rezultate de frotiu de Papanicolau ASC-US pentru a determina necesitatea trimeriei la colposcopie	66
Sensibilitate și specificitate clinică pentru determinarea riscului de boală de grad înalt la femeile cu frotiuri Papanicolau LSIL sau HSIL	69
Performanță vaginală sau autorecoltare	72
Sensibilitate analitică	73
Echivalență între tipurile de eșantioane	74
Echivalență între eșantioanele în STM și PreservCyt	74
Echivalența dintre prepararea manuală a probelor de eșantioane PreservCyt și prepararea probelor de eșantioane PreservCyt folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit	74
Echivalența dintre prepararea manuală a probelor de eșantioane PreservCyt și prepararea probelor de eșantioane PreservCyt folosind QIASymphony DSP AXpH DNA Kit	75
Echivalența dintre prepararea probelor în STM și prepararea manuală a probelor de tip peleți celulari post-gradient SurePath	75
Echivalența dintre prepararea manuală a probelor sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath și prepararea probelor de eșantioane SurePath folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit	76
Echivalența dintre prepararea manuală a probelor sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath și prepararea probelor sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit	77
Acordul între metodele de testare	78
Reproductibilitate	81
Reproductibilitatea generală a testării manuale	81
Reproductibilitatea cu eșantioane în STM clinice	82
Reproductibilitatea eșantioanelor PreservCyt clinice	85
Reproductibilitatea eșantioanelor SurePath clinice	96
Reactivitatea încrucișată	102
Hibridizarea încrucișată	103
Efectul sângelui și al altor substanțe asupra eșantioanelor în STM	104
Efectul sângelui și al altor substanțe asupra eșantioanelor în PreservCyt	104
Prepararea manuală a probelor	104

Prepararea probelor folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit	105
Prepararea probelor folosind QIASymphony DSP AXpH DNA Kit	105
Efectul sângelui și al altor substanțe asupra eșantioanelor în SurePath.....	106
Prepararea probelor SurePath folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit	106
Prepararea probelor sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit.....	107
Transfer	108
Stabilitatea reactivului pe instrument	109
Referințe.....	111
Simboluri	116
Ghid de depanare	117
Verificarea contaminării DR2	127
Verificarea contaminării aparatului de spălare și/sau a sursei de apă	127
Verificarea contaminării Automated Plate Washer	128
Date de contact	129
Modificări semnificative	130

Domeniul de utilizare

A se utiliza pentru diagnosticarea in vitro (In Vitro Diagnostic, IVD).

digene HC2 High-Risk HPV DNA Test folosind tehnologia Hybrid Capture® 2 (HC2) este un test de hibridizare a acidului nucleic cu amplificarea semnalului, utilizând chemiluminiscenta cu microplăci pentru detecția calitativă a 13 tipuri de ADN HPV de mare risc în eșantioane cervicale și vaginale.

Printre eșantioanele cervicale și vaginale care pot fi testate cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test se numără:

- Eșantioane cervicale recoltate de un medic cu *digene* HC2 DNA Collection Device
- Eșantioane vaginale auto-recoltate cu *digene* HC2 DNA Collection Device
- Biopsii recoltate în *digene* Specimen Transport Medium (STM)
- Eșantioane recoltate folosind un dispozitiv de recoltare de tip mătură sau un dispozitiv de recoltare combinat perie/spatulă, apoi plasate în PreservCyt Solution sau SurePath Preservative Fluid

Utilizarea acestei testări are următoarele indicații:

- Pentru detectarea HPV de mare risc, tipurile 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 și 68, demonstrat a fi factorul cauzal primar în dezvoltarea cancerului de col uterin.
- Ca testare inițială de screening general al populației, pentru utilizare cu sau fără frotiu de Papanicolau, pentru a identifica femeile cu risc crescut pentru dezvoltarea cancerului de col uterin sau prezența unei boli cervicale de grad înalt. Diagnosticul HPV indică din ce în ce mai mult afecțiunea de col uterin, odată cu creșterea vârstei.
- Ca testare de monitorizare a pacienților după rezultate anormale de frotiu de Papanicolau sau afecțiune de col uterin, pentru a determina necesitatea trimerii la colposcopie sau alte proceduri de monitorizare.
- Ca test de monitorizare a pacienților cu leziune intraepitelială scuamoasă de grad scăzut (Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion, LSIL) sau leziune intraepitelială scuamoasă de grad înalt (High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion, HSIL), rezultatele de frotiu de Papanicolau înainte de colposcopie. În cazul acestor paciente, un rezultat cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test va ajuta medicul în managementul pacientei, asistând la evaluarea riscului pentru femei pentru a determina absența unei boli de grad înalt.

Rezumatul și explicarea produsului

Prezența anumitor tipuri de HPV la nivelul tractului genital feminin este asociată cu o serie de boli, inclusiv condilom, papuloză bowenoidă, neoplazie intraepitelială cervicală, vaginală și vulvară și carcinom (1-3). În general, se acceptă faptul că aceste virusuri sunt cu transmitere predominant sexuală și că tipurile de HPV de mare risc reprezintă factorul de risc major recunoscut pentru dezvoltarea cancerului de col uterin (4-8).

Până în prezent, HPV nu poate fi dezvoltat în cultură in vitro, iar testările imunologice sunt inadecvate pentru a determina prezența infecției cervicale HPV. Dovezile indirecte ale infecției cu HPV anogenital pot fi obținute prin examinarea fizică și prin prezența modificărilor celulare caracteristice asociate cu replicarea virală în eșantioanele pe frotiu de Papanicolau sau eșantioanele de biopsie. În mod alternativ, biopsiile pot fi analizate prin hibridizarea acidului nucleic pentru a detecta direct prezența ADN-ului HPV.

Istoric, tipurile de HPV 16 și 18 au fost considerate tipuri asociate cancerului de mare risc (8-10). HPV tipurile 31, 33 și 35 s-au dovedit a avea o asociere intermediară cu cancerul (2, 11-14). Această asociere intermediară se datorează faptului că aceste tipuri sunt mai frecvent detectate în leziunile intraepiteliale scuamoase de grad înalt decât în cancer. Prin urmare, inducerea cancerelor din cauza prezenței acestor tipuri este mai puțin probabilă decât atunci când sunt prezente tipuri de ADN HPV de mare risc (15). Aceste 5 tipuri de HPV reprezintă împreună aproximativ 73% dintre infecțiile cu HPV (16, 17). Alte tipuri de HPV, inclusiv 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 și 68, au fost identificate drept principalele tipuri de HPV detectabile în leziunile remanente (17-27). Aceste tipuri de HPV pot fi, de asemenea, clasificate în grupuri cu risc intermediar și cu risc ridicat, pe baza distribuției relative în diferite categorii de diagnostic histopatologic (16, 17, 24-28).

ADN-ul HPV s-a dovedit a fi prezent la aproximativ 10% dintre femeile cu epiteliu cervical normal, dar prevalența reală în grupuri de femei specifice este puternic influențată de vârstă și de alte variabile demografice (2, 10, 16, 29). Studiile prospective au demonstrat că 15-28% dintre femeile testate pozitiv la ADN-ul HPV au dezvoltat leziuni intraepiteliale scuamoase (Squamous Intraepithelial Lesion, SIL) în decurs de 2 ani, comparativ cu doar 1-3 % dintre femeile testate negativ la ADN-ul HPV (30, 31). În special, riscul de progresie pentru tipurile de HPV 16 și 18 a fost mai mare (aproximativ 40%) decât pentru celelalte tipuri de HPV (30).

Informații despre agenții patogeni

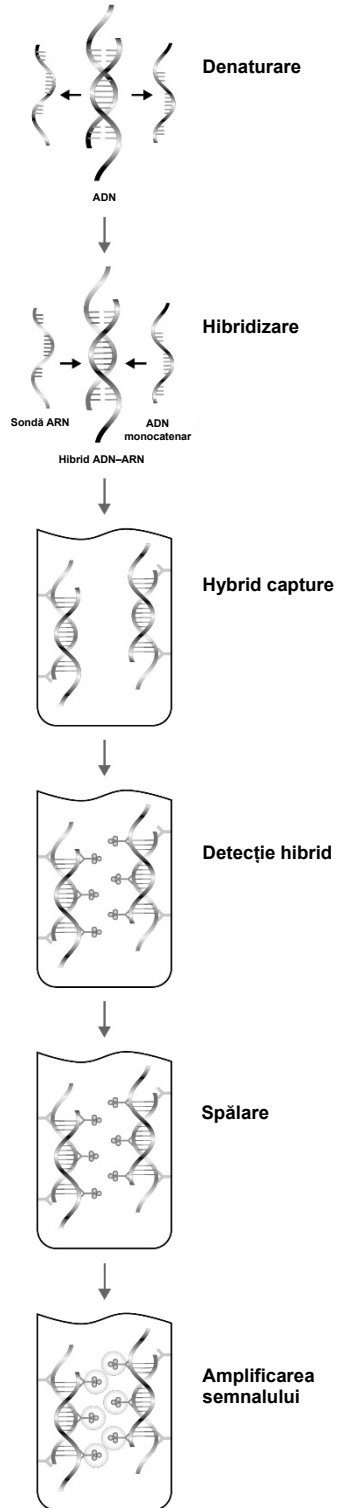
Virurile papiloma umane sunt compuse dintr-o particulă virală icosaedrică (virion) care conține o moleculă de ADN cu 8000 de perechi de baze, dublu catenară, circulară înconjurată de o capsidă proteică. În urma infecției celulelor epiteliale, ADN-ul viral se stabilește pe întreaga grosime a epitelului, dar virioni intacti se găsesc doar în straturile superioare ale țesutului. Astfel, ADN-ul viral poate fi găsit fie în virioni, fie ca secvențe de HPV epizomale sau integrale, în funcție de tipul și gradul leziunii.

Principiul procedurii

digene HC2 High-Risk HPV DNA Test, folosind tehnologia HC2, este un test de hibridizare a acidului nucleic cu amplificare a semnalului care utilizează detecția chemiluminescentă cu microplăci. Eșantioanele care conțin ADN-ul țintă hibridizează cu o sondă ARN HPV specifică. Hibrizii ARN-ADN rezultați sunt capturați pe suprafața unui godeu al microplăcii, acoperit cu anticorpi specifici pentru hibrizii ARN-ADN. Hibrizii imobilizați intră apoi în reacție cu anticorpi conjugați cu fosfatază alcalină specifică pentru hibrizii ARN-ADN și sunt detectați cu un substrat chemiluminescent. Mai multe molecule de fosfatază alcalină sunt conjugate pentru fiecare anticorp. Mai mulți anticorpi conjugați se leagă la fiecare hibrid capturat, ceea ce duce la o amplificare substanțială a semnalului. Deoarece substratul este scindat de fosfataza alcalină legată, este emisă lumină, care este măsurată ca unități relative de lumină (Relative Light Units, RLU) de un instrument *digene* Microplate Luminometer (DML). Intensitatea luminii emise indică prezența sau absența ADN-ului țintă în eșantion.

O măsurare RLU egală sau mai mare decât valoarea de prag (Cutoff, CO) a testului indică prezența secvențelor de ADN HPV de mare risc în eșantion. O măsurare RLU mai mică decât CO a testului indică absența secvențelor specifice de ADN HPV de mare risc testate sau niveluri de ADN HPV sub limita de detecție a testării.

Fluxul de lucru Hybrid Capture



Prepararea probelor utilizând QIASymphony SP

Prepararea automată a probelor de eşantioane PreservCyt poate fi efectuată folosind QIASymphony SP cu QIASymphony DSP HPV Media Kit sau QIASymphony DSP AXpH DNA Kit.

Prepararea probelor folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit

QIASymphony DSP HPV Media Kit oferă fragmente de probă pe microplaca de hibridizare, care sunt pregătite pentru testarea automatizată folosind Rapid Capture® System (RCS) cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. QIASymphony SP parcurge toate etapele procedurii de preparare a probelor pentru până la 88 de probe, în loturi de până la 24, într-o singură rulare.

QIASymphony SP procesează 88 de probe de PreservCyt în 2 ore și 15 minute, fără a fi necesară intervenția utilizatorului odată ce instrumentul este încărcat cu probe.

QIASymphony SP procesează 88 de probe de SurePath în 1 oră și 45 minute, fără a fi necesară intervenția utilizatorului odată ce instrumentul este încărcat cu probe. Prepararea probelor folosind QIASymphony SP este urmată imediat de o incubare de 90 de minute a fragmentelor de probă în microplaca de hibridizare pe un radiator pentru microplăci. În timpul incubării fragmentelor de probă, calibratoarele și substanțele de control al calității sunt denaturate separat într-o baie de apă, fiind apoi pipetate manual în prima coloană a microplăcii de hibridizare după ce incubarea fragmentelor de probă este completă. Prepararea probelor de eşantioane SurePath cu QIASymphony SP și QIASymphony DSP HPV Media Kit poate avea loc fie înainte de începerea procesării probelor citologice, fie după terminarea procesării probelor citologice.

Important: Fragmentele de probă produse ca urmare a preparării probelor de eşantioane PreservCyt și SurePath folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit pot fi testate numai folosind RCS. Realizarea manuală a testării cu fragmente de probă nu este validată.

Când efectuați prepararea automată a probelor folosind QIASymphony, consultați manualele de utilizare QIASymphony aplicabile și *Instrucțiunile de utilizare (manualul) QIASymphony DSP HPV Media Kit*, pe lângă aceste instrucțiuni de utilizare, pentru informațiile procedurale și descriptive necesare.

Prepararea probelor folosind QIASymphony DSP AXpH DNA Kit

QIASymphony DSP AXpH DNA Kit oferă eluați de ADN pe microplaca de hibridizare care sunt pregătite pentru testarea manuală sau automatizată prin RCS cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. QIASymphony SP parcurge toate etapele procedurii de preparare a probelor pentru până la 88 de probe, în loturi de până la 24, într-o singură rulare. QIASymphony SP procesează 88 de probe în 4 ore și 30 de minute, fără a fi necesară intervenția utilizatorului odată ce instrumentul este încărcat cu probe.

Când efectuați prepararea automată a probelor folosind QIASymphony, consultați manualele de utilizare QIASymphony aplicabile și *Manualul QIASymphony DSP AXpH DNA Kit*, pe lângă aceste instrucțiuni de utilizare, pentru informațiile procedurale și descriptive necesare.

Testarea folosind Rapid Capture System

Testarea pe o cantitate mare de probe cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test poate fi efectuată folosind RCS. Kitul cu 4 plăci (nr. cat. 618111) poate fi utilizat doar cu RCS și nu poate fi utilizat pentru testarea manuală.

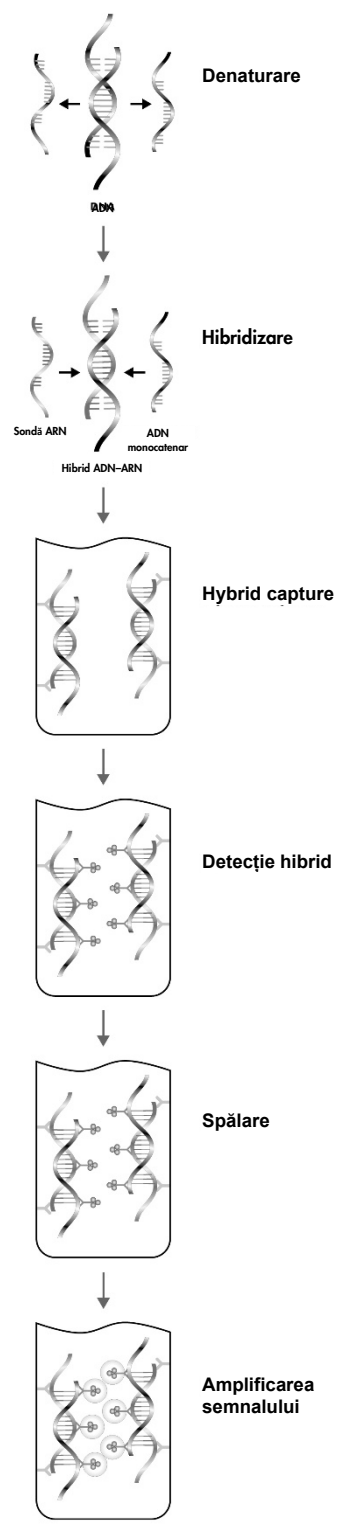
RCS este un sistem automat de pipetare și diluare de uz general, care poate fi utilizat cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test pentru testarea pe o cantitate mare de probe. Acest sistem procesează până la 352 de eșantioane în 8 ore, inclusiv o perioadă de 3,5 ore în care nu este necesară intervenția utilizatorului; până la 704 de rezultate ale eșantioanelor pot fi generate în 13 ore.

Prepararea probelor se efectuează independent de RCS înainte de plasarea pe platforma RCS. În plus, detectarea semnalului chemiluminescent și raportarea rezultatelor se realizează folosind un instrument DML offline comun atât testării manuale, cât și testării automatizate cu RCS.

Fiecare dintre etapele *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test se efectuează în secvența exactă ca cea a testării manuale. RCS permite procesarea decalată a până la 4 microplăci, fiecare microplacă conținând probe și calibratoarele de testare necesare și substanțele necesare de control al calității.

La efectuarea testării automatizate cu RCS, consultați *Manualul de utilizare Rapid Capture System* și *Manualul de utilizare Rapid Capture System – Efectuarea testărilor digene HC2 DNA Test folosind probe procesate pe QIASymphony SP*, pe lângă aceste instrucțiuni de utilizare, pentru informațiile procedurale și descriptive necesare.

Fluxul de lucru Hybrid Capture



Prepararea manuală a probelor

Automatizată pe Rapid Capture System

Materiale furnizate

Kit cu 1 placă

Există 96 de testări în *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test cu 1 placă (nr. cat. 5197-1330).

Atunci când efectuați testarea manuală folosind kitul cu 1 placă, cel mai mic număr de testări recomandat pentru fiecare utilizare este de 24. Dacă se doresc mai puțin de 24 de testări pe utilizare, numărul total de testări pe kit poate fi redus din cauza volumelor limitate ale reactivilor. Numărul rezultatelor pacientei va varia, în funcție de numărul de utilizări pe kit, după cum se specifică mai jos:

Număr de utilizări	Număr de rezultate ale pacientei
1	88
2	80
3	72
4	64

Atunci când efectuați testări automatizate pe RCS cu kitul cu 1 placă, utilizarea kitului complet impune testarea unei microplăci complete (88 de probe) pentru fiecare rulare pe RCS. Testarea unei microplăci parțiale este acceptabilă; cu toate acestea, întregul kit este utilizat din cauza volumului golurilor necesar pentru operarea instrumentului.

Kit cu 4 plăci

Există 384 de testări în *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test cu 4 plăci (nr. cat. 618111).

Kitul cu 4 plăci poate fi utilizat doar pentru testarea automatizată pe RCS. Pentru a obține 384 de teste, kitul cu 4 plăci trebuie utilizat în 1 sau 2 rulări pe RCS. Dacă se doresc mai mult de 2 rulări, numărul total de testări pe kit poate fi redus din cauza volumelor limitate ale reactivilor.

Conținutul kitului

<i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA Test		
Număr de catalog	5197-1330	618111
Număr de testări	96	384
Indicator Dye (colorant indicator) conține azidă de sodiu 0,05% (m/v)	0,35 ml	2,0 ml
Denaturation Reagent (Reactiv de denaturare)* Soluție de hidroxid de sodiu (NaOH) diluată	50 ml	2 × 100 ml
Probe Diluent (Diluant pentru sondă)* Soluție tamponată cu 0,05% (m/v) azidă de sodiu	5 ml	20 ml
High-Risk HPV Probe (Sondă HPV de mare risc) Sondă HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 și 68 ARN în soluție tamponată (capac roșu)	200 µl	3 x 200 µl
Low-Risk HPV Quality Control (Substanță de control al calității HPV cu risc scăzut) 5 pg/ml (500.000 copii/ml) ADN HPV 6 clonat și ADN de transport în STM cu 0,05% (m/v) azidă de sodiu.	1 ml	1 ml
High-Risk HPV Quality Control (Substanță de control al calității HPV de mare risc) 5 pg/ml (500.000 copii/ml) ADN HPV 6 clonat și ADN de transport în STM cu 0,05% (m/v) azidă de sodiu	1 ml	1 ml
Negative Calibrator (Calibrator negativ) ADN de transport în STM cu 0,05% (m/v) azidă de sodiu	2 ml	2 ml
High-Risk HPV Calibrator (Calibrator HPV de mare risc) 1 pg/ml ADN HPV 16 clonat și ADN de transport în STM cu 0,05% (m/v) azidă de sodiu	1 ml	2 ml
Capture Microplate (Microplacă de captură) Acoperită cu anticorpi hibrid policlonali anti-ARN-ADN (capră)	1	4
Detection Reagent 1 (Reactiv de detecție 1) Anticorpi conjugați cu fosfatază alcalină la hibrizi ARN-ADN în soluție tamponată cu 0,05% (m/v) azidă de sodiu	12 ml	40 ml
Detection Reagent 2 (Reactiv de detecție 1) CDP-Star® cu Emerald II (substrat chemiluminescent)	12 ml	40 ml
Wash Buffer Concentrate (Concentrat soluție tampon de spălare)* Conține 1,5% (m/v) azidă de sodiu	100 ml	2 × 100 ml

* Consultați „Avertizări și precauții”, pagina 20, pentru informații privind sănătatea și securitatea.

Materiale necesare, dar nefurnizate

Important: Asigurați-vă că instrumentele utilizate în această procedură au fost verificate și calibrate în conformitate cu recomandările producătorului.

Echipamente și materiale pentru diagnosticare in vitro

La QIAGEN sunt disponibile doar echipamentele și materialele validate cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

- *digene* Hybrid Capture 2 System („*digene* HC2 System”), constând într-un luminometru aprobat de QIAGEN („instrument DML”), computer personal aprobat de QIAGEN și periferice de computer aprobate de QIAGEN (monitor, tastatură, mouse, imprimantă și cablu de imprimantă), *digene* HC2 System Software („software *digene* pentru analiza testelor”), protocoale *digene* HC2 System Assay pentru HPV, LumiCheck Plate Software și Manualul de utilizare *digene* HC2 System
- 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 (opțional)*
- Conversion Rack and Lid (opțional)*
- *digene* Specimen Rack and Lid (opțional)*
- Pipetă și suport EXPAND-4 (opțional)†
- Dozator de sigilare a tuburilor și dispozitiv de tăiere (opțional, utilizat împreună cu MST Vortexer 2)
- Rapid Capture System (necesar pentru utilizarea cu kitul cu 4 plăci; opțional pentru kitul cu 1 placă)
- Aparat de spălare
- Microplăci de hibridizare
- Capace microplăci
- Bandelele godeu microplacă RCS*
- Compartimente reactiv RCS*
- Capace compartimente reactiv RCS*
- Vârfuri de unică folosință RCS*
- Capace drop-on RCS*

* Necesari pentru efectuarea testării automatizate pe RCS.

† Articol personalizat utilizat pentru transferul probelor STM pe microplaca de hibridizare. Pot fi folosite și alte pipete personalizate, extensibile, cu mai multe canale, cu condiția ca distanța dintre vârfuri de 3,2 cm să poată fi atinsă la extindere.

- Buffer N2*
- Buffer D2*
- Soluție de spălare albastră RCS†
- Vârfuri de pipete ultra lungi
- Tuburi de recoltare a eșantioanelor
- Suport pentru tuburi de recoltare a eșantioanelor
- Capace cu filet pentru tuburi de recoltare a eșantioanelor
- Rezervoare de reactiv de unică folosință
- Folie de sigilare a tuburilor DuraSeal™
- Microtuburi de hibridizare‡
- Suport pentru microtuburi‡
- Dispozitive de sigilare a plăcilor‡

Echipamente și materiale de uz general în laborator


- Baie de apă de 65 ± 2 °C, cu o dimensiune suficientă pentru a integra un suport pentru eșantioane (21 cm lățime x 32 cm adâncime x 18 cm înălțime)
- Microcentrifugă
- Agitator vortex cu pahar accesoriu
- Pipetă cu un singur canal; setări variabile pentru volumele de 20-200 μ l și 200-1000 μ l
- Pipetă cu dislocuire pozitivă recurentă, cum ar fi pipeta Eppendorf® Repeater®
- Pipetă cu 8 canale: setări variabile pentru volumele de 25-200 μ l
- Temporizator
- Soluție de hipoclorit de sodiu, 0,5% v/v
- Parafilm® sau echivalent
- Vârfuri de pipete de unică folosință cu barieră de aerosoli pentru pipetă cu un singur canal (20-200 μ l și 200-1000 μ l)
- Vârfuri de unică folosință pentru pipetă cu dislocuire pozitivă recurentă (12,5, 5, 2,5 și 1,25 ml)
- Vârfuri de unică folosință pentru pipetă cu 8 canale (25-200 μ l)
- Prosoape Kimtowels® sau prosoape din hârtie echivalente cu conținut redus de scame
- Husă de unică folosință pentru banc
- Mănuși de unică folosință fără pulbere
- Eprubete din polipropilenă de 5 ml și/sau 15 ml cu capac cu închidere prin apăsare și cu fund rotund
- Suport pentru eprubete pentru integrarea eprubetelor de 10 sau 15 ml
- Eprubete conice din polipropilenă, de 50 ml


* Necesară pentru efectuarea testării cu probe preparate folosind QIAsymphony DSP AXpH DNA Kit.


† Necesară pentru testarea automatizată cu RCS a probelor procesate cu ajutorul QIAsymphony DSP HPV Media Kit.

‡ Necesară pentru efectuarea hibridizării folosind microtuburi și baie de apă.


Echipeamente și materiale suplimentare pentru prepararea probelor de PreservCyt

 Consultați *Instrucțiunile de utilizare (manualul) QIASymphony DSP HPV Media Kit* pentru prepararea automată a probelor folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit.

 Consultați *Manualul QIASymphony DSP AXpH DNA Kit* pentru prepararea automată a probelor folosind kitul QIASymphony DSP AXpH DNA Kit.

 Consultați instrucțiunile de utilizare *digene HC2 Sample Conversion Kit* pentru prepararea manuală a probelor.

Echipeamente și materiale suplimentare pentru prepararea probelor de SurePath

 Consultați *Instrucțiunile de utilizare (manualul) QIASymphony DSP HPV Media Kit* pentru prepararea automată a probelor folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit.

Prepararea manuală a probelor de SurePath necesită următoarele echipamente și materiale suplimentare:

- Centrifugă cu găleată basculantă, capabilă să atingă $800 \pm 15 \times g$ și să susțină tuburi conice de 15 ml pentru centrifugă, din polipropilenă
- *digene* HC2 Sample Conversion Tubes sau tuburi din polipropilenă de 15 ml VWR® sau Corning®

Important: *digene* HC2 Sample Conversion Tubes disponibile de la QIAGEN trebuie utilizate cu MST Vortexer 2 sau cu RCS.

- Pipete de transfer cu vârful standard de 7 ml sau echivalent
- *digene* Specimen Transport Medium

Avertizări și precauții

A se utiliza pentru diagnosticarea in vitro.

Citiți cu atenție toate instrucțiunile înainte de a utiliza testul.

Avertismente

Atunci când lucrați cu substanțe chimice, purtați întotdeauna un halat de laborator, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție adecvate. Pentru informații suplimentare, vă rugăm să consultați fișele cu date de securitate (FDS) corespunzătoare. Acestea sunt disponibile online într-un format PDF ușor de utilizat și compact, la adresa www.qiagen.com/safety unde puteți găsi, vizualiza și tipări fișa cu date de securitate a fiecărui kit QIAGEN și a fiecărei componente a kitului.

Eșantioane

ATENȚIE Risc de agenți infecțioși



Eșantioanele pot conține agenți infecțioși și trebuie manipulate în consecință. Considerați că toate eşantioanele sunt potențial infecțioase.

Nicio metodă de testare cunoscută nu poate oferi o asigurare completă că eşantioanele nu vor transmite infecții. Se recomandă ca eşantioanele de proveniență umană să fie manipulate în conformitate cu practicile naționale și locale de biosecuritate aplicabile. Aplicați aceste practici de biosecuritate la materiale care conțin sau sunt suspectate că ar conține agenți infecțioși.

Aceste precauții includ, dar nu se limitează la următoarele:

- Nu pipetați prin intermediul cavității bucale.
- Nu fumați, nu consumați alimente sau băuturi în zonele în care se manipulează reactivi sau eşantioane.
- Purtați mănuși de unică folosință fără pudră în timpul manipulării reactivilor sau a eşantioanelor. Spălați-vă bine pe mâini după efectuarea testării.
- Curățați și dezinfectați toate scurgerile de eşantioane folosind un dezinfectant tuberculucid, cum ar fi 0,5% v/v hipoclorit de sodiu sau alt dezinfectant adecvat (32, 33).
- Decontaminați și eliminați toate eşantioanele, reactivii și alte materiale potențial contaminate în conformitate cu reglementările naționale și locale.

După denaturare și incubare, eşantioanele nu mai sunt considerate infecțioase (34); cu toate acestea, personalul laboratorului trebuie să respecte în continuare precauțiile naționale și locale.

Azidă de sodiu

Unii reactivi conțin azidă de sodiu. Azida de sodiu a fost raportată ca formând azidă de plumb sau de cupru în instalațiile de laborator. Aceste azide pot exploda la percuție, cum ar fi baterea cu ciocanul. Pentru a preveni formarea de azidă de plumb sau de cupru, spălați bine scurgerile cu apă după eliminarea soluțiilor care conțin azidă de sodiu. Pentru a elimina contaminarea din scurgerile vechi, suspectate de acumularea de azidă, Administrația pentru Sănătate și Siguranță Ocupațională din SUA (Occupational Safety and Health Administration) recomandă următoarele:

1. Sifonați lichidul din captator folosind un furtun din cauciuc sau din plastic.
2. Umpleți cu soluție de hidroxid de sodiu 10% v/v.
3. Lăsați să acționeze timp de 16 ore.
4. Clătiți bine cu apă.

Buffer N2

ATENȚIE Risc de compuși cu reactivitate ridicată



Nu adăugați soluții de albire sau soluții acide direct în soluția sau deșeurile care conțin Buffer N2.

Buffer N2 conține clorhidrat de guanidină, care, în combinație cu soluțiile de albire, pot forma compuși cu reactivitate ridicată.

Dacă lichidul care conține soluția tampon se varsă, curățați cu un detergent adecvat pentru laborator și cu apă. Dacă lichidul vărsat conține agenți potențial infecțioși, curățați mai întâi zona afectată cu detergent pentru laborator și cu apă, iar apoi cu hipoclorit de sodiu 1% (v/v).

Testare automatizată cu RCS

Consultați *Manualul de utilizare Rapid Capture System* pentru avertizări și precauții suplimentare specifice utilizării sistemului respectiv pentru testarea pe o cantitate mare de probe.

Fraze de siguranță și de risc pentru componente

Următoarele fraze de risc și siguranță se aplică pentru componentele kitului *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test:

Reactiv de denaturare



Conține: hidroxid de sodiu. Pericol! Poate fi corosiv pentru metale. Provoacă arsuri grave ale pielii și lezarea ochilor. Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/ochelari de protecție/mască de protecție. ÎN CAZ DE CONTACT CU OCHII: Clătiți cu atenție cu apă, timp de mai multe minute. Scoateți lentilele de contact, dacă este cazul și dacă acest lucru se poate face cu ușurință. Continuați să clătiți. Sunați imediat la un CENTRU DE INFORMARE TOXICOLOGICĂ sau la un medic.

Calibrator HPV de mare risc

Avertisment! Provoacă iritarea ușoară a pielii. Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/ochelari de protecție/mască de protecție.

Substanță de control al calității HPV de mare risc

Avertisment! Provoacă iritarea ușoară a pielii. Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/ochelari de protecție/mască de protecție.

Substanță de control al calității HPV cu risc scăzut

Avertisment! Provoacă iritarea ușoară a pielii. Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/ochelari de protecție/mască de protecție.

Calibrator negativ

Avertisment! Provoacă iritarea ușoară a pielii. Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/ochelari de protecție/mască de protecție.

Diluant pentru sondă



Conține: acid acetic; acid poliacrilic. Pericol! Provoacă arsuri grave ale pielii și lezarea ochilor. Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/ochelari de protecție/mască de protecție. ÎN CAZ DE CONTACT CU OCHII: Clătiți cu atenție cu apă, timp de mai multe minute. Scoateți lentilele de contact, dacă este cazul și dacă acest lucru se poate face cu ușurință. Continuați să clătiți. Sunați imediat la un CENTRU DE INFORMARE TOXICOLOGICĂ sau la un medic.


Concentrat soluție tampon de spălare



Conține: azidă de sodiu. Avertisment! Nociv în caz de înghițire. Nociv pentru mediul acvatic cu efecte pe termen lung. Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/ochelari de protecție/mască de protecție.

Precauții

Utilizatorul trebuie să respecte întotdeauna următoarele precauții atunci când efectuează *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test:

- Nu folosiți reactivii după data de expirare indicată în dreptul simbolului  de pe eticheta cutiei exterioare sau data de expirare a reactivilor preparați.
- Efectuarea testării în afara intervalelor de timp și de temperatură prevăzute poate produce rezultate nevalide. Testările care nu se încadrează în intervalele de timp și temperatură stabilite sunt nevalide și trebuie repetate.
- Procedura *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, calibrarea testului, substanța de control al calității și interpretarea rezultatelor eșantioanelor trebuie urmate îndeaproape pentru a obține rezultate fiabile ale testării.
- Este important să pipetați volumul exact de reactiv indicat și să amestecați bine după fiecare adăugare de reactiv. În caz contrar, se pot obține rezultate eronate ale testării. Dacă vă veți asigura că apar modificările de culoare notate, veți putea confirma dacă aceste condiții au fost îndeplinite.
- Cu excepția concentratului de soluție tampon pentru spălare, componentele kitului au fost testate per ansamblu. Nu interschimbați componente din alte surse sau din loturi diferite. Cu toate acestea, este acceptabil să se combine componente din kituri cu același număr de lot pentru a avea volumele de reactiv necesare pentru testarea mai multor microplăci într-o singură rulare pe RCS.
- Acizii nucleici sunt foarte sensibili la degradarea nucleazei din mediu. Nucleazele sunt prezente pe pielea umană și pe suprafețele sau materialele manipulate de oameni. Curățați și acoperiți suprafețele de lucru cu o husă de unică folosință pentru banc și purtați mănuși fără pudră atunci când parcurgeți toate etapele de testare.
- Asigurați-vă că preveniți contaminarea microplăcilor de captură și a Detection Reagent 2 (DR2) cu fosfatază alcalină exogenă în timpul efectuării testării. Substanțele care pot conține fosfatază alcalină includ Detection Reagent 1 (DR1), bacterii, salivă, păr și grăsimi de pe piele. Acoperirea microplăcii de capturare după etapa de spălare și în timpul incubării DR2 este deosebit de importantă, deoarece fosfatazele alcaline exogene pot reacționa cu DR2, producând rezultate fals-pozitive.
- Protejați DR2 împotriva expunerii îndelungate la lumina directă. Folosiți DR2 imediat după separarea în părți alicote și evitați lumina directă a soarelui.
- Amorsați pipeta de repetare înainte de administrarea reactivului și verificați periodic dacă se formează bule mari de aer. Cantitățile excesive de bule mari de aer în vârful pipetei de repetare pot genera administrări inexacte și pot fi evitate prin umplerea pipetei, distribuirea întregului lichid și reumplere. Consultați manualul de utilizare a pipetei pentru instrucțiuni specifice de utilizare.

- Efectuați o pipetare cu mai multe canale folosind tehnica de pipetare inversă (consultați „Detectie hibrid”, pagina 52) pentru distribuirea DR1 și DR2. Verificați fiecare vârf de pipetă de pe pipeta cu mai multe canale pentru o potrivire și umplere corecte.
- Asigurați-vă că fiecare godeu al microplăcii de capturare este spălat temeinic (consultați „Spălare”, pagina 53). Spălarea necorespunzătoare va duce la creșterea fundalului și poate genera rezultate fals-pozitive. Soluția tampon de spălare reziduală din godeurile microplăcii de capturare poate duce la un semnal redus sau o reproductibilitate slabă.

Depozitarea și manipularea reactivilor

Componentele kitului

După primire, depozitați kitul la 2-8 °C. Concentratul soluției tampon de spălare, reactivul de denaturare și colorantul indicator pot fi depozitate la 2-30 °C, după cum doriți. Toți reactivii sunt furnizați gata de utilizare, cu excepția reactivului de denaturare (Denaturation Reagent, DNR), amestecului de sondă și a soluției tampon de spălare.

Reactivi preparați

Odată preparat, DNR este stabil timp de 3 luni la 2-8 °C.

Odată preparată, soluția tampon pentru spălare este stabilă timp de 3 luni la 2-30 °C.

Dacă testați probele de PreservCyt procesate folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit sau QIASymphony DSP AXpH DNA Kit, calibratoarele deschise, nendenurate și substanțele de control al calității sunt stabile timp de 3 luni la 2-8 °C.

Dacă testați probele procesate folosind QIASymphony DSP AXpH DNA Kit, reactivul de denaturare preparat (Denaturation Reagent 2, DNR2) este stabil timp de 8 ore la 15-30 °C.

Recoltarea și prepararea probelor

Recoltați și transportați eșantioanele cervicale și vaginale pentru testarea cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test folosind unul dintre următoarele dispozitive de prelevare:

- *digene* HC2 DNA Collection Device (constând dintr-o perie cervicală și STM)
- Biopsii recoltate în *digene* STM
- Un dispozitiv de recoltare de tip mătură sau o combinație de dispozitive de recoltare cu perie/spatulă, amplasate în PreservCyt Solution sau SurePath Preservative Fluid

Eșantioanele recoltate cu alte dispozitive de prelevare sau transportate în alte medii de transport nu au fost calificate pentru a fi utilizate cu această testare. Caracteristicile de performanță ale acestei testări au fost stabilite doar cu kiturile de recoltare indicate.

digene HC2 DNA Collection Device nu trebuie folosit la femei însărcinate. Eșantioanele cervicale trebuie recoltate înainte de aplicarea acidului acetic sau a iodului, dacă se efectuează examinarea prin colposcopie. Consultați instrucțiunile de utilizare *digene* HC2 DNA Collection Device pentru procedurile suplimentare de recoltare și manipulare a eșantioanelor.

Eșantioanele cervicale și vaginale recoltate în STM nu necesită conversia probelor înainte de testarea cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Eșantioanele PreservCyt și SurePath necesită conversia probelor înainte de testarea cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Eșantioane cervicale și vaginale în STM

Important: Nu recoltați un eșantion cervical sau vaginal în STM dacă există concentrații mari de cremă antifungică, gel contraceptiv sau gel de duș contraceptiv.

Eșantioanele în STM pot fi păstrate până la 2 săptămâni la temperatura camerei și expediate fără refrigerare către laboratorul de testare. Expediați eșantioane într-un recipient izolat, folosind fie un furnizor cu livrarea peste noapte, fie un furnizor cu livrarea în 2 zile.

La laboratorul de testare, depozitați eșantioanele la 2-8 °C, dacă testarea va fi efectuată în termen de 1 săptămână. Dacă testarea va fi efectuată mai târziu de 1 săptămână, acoperiți capacele eprubetelor pentru eșantioane cu Parafilm și depozitați eșantioanele la -20 °C, timp de până la 3 luni. Când scoateți eșantioanele din congelator pentru testare, înlocuiți imediat capacele cu capace cu filet pentru eprubete de recoltare a eșantioanelor.

În STM a fost adăugat un conservant pentru a întârzia dezvoltarea bacteriilor și pentru a păstra integritatea ADN-ului. Acesta nu este destinat păstrării viabilității organismelor sau a celulelor.

Biopsii cervicale

Biopsiile cervicale recent recoltate, cu o secțiune de până la 5 mm, pot fi testate cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Nu folosiți biopsii cu diametrul mai mic de 2 mm. Amplasați imediat eșantionul de biopsie în 1,0 ml de STM, acoperiți capacul eprubetei pentru eșantion cu Parafilm pentru a preveni ieșirea capacului și depozitați în stare congelată, la -20 °C. Expediați eșantioanele de biopsie la 2-30 °C cu livrare peste noapte către laboratorul de testare.

La laboratorul de testare, păstrați la -20 °C până la procesare. Când scoateți eșantioanele din congelator pentru testare, înlocuiți imediat capacele cu capace cu filet pentru eprubete de recoltare a eșantioanelor.

Eșantioane cervicale în PreservCyt Solution

Important: Nu recoltați un eșantion cervical PreservCyt pentru prepararea probelor cu QIASymphony DSP HPV Media Kit dacă există concentrații mari de cremă antifungică, gel pentru lubrifiere vaginală sau sânge.

Important: Nu recoltați un eșantion cervical PreservCyt pentru prepararea probelor cu QIASymphony DSP AXpH DNA Kit, dacă există gel contraceptiv.

Recoltați eșantioanele ca de obicei și preparați lamelele ThinPrep® pentru testul Papanicolau în conformitate cu instrucțiunile de utilizare furnizate de producător.

După recoltare, depozitați eșantioanele PreservCyt timp de maximum 3 luni la 2-30 °C înainte de prepararea probelor pentru *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Eșantioanele PreservCyt nu pot fi congelate.

Pentru prepararea probelor sunt disponibile următoarele metode:

- Prepararea automată a probelor folosind QIASymphony SP și QIASymphony DSP HPV Media Kit
Rezultatul este un fragment de probă (care conține particule magnetice, STM și DNR) care este pregătit pentru a trece la etapa de denaturare a testării.
- Prepararea automată a probelor folosind QIASymphony SP și QIASymphony DSP AXpH DNA Kit
Rezultatul este un eluat ADN pregătit pentru a trece la etapa de denaturare a testării.
- Prepararea manuală a probelor folosind *digene* HC2 Sample Conversion Kit
Rezultatul preparării manuale a probelor este o probă denaturată pregătită pentru a trece la etapa de hibridizare a testării.

Cerințele privind volumul eșantionului se bazează pe metoda de preparare a probelor, după cum urmează:

- Prepararea automată a probelor folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit necesită 3 ml de eșantion
- Prepararea automată a probelor folosind QIASymphony DSP AXpH DNA Kit necesită 4 ml de eșantion
- Prepararea manuală a probelor folosind *digene* HC2 Sample Conversion Kit necesită cel puțin 4 ml de eșantion

Eșantioanele cu un volum mai mic decât cel necesar al eșantionului după pregătirea testului Papanicolau conțin material insuficient pentru testare și ar putea genera un rezultat fals-negativ în *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Eșantioane cervicale în SurePath Preservative Fluid

Important: Nu recoltați un eșantion cervical SurePath pentru prepararea probelor cu QIASymphony DSP HPV Media Kit dacă există gel contraceptiv, cremă antifungică sau cremă antiinflamatoare.

Recoltați eșantioane în SurePath Preservative Fluid conform instrucțiunilor de utilizare aplicabile.

Prepararea probelor de eșantioane SurePath poate avea loc fie înainte de începerea procesării probelor citologice, fie după terminarea procesării probelor citologice.

Înainte de a începe procesarea probelor citologice utilizați o probă din eșantionul original SurePath care nu a fost procesată folosind nicio altă metodă de diagnosticare, inclusiv BD PrepMate® System și BD PrepStain® Slide Processor. În instrucțiunile de utilizare de față, aceste probe sunt denumite „probe SurePath” pentru a înlătura confuzia.

După terminarea procesării probelor citologice, utilizați o probă din peleții celulari post-gradient rămași, după ce a fost preparat un eșantion SurePath conform instrucțiunilor corespunzătoare pentru BD PrepMate System și BD PrepStain Slide Processor. În instrucțiunile de utilizare de față, aceste probe sunt denumite „probe de tip peleți celulari post-gradient SurePath” pentru a înlătura confuzia.

Pentru prepararea probelor sunt disponibile următoarele metode:

- Prepararea automată a probelor SurePath folosind QIASymphony SP și QIASymphony DSP HPV Media Kit.

Rezultatul este un fragment de probă denaturat (care conține particule magnetice, STM și DNR) care este pregătit pentru a trece la etapa de hibridizare a testării.

- Prepararea automată a probelor sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath folosind QIASymphony SP și QIASymphony DSP HPV Media Kit.

Rezultatul este un fragment de probă denaturat (care conține particule magnetice, STM și DNR) care este pregătit pentru a trece la etapa de hibridizare a testării.

- Prepararea manuală a probelor de tip peleți celulari post-gradient SurePath .

Rezultatul preparării manuale a probelor este o probă denaturată pregătită pentru a trece la etapa de hibridizare a testării.

Cerințele privind volumul probei se bazează pe metoda de preparare a probelor, după cum urmează:

- Prepararea automată a probelor folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit necesită 950 μl
- Prepararea manuală a probelor necesită 2,8 ml de peleți celulari post-gradient SurePath

Utilizarea unui volum mai mic decât volumul necesar poate genera un rezultat fals-negativ în *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Prepararea automată a probelor de eșantioane SurePath

După recoltare, depozitați eșantioanele SurePath timp de maximum 4 săptămâni la 5-25 °C înainte de prepararea probelor folosind QIASymphony SP și QIASymphony DSP HPV Media Kit. Eșantionul SurePath utilizat nu trebuie să fi fost procesat folosind nicio altă metodă de diagnosticare, inclusiv BD PrepMate și BD PrepStain Slide Processor. Prepararea automată a probelor necesită 950 μl de eșantion SurePath.

Prepararea automată a probelor de tip peleți celulari post-gradient SurePath

Important: Imediat după prepararea lamelei pentru Papanicolau SurePath, pipetați 2,0 ml de SurePath Preservative Fluid în tubul centrifugei care conține peletul celular post-gradient. Această acțiune conservă integritatea peletilor celulari post-gradient pentru efectuarea *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Peletul celular post-gradient cu SurePath Preservative Fluid poate fi depozitat timp de maximum 4 săptămâni la 5-25 °C înainte de prepararea probelor pentru *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Prepararea automată a probelor necesită 950 μl de pelet celular post-gradient SurePath.

Prepararea manuală a probelor de tip peleți celulari post-gradient SurePath

Important: Imediat după prepararea lamei pentru Papanicolau SurePath, pipetați 2,0 ml de SurePath Preservative Fluid în tubul centrifugei care conține peletul celular rezidual. Această acțiune conservă integritatea peleiților celulari post-gradient pentru efectuarea *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Peletul celular post-gradient cu SurePath Preservative Fluid poate fi depozitat timp de maximum 4 săptămâni la 2-30 °C înainte de prepararea probelor pentru *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Eșantioanele SurePath sub formă de peleți celulari post-gradient sunt preparate după cum se specifică în aceste instrucțiuni de utilizare. Rezultatul preparării manuale a probelor este o probă denaturată pregătită pentru a trece la etapa de hibridizare a testării.

Procedură

Operațiuni care trebuie executate înainte de începere

- Pentru testarea manuală, lăsați să treacă cel puțin 60 de minute pentru ca Microplate Heater I să se echilibreze la $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ de la pornirea la rece. Nerespectarea timpului pentru această perioadă de încălzire poate duce la topirea microplăcii de hibridizare. Consultați *Manualul de utilizare Microplate Heater I* pentru instrucțiuni suplimentare.
- Dacă utilizați o baie de apă în timpul etapelor de denaturare și hibridizare, asigurați-vă că baia de apă este la $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ și nivelul apei este adecvat pentru a scufunda întregul volum al eșantionului în tub.

Prepararea reactivilor

- Scoateți de la frigider eșantioanele și toți reactivii necesari înainte de începerea testării. Lăsați-le să ajungă la $20\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ timp de 15-30 de minute. Preparați probele PreservCyt și SurePath înainte de a aclimatiza orice eșantioane și reactivi denaturați anterior la temperatura camerei.
- În cazul în care combinați reactivii gata de utilizare pentru o rulare pe RCS cu mai multe plăci, amestecați bine flacoanele individuale, apoi combinați volumul de reactiv aplicabil într-o eprubetă conică, de unică folosință, din polipropilenă.
- Pentru testarea manuală, reactivii pentru soluție tampon de spălare și amestec de sondă sunt preparați în timpul etapelor respective ale testării. Pentru testarea automată pe RCS, toți reactivii sunt preparați înainte de începerea rulării pe RCS și amplasați pe platforma RCS.
- Preparați DNR și DNR2, după caz, înainte de a prepara alți reactivi.
- Aruncați toți reactivii preparați (cu excepția cazului în care se specifică altfel) și părțile alicote de reactiv la sfârșitul testării.
- Utilizați Tabelele 1-5 de mai jos pentru a stabili volumul necesar pentru fiecare reactiv, pe baza numărului de testări/microplăci și a metodei de testare. Volumele pentru testarea automată pe RCS includ volumul de goluri din reactiv, necesar pentru instrument.

Tabel 1. Volumele necesare de reactivi preparați și gata de utilizare pentru testarea manuală a eșantioanelor în STM și a probelor preparate manual de tip peleți celulari post-gradient PreservCyt și SurePath

Număr de teste/banetele	Amestec de sondă	Soluție tampon de spălare	DR1	DR2
24/3	1,04 ml	> 1 litru	3 ml	3 ml
48/6	2,08 ml	> 1 litru	5 ml	5 ml
72/9	3,12 ml	> 1 litru	7 ml	7 ml
96/12	4,16 ml	> 1 litru	12 ml	12 ml

Tabel 2. Volumele necesare de reactivi preparați și gata de utilizare pentru testarea automată pe RCS a eșantioanelor în STM, probe sub formă de peleți celulari post-gradient PreservCyt și SurePath preparate manual și SurePath și probe de tip peleți celulari post-gradient SurePath, preparate folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit

Număr de microplăci	Amestec de sondă	Soluție tampon de spălare	DR1	DR2
≤ 1	5,20 ml	3 litri	10 ml	10 ml
≤ 1,5	6,24 ml	3 litri	14 ml	14 ml
≤ 2	8,32 ml	3 litri	18 ml	18 ml
≤ 2,5	9,36 ml	6 litri	22 ml	22 ml
≤ 3	10,40 ml	6 litri	26 ml	26 ml
≤ 3,5	12,48 ml	6 litri	30 ml	30 ml
≤ 4	13,52 ml	6 litri	34 ml	34 ml

Tabel 3. Volumele necesare de reactivi preparați și gata de utilizare pentru testarea automatizată pe RCS a probelor PreservCyt preparate folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit

Număr de microplăci	DNR	Amestec de sondă	Soluție tampon de spălare	DR1	DR2
≤ 1	2,2 ml	5,20 ml	3 litri	10 ml	10 ml
≤ 1,5	2,2 ml	6,24 ml	3 litri	14 ml	14 ml
≤ 2	2,4 ml	8,32 ml	3 litri	18 ml	18 ml
≤ 2,5	2,4 ml	9,36 ml	6 litri	22 ml	22 ml
≤ 3	2,6 ml	10,40 ml	6 litri	26 ml	26 ml
≤ 3,5	2,6 ml	12,48 ml	6 litri	30 ml	30 ml
≤ 4	2,8 ml	13,52 ml	6 litri	34 ml	34 ml

Tabel 4. Volumele necesare de reactivi preparați și gata de utilizare pentru testarea manuală a probelor PreservCyt preparate folosind QIASymphony DSP AXpH DNA Kit

Număr de teste/banđelete	DNR	DNR2	Amestec de sondă	Soluție tampon de spălare	DR1	DR2
24/3	0,6 ml	1,0 ml	1,04 ml	> 1 litru	3 ml	3 ml
48/6	0,6 ml	2,0 ml	2,08 ml	> 1 litru	5 ml	5 ml
72/9	0,6 ml	2,5 ml	3,12 ml	> 1 litru	7 ml	7 ml
96/12	0,6 ml	5,0 ml	4,16 ml	> 1 litru	12 ml	12 ml

Tabel 5. Volumele necesare de reactivi preparați și gata de utilizare pentru testarea automatizată pe RCS a probelor PreservCyt preparate folosind QIASymphony DSP AXpH DNA Kit

Număr de microplăci	DNR	DNR2	Amestec de sondă	Soluție tampon de spălare	DR1	DR2
≤ 1	2,2 ml	5,0 ml	5,20 ml	3 litri	10 ml	10 ml
≤ 1,5	2,2 ml	5,5 ml	6,24 ml	3 litri	14 ml	14 ml
≤ 2	2,4 ml	6,5 ml	8,32 ml	3 litri	18 ml	18 ml
≤ 2,5	2,4 ml	7,7 ml	9,36 ml	6 litri	22 ml	22 ml
≤ 3	2,6 ml	8,8 ml	10,40 ml	6 litri	26 ml	26 ml
≤ 3,5	2,6 ml	10,0 ml	12,48 ml	6 litri	30 ml	30 ml
≤ 4	2,8 ml	11,0 ml	13,52 ml	6 litri	34 ml	34 ml

Reactiv de denaturare

Kitul cu 1 placă este livrat cu 50 ml de reactiv de denaturare, iar kitul cu 4 plăci este livrat cu 2 x 100 ml de reactiv de denaturare. Asigurați-vă că preparați DNR în funcție de volumul furnizat împreună cu kitul respectiv.

Note:

- Odată preparat, DNR este stabil timp de 3 luni la 2-8 °C.
- În cazul în care culoarea se estompează, adăugați 3 picături suplimentare de colorant indicator și amestecați bine înainte de utilizare.

Flacon de 50 ml

1. Adăugați 5 picături de colorant indicator în flaconul de 50 ml de reactiv de denaturare.
2. Amestecați temeinic.
DNR trebuie să aibă o culoare uniformă, violet închis.
3. Etichetați DNR cu noua dată de expirare.

Flacon de 100 ml

1. Adăugați 10 picături de colorant indicator în flaconul de 100 ml de reactiv de denaturare.
2. Amestecați temeinic.
DNR trebuie să aibă o culoare uniformă, violet închis.
3. Etichetați DNR cu noua dată de expirare.

Reactiv de denaturare 2

Notă: DNR2 este necesar numai pentru testarea probelor PreservCyt preparate folosind QIASymphony DSP AXpH DNA Kit.

1. Etichetați o eprubetă conică din polipropilenă de unică folosință ca „DNR2”.
2. Adăugați volumul necesar de Buffer N2 (consultați Tabel 6 de mai jos) în recipientul etichetat.

Tabel 6. Prepararea DNR2

Volumul de DNR2 necesar	Volumul de Buffer N2	Volumul de Buffer D2	Colorant indicator
1,0 ml	0,4 ml	0,6 ml	1-2 picături
2,0 ml	0,8 ml	1,2 ml	1-2 picături
2,5 ml	1,0 ml	1,5 ml	1-2 picături
5,0 ml	2,0 ml	3,0 ml	1-2 picături
5,5 ml	2,2 ml	3,3 ml	1-2 picături
6,5 ml	2,6 ml	3,9 ml	1-2 picături
7,7 ml	3,1 ml	4,6 ml	1-2 picături
8,8 ml	3,5 ml	5,3 ml	1-2 picături
10,0 ml	4,0 ml	6,0 ml	1-2 picături
11,0 ml	4,4 ml	6,6 ml	1-2 picături

3. Adăugați volumul necesar de Buffer D2 (consultați Tabel 6 de mai sus) în recipientul etichetat.
4. Adăugați cantitatea necesară de colorant indicator (consultați Tabel 6 de mai sus) în recipientul etichetat.

Notă: Folosiți colorantul indicator furnizat împreună cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test kit.

5. Vortexați timp de minimum 10 secunde.

Notă: Odată preparat, DNR2 este stabil timp de 8 ore la 15-30 °C.

Amestec de sondă

- Pentru testarea manuală, preparați amestecul de sondă în timpul incubării de denaturare a eșantionului (după caz, consultați „Denaturarea calibratoarelor, a substanțelor de control al calității și a eșantioanelor în STM”, pagina 44 sau „Denaturarea calibratoarelor, a substanțelor de control al calității și a eluațiilor de ADN pentru testarea manuală”, pagina 42).
 - Acționați cu deosebită atenție pentru a preveni contaminarea cu RNază. Utilizați vârfuri de pipete cu barieră de aerosoli atunci când pipetați sonda.
 - Diluantul pentru sondă este vâscos. Asigurați-vă că este obținut un vortex vizibil atunci când preparați amestecul de sondă; amestecarea incompletă poate duce la un semnal redus.
 - În cazul în care combinați mai multe flacoane ale sondei pentru testarea automată cu RCS, comasați sonda într-un flacon și amestecați prin pipetare.
1. Pentru a evita capturarea sondei în capacul flaconului, centrifugați pentru scurt timp fiecare flacon de sondă pentru a aduce lichidul în partea de jos a flaconului.
 2. Atingeți delicat flaconul pentru a amesteca.
 3. Stabiliți cantitatea de amestec de sondă necesară.

Recomandare: Creați un amestec de sondă suplimentar pentru a ține cont de volumul care s-ar putea pierde în vârfurile de pipete sau pe partea laterală a flaconului. Volumele specificate în Tabelele 1-5 de mai sus includ volumul suplimentar recomandat.

Testare manuală: Stabiliți volumele necesare pentru o diluție 1:25 a sondei în diluant pentru sondă pentru a prepara amestecul de sondă (25 μ l/testare). Volumele sunt oferite în Tabel 1, pagina 31, și Tabel 4, pagina 32, după caz.

Testare automatizată cu RCS: Folosiți volumele specificate în Tabel 2, pagina 31, Tabel 3, pagina 31 sau Tabel 5, pagina 32, după caz.

4. Etichetați un recipient nou, de unică folosință, ca „Amestec de sondă HPV de mare risc”. În funcție de numărul de testări, se recomandă o eprubetă de 5 sau 15 ml cu capac cu închidere prin apăsare, cu fund rotund, din polipropilenă.
5. Adăugați cantitatea necesară de diluant pentru sondă (consultați Tabel 7, dedesubt) în recipientul etichetat.
6. Pipetați cantitatea necesară de sondă HPV de mare risc în diluantul pentru sondă (consultați Tabel 7, dedesubt) prin amplasarea vârfului de pipetă pe peretele interior al eprubetei, chiar deasupra meniscului și prin expulzarea conținutului.

Important: Nu scufundați vârful în diluantul pentru sondă.

Tabel 7. Prepararea amestecului de sondă

Volumul de amestec de sondă necesar	Volumul de diluant pentru sondă	Volumul de sondă HPV de mare risc
1,04 ml	1,0 ml	40 µl
2,08 ml	2,0 ml	80 µl
3,12 ml	3,0 ml	120 µl
4,16 ml	4,0 ml	160 µl
5,20 ml	5,0 ml	200 µl
6,24 ml	6,0 ml	240 µl
8,32 ml	8,0 ml	320 µl
9,36 ml	9,0 ml	360 µl
10,40 ml	10,0 ml	400 µl
12,48 ml	12,0 ml	480 µl
13,52 ml	13,0 ml	520 µl

7. Vortexați timp de cel puțin 5 secunde la viteză maximă pentru a amesteca temeinic. **0.**

Trebuie să se producă un vortex vizibil.

Soluție tampon de spălare

- Pentru testarea manuală, preparați soluția tampon de spălare în timpul etapei de hibrid capture (consultați „Hybrid capture”, pagina 50).
- Pentru a reduce la minimum expunerea, adăugați apă în concentratul soluției tampon de spălare în timpul preparării.
- Pentru metoda manuală de spălare a microplăcilor, preparați 3 litri de soluție tampon de spălare în aparatul de spălare.

Recomandare: La fiecare 3 luni, curățați aparatul de spălare și tubulatura cu soluție 0,5% de hipoclorit de sodiu și clătiți temeinic cu apă distilată sau deionizată pentru a preveni posibila contaminare cu fosfataza alcalină prezentă în bacterii și mucegaiuri.

- Pentru Automated Plate Washer, preparați soluția tampon de spălare și depozitați-o într-un recipient acoperit sau preparați 1 litru și amplasați-l în recipientul de spălare al Automated Plate Washer.
 - Pentru testarea automatizată cu RCS, preparați cantitatea specificată (după caz, consultați Tabel 2, pagina 31, Tabel 3, pagina 31 sau Tabel 5, pagina 32) în flaconul de spălare al RCS.
1. Amestecați bine concentratul soluției tampon de spălare și adăugați volumul necesar de concentrat al soluției tampon de spălare (consultați Tabel 8 de mai jos) în recipientul specificat.
 2. Adăugați volumul necesar de apă distilată sau deionizată (consultați Tabel 8, dedesubt) în recipientul specificat.

Tabel 8. Prepararea soluției tampon de spălare

Volumul de soluție tampon de spălare necesar	Volumul de concentrat de soluție tampon de spălare	Volumul de apă distilată sau deionizată
1 litru	33,3 ml	966,7 ml
2 litri	66,6 ml	1933,4 ml
3 litri	100,0 ml	2900,0 ml
6 litri	200,0 ml	5800,0 ml

- Amplasați un prosop de hârtie curat, cu conținut redus de scame, peste posibilele orificii ale recipientului și amestecați bine.
- Sigilați recipientul pentru a preveni contaminarea sau evaporarea sau amplasați-l pe instrumentul respectiv, după caz.
- Etichetați soluția tampon de spălare cu noua dată de expirare.

Notă: Odată preparată, soluția tampon pentru spălare este stabilă timp de 3 luni la 2-30 °C.

Crearea configurației de placă

- Creaiți o configurație de placă folosind software-ul de analiză a testului *digene* cu protocoalele de testare *digene* pentru HPV.

Consultați manualul de utilizare al software-ului aplicabil pentru instrucțiuni despre crearea unei configurații a plăcii, cu pozițiile adecvate pentru calibratoare, substanțele de control al calității și eșantioane.

Note:

- Calibratoarele, substanțele de control al calității și eșantioanele sunt rulate într-o configurație de coloană cu 8 godeuri.
- Testați calibratoarele și substanțele de control al calității în următoarele poziții de pe microplacă (consultați Figura 1, dedesubt):
 - Calibratorul negativ (Negative Calibrator, NC) este replicat în godeurile microplăcii A1, B1, C1
 - Calibratorul HPV de mare risc (High-Risk HPV Calibrator, HRC) este replicat în godeurile microplăcii D1, E1, F1
 - Substanța de control al calității HPV cu risc redus (Low-Risk HPV Quality Control, QC1-LR) în godeul microplăcii G1
 - Substanța de control al calității HPV de mare risc (High-Risk HPV Quality Control, QC2-HR) în godeul microplăcii H1

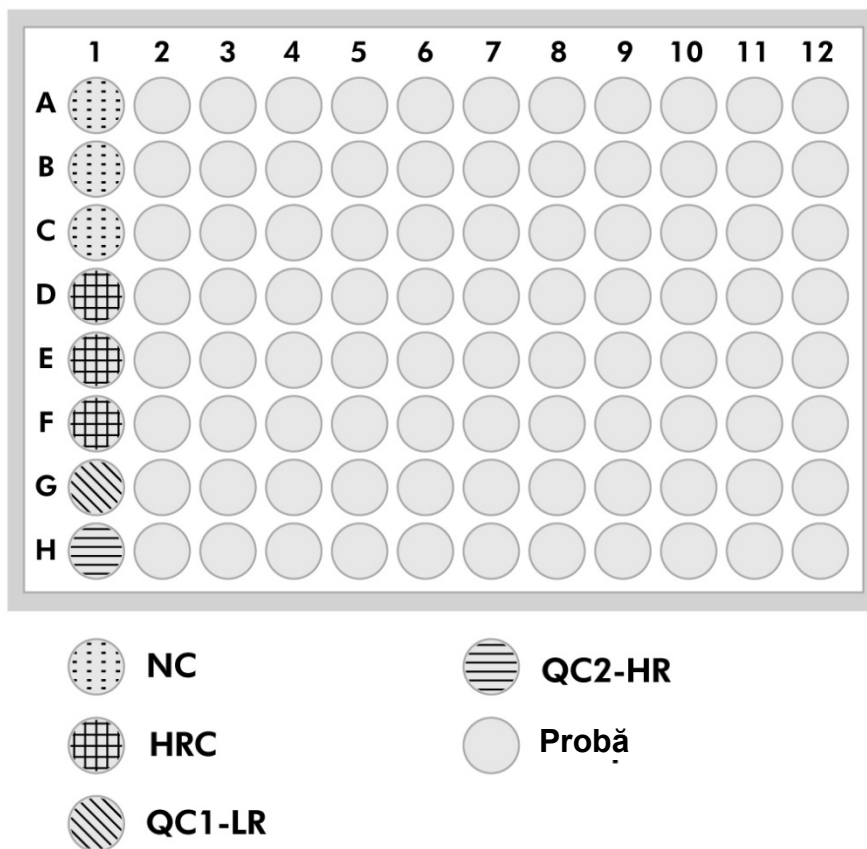


Figura 1. Poziția calibratoarelor, a substanțelor de control al calității și a probelor pe microplacă.

Important: Când efectuați testarea automatizată cu RCS, utilizați protocoale de test specifice RCS pentru a crea configurația plăcii și a genera rezultate. Parametrii definiți ai protocoalelor de test specifice RCS sunt diferiți de cei pentru protocoalele de test pentru testare manuală (consultați „Calculul valorii de prag”, pagina 58).

- Amplasați calibratoarele, substanțele de control al calității și eșantioanele care urmează să fie testate într-un suport pentru eprubete de recoltare a eșantioanelor sau într-un suport pentru eșantioane, în ordinea în care vor fi testate.

Important: Atunci când efectuați testarea automatizată cu RCS, este esențial ca configurația plăcii să corespundă eșantioanelor corecte testate pentru a preveni raportarea rezultatelor inexacte ale eșantioanelor. Pentru fiecare suport pentru eșantioane și capac utilizat, confirmați că numerele de serie coincid și, după caz, etichetați fiecare suport pentru eșantioane și fiecare capac în funcție de ordinea în care trebuie testate pe RCS. Folosiți un marker și o etichetă care să nu se curețe în baia de apă la 65 °C.


Prepararea probelor

Eșantioanele PreservCyt și SurePath necesită prepararea probelor înainte de testarea cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. În funcție de tipul de preparare a eșantioanelor efectuat, probele preparate sunt gata pentru diferite etape ale *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Metodele disponibile de preparare a probelor sunt următoarele:


- Prepararea automată a probelor de eșantioane PreservCyt folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit
- Prepararea automată a probelor de eșantioane SurePath și peleți celulari post-gradient folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit
- Prepararea automată a probelor de eșantioane PreservCyt folosind QIASymphony DSP AXpH DNA Kit
- Prepararea manuală a probelor de eșantioane PreservCyt
- Prepararea manuală a probelor de peleți celulari post-gradient SurePath

Prepararea probelor de eșantioane PreservCyt folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit


 Consultați *Instrucțiunile de utilizare (manualul) QIASymphony DSP HPV Media Kit* pentru instrucțiuni de preparare a probelor PreservCyt folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit.

Important: Fragmentele de probă produse ca urmare a preparării probelor de eșantioane PreservCyt folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit pot fi testate numai folosind RCS. Realizarea manuală a testării cu fragmente de probă nu este validată.

Rezultatul preparării probelor de eșantioane PreservCyt folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit este reprezentat de fragmente de probă dintr-o microplacă de hibridizare cu prima coloană goală. Fragmentele de probă conțin particule magnetice, STM și DNR și sunt gata pentru testarea automatizată cu RCS în etapa de denaturare. Calibratoarele, substanțele de control al calității și fragmentele de probă sunt denaturate în același timp în placa de hibridizare în timpul testării automatizate cu RCS (consultați „Denaturarea și hibridizarea probelor preparate folosind QIASymphony SP”, pagina 41).


 Când efectuați testarea automatizată cu RCS a probelor preparate folosind QIASymphony SP, consultați *Manualul de utilizare Rapid Capture System – Efectuarea digene HC2 DNA Tests folosind probe procesate pe QIASymphony SP* pentru instrucțiuni pentru testarea completă.

Prepararea probelor de eșantioane SurePath și peletți celulari post-gradient SurePath folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit


 Consultați *Instrucțiunile de utilizare (manualul) QIASymphony DSP HPV Media Kit* pentru instrucțiuni de preparare a probelor SurePath și a probelor sub formă de peletți celulari post-gradient SurePath folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit.

Important: Fragmentele de probă produse ca urmare a preparării probelor de eșantioane SurePath folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit pot fi testate numai folosind RCS. Realizarea manuală a testării cu fragmente de probă nu este validată.

Rezultatul preparării probelor de eșantioane SurePath și a probelor sub formă de peletți celulari post-gradient SurePath folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit este reprezentat de calibratoare, substanțe de control al calității și fragmente de probă într-o microplacă de hibridizare gata pentru testarea automatizată cu RCS în etapa de hibridizare a testării.


 Când efectuați testarea automatizată cu RCS a probelor preparate folosind QIASymphony SP, consultați *Manualul de utilizare Rapid Capture System – Efectuarea digene HC2 DNA Tests folosind probe procesate pe QIASymphony SP* pentru instrucțiuni pentru testarea completă.

Prepararea probelor de eșantioane PreservCyt folosind QIASymphony DSP AxpH DNA Kit

 Consultați *QIASymphony DSP AxpH DNA Kit Handbook* pentru instrucțiuni cu privire la prepararea probelor de eșantioane PreservCyt.

Rezultatul preparării probelor de eșantioane PreservCyt folosind QIASymphony DSP AxpH DNA Kit este reprezentat de eluații de ADN dintr-o microplacă de hibridizare cu prima coloană goală. Eluații de ADN sunt gata pentru etapa de denaturare a testării. Calibratoarele, substanțele de control al calității și eluații de ADN sunt denaturați în același timp pe microplaca de hibridizare (consultați „Denaturarea și hibridizarea probelor preparate folosind QIASymphony SP”, pagina 41).

Prepararea manuală a probelor de eșantioane PreservCyt

 Consultați instrucțiunile de utilizare *digene HC2 Sample Conversion Kit* pentru prepararea manuală a probelor de eșantioane PreservCyt.

Prepararea manuală a probelor de eșantioane PreservCyt folosind *digene HC2 Sample Conversion Kit* are ca rezultat probe gata pentru etapa de hibridizare a testării. Preparați

separat calibratoarele și substanțele de control al calității (consultați „Denaturarea calibratoarelor, a substanțelor de control al calității și a eșantioanelor în STM”, pagina 44).

Prepararea manuală a probelor de peleți celulari post-gradient SurePath

Prepararea manuală a probelor de peleți celulari post-gradient SurePath are ca rezultat probe gata pentru etapa de hibridizare a testării. Preparați separat calibratoarele și substanțele de control al calității (consultați „Denaturarea calibratoarelor, a substanțelor de control al calității și a eșantioanelor în STM”, pagina 44).

Important: Dacă peleții celulari post-gradient ai eșantionului SurePath par să conțină mai puțin de 1 ml, peletul celular post-gradient nu este potrivit pentru testarea *cidigene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, deoarece SurePath Preservative Fluid nu a fost adăugat post-citologie.

1. Acclimatizați peleții celulari post-gradient SurePath la temperatura camerei și confirmați că volumul de lichid observat este egal cu aproximativ 2,8 ml.
2. Centrifugați peleții celulari post-gradient SurePath într-un rotor cu găleată basculantă la $800 \pm 15 \times g$ timp de 10 ± 1 minute.
3. Scoateți eprubetele din centrifugă.
4. Imediat după centrifugare, decantați cu atenție supernatantul și ștergeți ușor fiecare eprubetă de aproximativ 3 ori pe prosoape Kimtowels sau pe prosoape echivalente din hârtie cu conținut redus de scame pentru a îndepărta excesul de lichid. Observați peletul din fiecare eprubetă.

Important: Nu lăsați peleții celulari să alunece în josul eprubetei în timpul ștergerii.

5. Amplasați eprubetele în suport.
6. Adăugați 200 μ l de STM la fiecare pelet, folosind o pipetă de repetare sau o pipetă cu un singur canal.
7. Resuspendați fiecare pelet prin agitare rapidă a fiecărei eprubete în parte timp de 15 secunde la viteză mare.

Dacă peletul este greu de resuspendat, agitați rapid timp de încă 5-30 de secunde sau până când peletul se desprinde de fundul eprubetei și pare să se dizolve.

Notă: Eprubetele pot fi amestecate fără să fie acoperite.

8. Pipetați 100 μ l de DNR în fiecare eșantion SurePath, folosind o pipetă de repetare sau o pipetă cu un singur canal.

Important: Asigurați-vă că nu atingeți părțile laterale ale eprubetei, în caz contrar, poate avea loc contaminarea încrucișată a eșantioanelor.

9. Amestecați bine fiecare eprubetă în parte, prin agitare rapidă la viteză mare timp de 5 secunde.

Notă: Eprubetele pot fi amestecate fără să fie acoperite.

10. Etichetați *digene* HC2 Sample Conversion Tubes sau eprubete conice de 15 ml, cu numărul de identificare și tipul probei aplicabile (de exemplu, „SP” pentru un eșantion SurePath) și amplasați eprubetele într-un suport pentru eprubete.

Important: Pentru testarea automatizată cu RCS, trebuie folosite *digene* HC2 Sample Conversion Tubes.

11. Transferați întregul volum în eprubeta conică de 15 ml aplicabilă folosind o pipetă de transfer de 7 ml cu vârf standard de unică folosință sau echivalentă.

12. Acoperiți eprubetele conice cu capace și amplasați-le într-un suport pentru eprubete.

13. Incubați eprubetele într-o baie de apă la 65 ± 2 °C timp de 90 ± 5 minute.

Notă: Această perioadă de incubare este mai mare decât cea necesară pentru alte tipuri de eșantioane aprobate.

Dacă testarea va fi finalizată în aceeași zi, denaturați calibratoarele și substanțele de control al calității (consultați „Denaturarea calibratoarelor, a substanțelor de control al calității și a eșantioanelor în STM”, pagina 44).

14. Scoateți suportul pentru eprubete din baia de apă după incubare.

Dacă utilizați un suport pentru eșantioane, nu îl lăsați să se răcească înainte de a scoate capacul suportului. Continuați imediat testarea sau îndepărtați capacul suportului și folia de sigilare a tuburilor DuraSeal.

Notă: Dacă suportul pentru eșantioane se răcește, eprubetele se pot lipi de capacul suportului, apoi vor curge.

Probele SurePath preparate pot fi:

- Testate imediat (treceți la „Hibridizarea probelor în STM preparate și al probelor sub formă de peleți celulari post-gradient PreservCyt și SurePath preparate manual”, pagina 47)
- Depozitate (consultați „Punctul de oprire opțional al probelor în STM preparate și al probelor sub formă de peleți celulari post-gradient PreservCyt și SurePath preparate manual”, pagina 46)

Denaturarea și hibridizarea probelor preparate folosind QIASymphony SP


Rezultatul preparării probelor pe QIASymphony SP este o microplacă de hibridizare care conține cel puțin probele preparate.

Dacă probele PreservCyt au fost preparate folosind QIASymphony SP, prima coloană a microplăcii de hibridizare este goală. Conținutul microplăcii este gata pentru etapa de denaturare a testării. Calibratoarele și substanțele de control al calității sunt adăugate pe microplaca de hibridizare fie manual, fie în timpul testării automatizate cu RCS, iar apoi se efectuează etapa de denaturare.

Dacă probele SurePath sau probele sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath au fost preparate folosind QIASymphony SP, placa conține probele preparate cu calibratoarele și

substanțele de control al calității denaturate, pipetate în prima coloană a microplăcii de hibridizare. Conținutul microplăcii este gata pentru testarea automatizată cu RCS în etapa de hibridizare a testării.

Important: Fragmentele de probă produse ca urmare a preparării probelor folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit pot fi testate numai folosind RCS. Realizarea manuală a testării cu fragmente de probă nu este validată.

 Când efectuați testarea automatizată cu RCS a probelor preparate folosind QIASymphony SP, consultați *Manualul de utilizare Rapid Capture System – Efectuarea digene HC2 DNA Tests folosind probe procesate pe QIASymphony SP* pentru instrucțiuni pentru testarea completă.

Denaturarea calibratoarelor, a substanțelor de control al calității și a eluațiilor de ADN pentru testarea manuală

- Această procedură este dedicată testării manuale a probelor de eșantioane PreservCyt preparate folosind QIASymphony DSP AXpH DNA Kit. Dacă efectuați testarea automatizată cu RCS, consultați *Manualul de utilizare Rapid Capture System – Efectuarea digene HC2 DNA Tests folosind probe procesate pe QIASymphony SP* pentru instrucțiuni pentru testarea completă.
 - Denaturarea calibratoarelor și a substanțelor de control al calității se efectuează folosind DNR, în timp ce denaturarea eluațiilor de ADN se efectuează folosind DNR2.
1. Agitați rapid fiecare calibrator și substanță de control al calității timp de 10 secunde la setarea maximă.
 2. Răsturnați fiecare eprubetă pentru a recupera materialul din capacul eprubetei.
 3. Scoateți capacele de pe eprubetele cu calibrator și substanță de control al calității și aruncați-le.
 4. Folosind o pipetă cu un singur canal, adăugați 50 μl de calibrator sau substanță de control al calității aplicabil(ă) pe fundul godeului gol al microplăcii de hibridizare, în funcție de configurația creată a plăcii.

În cazul în care calibratorul și substanțele de control al calității vor fi utilizate pentru testare suplimentară, acoperiți eprubetele cu noile capace cu filet pentru eprubete de recoltare a eșantioanelor, etichetați-le cu o nouă dată de expirare și păstrați-le la 2-8 °C.

Notă: Calibratoarele și substanțele de control al calității deschise și nedenaturate sunt stabile timp de 3 luni la 2-8 °C.

5. Vortexați bine DNR și DNR2 preparate și divizați-le în părți alicote pe fiecare într-un rezervor de reactiv de unică folosință, etichetat corespunzător.

Important: Asigurați-vă că adăugați reactivul corect în coloana corectă a microplăcii pentru eluat.

6. Folosind o pipetă cu 8 canale, adăugați 25 μl de DNR în prima coloană a microplăcii de hibridizare care conține calibratoarele și substanțele de control al calității.
7. Folosind o pipetă cu 8 canale, adăugați 25 μl de DNR2 în fiecare microplacă de hibridizare care conține un eluat de ADN.
8. Acoperiți microplaca de hibridizare cu un capac pentru microplacă și agitați timp de 30 de secunde în Rotary Shaker I, setat la 1100 ± 100 rpm.
9. Amplasați microplaca în Microplate Heater I echilibrat la 65 ± 2 °C, asigurându-vă că nu provocați stropirea. Incubați microplaca de hibridizare timp de 45 ± 5 minute.
Preparați amestecul de sondă în timpul acestei incubări (consultați „Amestec de sondă”, pagina 34).
10. Scoateți microplaca de hibridizare din Microplate Heater I.

Calibratoarele, substanțele de control al calității și eluații de ADN denaturate pot fi:

- Depozitate (consultați „Punct de oprire opțional al eluațiilor de ADN”, pagina 43)
- Testate imediat (treceți la „Hibridizarea eluațiilor de ADN”, pagina 43)

Punct de oprire opțional al eluațiilor de ADN

Eluații de ADN denaturați, inclusiv calibratoarele și substanțele de control al calității, acoperite cu un capac pentru microplacă, pot fi depozitate la 2-8 °C timp de 2 săptămâni.

Hibridizarea eluațiilor de ADN

1. Dacă microplaca de hibridizare care conține calibratoarele, substanțele de control al calității și eluații de ADN denaturați a fost depozitată, scoateți capacul microplăcii și lăsați microplaca de hibridizare să se aclimatizeze la 20-25 °C.
2. Vortexați bine amestecul de sondă și divizați-l în părți alicote într-un rezervor de reactiv de unică folosință.
3. Pipetați cu grijă 25 μl de amestec de sondă în fiecare godeu al microplăcii de hibridizare folosind o pipetă cu 8 canale și vârful noi pentru fiecare adăugare de amestec de sondă.
Evitați stropirea și atingerea părților laterale ale godeurilor microplăcii de hibridizare.

4. Acoperiți microplaca de hibridizare cu un capac pentru microplacă și agitați timp de 3 ± 2 minute în Rotary Shaker I, setat la 1100 ± 100 rpm.

După agitare, calibratoarele, substanțele de control al calității și eluații de ADN trebuie să devină galbene.

Probele care rămân violete este posibil să nu fi primit cantitatea corespunzătoare de amestec de sondă. Adăugați încă 25 μ l de amestec de sondă în probele care rămân violete și agitați din nou. Dacă o probă rămâne violetă după urmarea acestei proceduri, retestați eșantionul.

5. Amplasați microplaca în Microplate Heater I echilibrat la 65 ± 2 °C, asigurându-vă că nu provocați stropirea. Incubați microplaca de hibridizare timp de 60 ± 5 minute.
6. Treceți la „Hybrid capture”, pagina 50 pentru a continua testarea.

Denaturarea și hibridizarea eșantioanelor în STM și a probelor sub formă de peleți celulari post-gradient PreservCyt și SurePath preparate manual

- La testarea manuală a probelor sub formă de peleți celulari post-gradient PreservCyt și SurePath preparate manual, etapa de denaturare nu este necesară pentru probe. Cu toate acestea, calibratoarele și substanțele de control al calității necesare pentru testare sunt denaturate în conformitate cu instrucțiunile de mai jos.
- Unele eșantioane în STM pot conține sânge sau altă materie biologică, care poate masca modificările de culoare la adăugarea DNR. Eșantioanele care prezintă o culoare închisă înainte de adăugarea DNR pot să nu ofere o modificare corespunzătoare a culorii în această etapă. În aceste cazuri, lipsa manifestării unei modificări corespunzătoare a culorii nu va afecta rezultatele testării. Amestecarea corectă poate fi verificată prin observarea modificării culorii calibratoarelor și a substanțelor de control al calității.

Denaturarea calibratoarelor, a substanțelor de control al calității și a eșantioanelor în STM

- Nu scoateți în niciun moment dispozitivul de recoltare a eșantioanelor din eprubeta pentru eșantioane.
- Pentru a evita rezultatele fals-pozitive, este esențial ca întregul material eșantion să intre în contact cu DNR. Amestecarea după adăugarea DNR este o etapă esențială.
- Eșantioanele în STM denaturate folosind metoda MST Vortexer 2 trebuie să utilizeze metoda „Hibridizarea folosind o microplacă și Microplate Heater I” de la pagina 47. Metoda „Hibridizarea folosind microtuburi și baia de apă” (pagina 49) nu a fost validată cu eșantioane în STM denaturate folosind MST Vortexer 2.

1. Scoateți capacele din eprubete și aruncați-le.

Important: Considerați capacele scoase din eșantioanele în STM ca fiind potențial infecțioase (consultați „Avertizări și precauții”, pagina 20 pentru informații suplimentare).

2. Pipetați volumul specificat (consultați Tabel 9, dedesubt) de DNR în eprubete, folosind o pipetă de repetare sau o pipetă reglabilă.

Asigurați-vă că nu atingeți părțile laterale ale eprubetelor, în caz contrar, poate avea loc contaminarea încrucișată a eșantioanelor.

Important: Kiturile cu 1 placă și cu 4 plăci au volume diferite pentru calibratorul HPV de mare risc. Asigurați-vă că adăugați volumul corect de DNR.

Notă: Volumul de DNR adăugat este echivalent cu jumătate din volumul de lichid din eprubetă.

Tabel 9. Adăugarea de DNR

Calibrator, substanță de control al calității sau eșantion în STM	Volumul de DNR necesar
Calibrator negativ, 2 ml	1000 µl
Calibrator HPV de mare risc, 1 ml	500 µl
Calibrator HPV de mare risc, 2 ml	1000 µl
Substanță de control al calității HPV cu risc redus sau HPV de mare risc, 1 ml	500 µl
Eșantion în STM, 1 ml	500 µl

3. Amestecați eprubetele folosind metoda MST Vortexer 2 sau metoda manuală, de vortexare a fiecărei eprubete în parte.

Metoda MST Vortexer 2

- Acoperiți eprubetele cu folie de sigilare a tuburilor DuraSeal trăgând folia peste eprubetele din suportul pentru eșantioane.
- Amplasați capacul suportului peste eprubetele acoperite cu folie și blocați-l pe poziție cu cele 2 cleme laterale. Tăiați folia cu ajutorul dispozitivului de tăiere.
- Mutați maneta cu mâner roșu în poziția UP (SUS), astfel încât să fie orizontală.
- Amplasați fix suportul pentru eșantioane în ghidajele de pe MST Vortexer 2, cu colțul crestat cel mai mare al suportului amplasat în colțul din dreapta față. Fixați suportul pentru eșantioane prin deplasarea manetei cu mâner roșu în poziția „down” (jos), astfel încât să fie verticală.
- Asigurați-vă că setarea vitezei este la 100 (viteză maximă) și PORNIȚI MST Vortexer 2.
- Vortexați eprubetele timp de 10 secunde.
- OPRIȚI MST Vortexer 2.
- Scoateți suportul pentru eșantioane din MST Vortexer 2 deplasând maneta cu mâner roșu în poziția „up” (sus).

Metoda de vortexare manuală a fiecărei eprubete în parte

- a. Montați înapoi capacele pe eprubete, cu capace noi cu filet pentru eprubete de recoltare a eșantioanelor.
- b. Amestecați bine fiecare eprubetă în parte, prin agitare rapidă la viteză mare timp de 5 secunde.

Important: În timpul amestecării, trebuie observat un vortex vizibil de lichid care spală întreaga suprafață interioară a eprubetei.

- c. Răsturnați fiecare eprubetă o singură dată pentru a spăla interiorul eprubetei, al capacului și al marginii.
- d. Reintroduceți eprubeta în suport.

Lichidul din eprubetă trebuie să devină violet.

4. Incubați eprubetele într-un suport, într-o baie de apă la 65 ± 2 °C timp de 45 ± 5 minute.

Pentru testarea manuală, preparați amestecul de sondă în timpul acestei incubări (consultați „Amestec de sondă”, pagina 34).

5. Scoateți eprubetele din baia de apă după incubare.

Dacă utilizați un suport pentru eșantioane, nu îl lăsați să se răcească înainte de a scoate capacul suportului. Continuați imediat testarea sau îndepărtați capacul suportului și folia de sigilare a tuburilor DuraSeal.

Notă: Dacă suportul pentru eșantioane se răcește, eprubetele se pot lipi de capacul suportului, apoi vor curge.

Calibratoarele, substanțele de control al calității și eșantioanele în STM denaturate pot fi:

- Depozitate (consultați „Punctul de oprire opțional al probelor în STM preparate și al probelor sub formă de peleți celulari post-gradient PreservCyt și SurePath preparate manual”, pagina 46)
- Testate imediat (treceți la „Hibridizarea probelor în STM preparate și al probelor sub formă de peleți celulari post-gradient PreservCyt și SurePath preparate manual”, pagina 47)

Punctul de oprire opțional al probelor în STM preparate și al probelor sub formă de peleți celulari post-gradient PreservCyt și SurePath preparate manual


Important: Nu depozitați și nu expediați eșantioane denaturate pe gheață carbonică.

Toate probele preparate, inclusiv calibratoarele și substanțele de control al calității, pot fi depozitate la 2-8 °C peste noapte sau la -20 °C timp de până la 3 luni. Se pot efectua maximum 3 cicluri de congelare/decongelare, timp de maximum 2 ore la temperatura camerei în timpul fiecărui ciclu de decongelare.

Pentru depozitarea peste noapte la 2-8 °C în suportul pentru eșantioane, acoperiți probele cu folie de sigilare a tuburilor DuraSeal și puneți la loc capacul suportului.

Pentru depozitare la -20 °C în suportul pentru eșantioane, scoateți capacul suportului și folia de sigilare a tuburilor DuraSeal și amplasați un capac potrivit pe eprubete.

Hibridizarea probelor în STM preparate și al probelor sub formă de peleți celulari post-gradient PreservCyt și SurePath preparate manual

 Atunci când efectuați testarea automatizată cu RCS a probelor în STM sau a probelor sub formă de peleți celulari post-gradient PreservCyt și SurePath preparate manual, consultați *Manualul de utilizare Rapid Capture System* pentru instrucțiuni pentru testarea completă.

În cazul în care calibratoarele, substanțele de control al calității sau eșantioanele denaturate au fost depozitate, lăsați-le să se aclimatizeze la 20-25 °C și, dacă sunt depozitate într-un suport pentru eșantioane, scoateți capacele din eprubete și aruncați-le.

- Sunt disponibile două metode de hibridizare pentru probele în STM și probele sub formă de peleți celulari post-gradient PreservCyt și SurePath preparate manual: „Hibridizarea folosind microplacă și Microplate Heater I” și „Hibridizarea folosind microtuburile și baia de apă”.
- Eșantioanele în STM denaturate folosind metoda MST Vortexer 2 trebuie să utilizeze „Hibridizarea folosind o microplacă și Microplate Heater I” de la pagina 47. „Hibridizarea folosind microtuburi și baia de apă” (pagina 49) nu a fost validată cu eșantioane în STM denaturate folosind MST Vortexer 2.
- Amestecul de sondă este vâcos. Asigurați-vă că amestecul de sondă este bine amestecat și cantitatea necesară este distribuită complet în fiecare godeu al microplăcii de hibridizare sau microtub de hibridizare.
- Când transferați proba pe microplaca de hibridizare sau microtubul de hibridizare, evitați să atingeți părțile laterale ale godeurilor microplăcii de hibridizare sau ale microtuburilor de hibridizare, deoarece pot apărea rezultate fals-pozitive dacă probele nu sunt transferate cu atenție. Limitați formarea de bule de aer. Utilizați un vârf de pipetă curat, ultra lung pentru fiecare transfer, pentru a evita contaminarea încrucișată.

Hibridizarea folosind o microplacă și Microplate Heater I

1. Obțineți și etichetați o microplacă de hibridizare.
2. Vortexați folosind una dintre următoarele metode:

Calibratoare, substanțe de control al calității sau probe în STM cu MST Vortexer 2

- a. După caz, acoperiți eprubetele cu folie de sigilare a tuburilor DuraSeal și fixați capacul suportului pe suportul pentru eșantioane.

- b. Vortexați suportul pentru eșantioane timp de minimum 5 secunde la setarea vitezei maxime.
- c. Amplasați imediat suportul pentru eșantioane pe blatul bancului de lucru și eliberați zăvoarele. Ridicați capacul suportului aproximativ 1 cm și mișcați-l ușor la stânga și la dreapta pentru a elibera orice eprubetă care s-ar fi putut lipi de folia de sigilare a tuburilor DuraSeal. Scoateți capacul suportului ridicându-l drept în sus, până când suportul pentru eșantioane este deschis complet.
- d. Desfaceți cu atenție folia de sigilare a tuburilor DuraSeal de pe capacul suportului și aruncați-o.

Probe sub formă de peleți celulari post-gradient PreservCyt sau SurePath cu MST Vortexer 2

- a. După caz, acoperiți eprubetele cu folie de sigilare a tuburilor DuraSeal și fixați capacul suportului pe suportul pentru eșantioane.
- b. Vortexați suportul de conversie timp de minimum 10 secunde la setarea vitezei maxime.
- c. Amplasați imediat suportul pentru eșantioane pe blatul bancului de lucru și eliberați zăvoarele. Ridicați capacul suportului aproximativ 1 cm și mișcați-l ușor la stânga și la dreapta pentru a elibera orice eprubetă care s-ar fi putut lipi de folia de sigilare a tuburilor DuraSeal. Scoateți capacul suportului ridicându-l drept în sus, până când suportul pentru eșantioane este deschis complet.
- d. Desfaceți cu atenție folia de sigilare a tuburilor DuraSeal de pe capacul suportului și aruncați-o.

Orice tip de probă cu vortexer

- a. Vortexați fiecare eprubetă în parte timp de cel puțin 5 secunde.
3. Folosind pipeta EXPAND-4 sau o pipetă cu un singur canal cu un vârf de pipetă ultra lung, transferați 75 µl din fiecare calibrator, substanță de control al calității sau probă pe fundul unui godeu gol al microplăcii de hibridizare în funcție de configurația creată a plăcii.
- Dacă probele vor fi depozitate, acoperiți calibratoarele, substanțele de control al calității și probele în STM denaturate cu capace noi cu filet pentru eprubete de recoltare a eșantioanelor și amplasați capacul original pentru fiecare probă pe probele sub formă de peleți celulari post-gradient PreservCyt și SurePath.
- Notă:** Depozitați probele conform limitelor detaliate în „Punctul de oprire opțional al probelor în STM preparate și al probelor sub formă de peleți celulari post-gradient PreservCyt și SurePath preparate manual”, pagina 46.
- 4. După transferul ultimei probe, acoperiți microplaca de hibridizare cu un capac pentru microplacă și incubați timp de 10 minute la 20-25 °C.
 - 5. Vortexați bine amestecul de sondă și divizați-l în părți alicote într-un rezervor de reactiv de unică folosință.
 - 6. Pipetați cu grijă 25 µl de amestec de sondă în fiecare godeu al microplăcii de hibridizare folosind o pipetă cu 8 canale și vârfuri noi pentru fiecare adăugare de amestec de sondă. Evitați stropirea și atingerea părților laterale ale godeurilor microplăcii de hibridizare.

7. Acoperiți microplaca de hibridizare cu un capac pentru microplacă și agitați timp de 3 ± 2 minute în Rotary Shaker I, setat la 1100 ± 100 rpm.
După agitare, calibratoarele, substanțele de control al calității, probele în STM și probele sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath trebuie să devină galbene, iar probele PreservCyt trebuie să devină roz.
Probele care rămân violete este posibil să nu fi primit cantitatea corespunzătoare de amestec de sondă. Adăugați încă 25 μ l de amestec de sondă în probele care rămân violete și agitați din nou. Dacă o probă rămâne violetă după urmarea acestei proceduri, retestați eșantionul.
8. Amplasați microplaca în Microplate Heater I echilibrat la 65 ± 2 °C, asigurându-vă că nu provocați stropirea. Incubați microplaca de hibridizare timp de 60 ± 5 minute.
9. Treceți la „Hybrid capture”, pagina 50 pentru a continua testarea.

Hibridizarea folosind microtuburi și baia de apă

1. Etichetați și amplasați numărul necesar de microtuburi de hibridizare curate în suportul pentru microtuburi.
2. Vortexați individual fiecare calibrator, substanță de control al calității și eprubetă pentru probe timp de cel puțin 5 secunde înainte de a scoate proba.
3. Folosind o pipetă cu un singur canal cu un vârf de pipetă ultra lung, transferați 75 μ l din fiecare calibrator, substanță de control al calității sau probă pe fundul microtubului de hibridizare aplicabil în funcție de configurația creată a plăcii.
Dacă probele vor fi depozitate, acoperiți calibratoarele, substanțele de control al calității și probele în STM denaturate cu capace noi cu filet pentru eprubete de recoltare a eșantioanelor și amplasați capacul original pentru fiecare probă pe probele sub formă de peleți celulari post-gradient PreservCyt și SurePath.
Notă: Depozitați probele conform limitelor detaliate în „Punctul de oprire opțional al probelor în STM preparate și al probelor sub formă de peleți celulari post-gradient PreservCyt și SurePath preparate manual”, pagina 46.
4. După transferul ultimei probe, incubați microtuburile de hibridizare timp de 10 minute la 20-25 °C.
5. Vortexați bine amestecul de sondă și divizați-l în părți alicote într-un rezervor de reactiv de unică folosință.
6. Pipetați cu grijă 25 μ l de amestec de sondă în fiecare microtub de hibridizare folosind o pipetă cu 8 canale și vârfuri noi pentru fiecare rând.
Evitați stropirea și atingerea părților laterale ale microtuburilor de hibridizare.
Inspectați de dedesubt suportul pentru a vă asigura că toate microtuburile de hibridizare au primit cantitatea corectă de amestec de sondă.

7. Acoperiți microtuburile de hibridizare cu un dispozitiv de sigilare a plăcii. Amplasați capacul suportului în partea de sus a suportului. Agitați suportul pentru microtuburi timp de 3 ± 2 minute în Rotary Shaker I, setat la 1100 ± 100 rpm.

După agitare, calibratoarele, substanțele de control al calității, probele în STM și probele sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath trebuie să devină galbene, iar probele PreservCyt trebuie să devină roz.

Probele care rămân violete este posibil să nu fi primit cantitatea corespunzătoare de amestec de sondă. Adăugați încă 25 μ l de amestec de sondă în probele care rămân violete și agitați din nou. Dacă o probă rămâne violetă după urmarea acestei proceduri, retestați eșantionul.

8. Incubați suportul pentru microtuburi timp de 60 ± 5 minute într-o baie de apă la 65 ± 2 °C.

Asigurați-vă că nivelul apei din baia de apă este suficient pentru a acoperi întregul volum al microtubului de hibridizare.

Notă: Suportul pentru microtuburi va pluti în baia de apă.

9. Treceți la „Hybrid capture” pentru a continua testarea.

Hybrid capture

1. Scoateți toate godeurile microplăcii de capturare în exces față de numărul necesar din rama plăcii.
2. Reintroduceți godeurile microplăcii de capturare nefolosite în punga originală și sigilați din nou.
3. Cu un marker, numerotați secvențial fiecare coloană și etichetați microplaca de capturare cu un număr de identificare aplicabil.

Probele vor fi adăugate în godeurile microplăcii de capturare, în funcție de configurația creată a plăcii.

4. După caz, scoateți cu atenție microplaca de hibridizare din Microplate Heater I sau suportul pentru microtuburi din baia de apă.

Scoateți imediat capacul microplăcii și amplasați-l pe o suprafață curată sau scoateți capacul suportului și trageți lent dispozitivul de sigilare a plăcii în sus și pe deasupra suportului pentru microtuburi.

5. Folosind o pipetă cu 8 canale, transferați întregul conținut (aproximativ 100 μ l) din godeurile microplăcii de hibridizare sau microtuburile de hibridizare pe fundul godeurilor microplăcii de capturare corespunzătoare.

Utilizați vârful de pipetă noi pentru fiecare transfer și lăsați fiecare vârf de pipetă să se scurgă pentru a vă asigura că există un transfer complet al probei. Dacă doriți, pipeta poate fi fixată prin sprijinirea centrului vârfulor de pipetă pe marginea superioară a godeurilor microplăcii de capturare (consultați Figura 2, dedesubt).

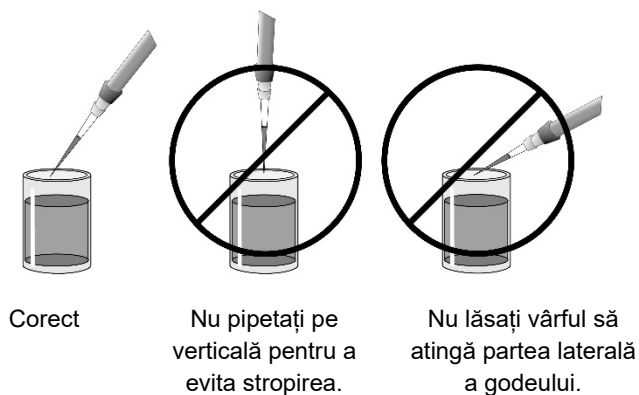


Figura 2. Pipetare corectă.

6. Acoperiți microplaca de capturare cu capacul pentru microplacă sau cu un nou dispozitiv de sigilare a plăcii și agitați timp de 60 ± 5 minute în Rotary Shaker I la 1100 ± 100 rpm, la $20-25$ °C. Preparați soluția tampon de spălare în timpul acestei incubări (consultați „Soluție tampon de spălare”, pagina 35).

7. Când incubarea este completă, scoateți microplaca de capturare din Rotary Shaker I și scoateți cu atenție capacul microplăcii sau dispozitivul de sigilare a plăcii.

8. Scoateți lichidul din godeurile microplăcii de capturare și aruncați-l într-o chiuvetă; răsturnați complet microplaca de capturare în chiuvetă și agitați puternic, cu o mișcare descendentă.

Important: Nu răsturnați din nou microplaca.

Asigurați-vă că nu vă stropiți turnând prea aproape de partea de jos a chiuvetei.

9. Ștergeți prin atingerea fermă de 2-3 ori de prosoape Kimtowels curate sau prosoape echivalente din hârtie cu conținut redus de scame.

Asigurați-vă că tot lichidul este scos din godeurile microplăcii de capturare și că partea superioară a microplăcii de capturare este uscată.

10. Treceți la „Detectie hibrid” pentru a continua testarea.

Detecție hibrid

- Adăugați reactiv deasupra microplăcii de capturare, de la stânga la dreapta, folosind o pipetă cu 8 canale. Ștergeți vârful de rezervor de reactiv de unică folosință pentru a îndepărta excesul de reactiv înainte de administrarea pe microplacă.
 - Dacă nu este folosită o pipetă cu 8 canale, aceasta poate fi înlocuită de o pipetă de repetare. Divizați DR1 în părți alicote într-o eprubetă din polipropilenă de dimensiuni suficiente pentru a integra volumul necesar.
 - Se recomandă utilizarea tehnicii de pipetare inversă pentru a îmbunătăți consistența administrării de reactivi. Procedura este descrisă mai jos.
 - Dacă doriți, pipeta poate fi fixată prin sprijinirea centrului vârfulor de pipetă pe marginea superioară a godeurilor microplăcii de capturare. Asigurați-vă că nu atingeți părțile laterale ale godeurilor microplăcii de capturare, în caz contrar, poate avea loc contaminarea încrucișată a probelor (consultați Figura 2, pagina 51).
1. Amestecați bine DR1 și transferați cu atenție volumul aplicabil (după caz, consultați Tabel 1, pagina 31 sau Tabel 4, pagina 32) într-un rezervor de reactiv curat, de unică folosință.
 2. Pipetați cu grijă 75 µl de DR1 în fiecare godeu al microplăcii de capturare folosind tehnica de pipetare inversă, după cum urmează:
 - a. Atașați vârful pe o pipetă cu 8 canale; asigurați-vă că toate vârfulurile sunt bine așezate.
 - b. Împingeți pistonul pipetei dincolo de prima oprire, până la a doua oprire.
 - c. Scufundați vârfulurile în reactiv.
 - d. Eliberați lent pistonul și lăsați reactivul să umple vârfulurile.
 - e. Distribuți reactivul în godeurile microplăcii, apăsând pistonul până la prima oprire. Nu eliberați pistonul până când vârfulurile de pipetă nu au fost scufundate în reactiv.
 - f. Umpleți din nou vârfulurile și repetați până când toate godeurile microplăcii sunt umplute.Asigurați-vă că toate godeurile microplăcii de capturare au fost umplute, observând intensitatea culorii roz. Toate godeurile microplăcii de capturare trebuie să o intensitate similară a culorii roz.
 3. Acoperiți microplaca de capturare cu un capac pentru microplacă, Parafilm curat sau echivalent și incubați timp de 30-45 de minute la 20-25 °C.
 4. Treceți la „Spălare” pentru a continua testarea.

Spălare

Spălați microplaca de capturare folosind una dintre metodele de mai jos.

Metoda cu Automated Plate Washer

Țineți întotdeauna PORNIT Automated Plate Washer. Asigurați-vă că rezervorul de clătire este umplut și că rezervorul pentru deșeuri este gol. Automated Plate Washer va clăti în mod obișnuit sistemul pentru curățare. Consultați *Manualul de utilizare Automated Plate Washer* pentru instrucțiuni suplimentare.

- Asigurați-vă că rezervorul de spălare este umplut cel puțin până la semnul de 1 litru cu soluție tampon de spălare. În caz contrar, preparați soluția tampon de spălare (consultați „Soluție tampon de spălare”, pagina 35).
 - Asigurați-vă că rezervorul de clătire este umplut cu apă deionizată sau distilată.
 - Asigurați-vă că rezervorul pentru deșeuri este gol și capacul este fixat în siguranță.
 - Automated Plate Washer se va amorsa automat înainte de fiecare spălare și se va clăti după fiecare spălare.
 - Dacă se folosește doar o bandă parțială de godeuri ale microplăcii de capturare, amplasați godeurile goale ale microplăcii în microplaca de capturare pentru a completa coloana înainte de spălare.
1. Scoateți capacul microplăcii și amplasați microplaca de capturare pe platforma Automated Plate Washer.
 2. Asigurați-vă că Automated Plate Washer este PORNIT și că pe afișaj apare **Digene Wash Ready** (Spălare Digene pregătită) sau **P1**.
 3. Selectați numărul de benzi care trebuie spălate apăsând butonul **Rows** (Rânduri), apoi **+** sau **-** pentru reglare.
 4. Apăsați butonul **Rows** (Rânduri) pentru a reveni la **Digene Wash Ready** (Spălare Digene pregătită) sau **P1**.
 5. Apăsați butonul **Start/Stop** (Pornire/Oprire) pentru a începe.

Automated Plate Washer va efectua 6 cicluri de umplere și aspirație, care durează aproximativ 10 minute. Va exista o scurtă pauză în timpul programului; nu scoateți microplaca prea devreme.

Atunci când Automated Plate Washer a finalizat spălare, aceasta va afișa **Digene Wash Ready** (Spălare Digene pregătită) sau **P1**.

6. Scoateți microplaca de capturare de pe platforma Automated Plate Washer atunci când programul este terminat.

Microplaca de capturare trebuie să fie albă și nu trebuie să rămână lichid roz rezidual în godeurile microplăcii de capturare.

7. Treceți la „Amplificarea semnalului”, pagina 55 pentru a continua testarea.

Metoda de spălare manuală

1. Scoateți DR1 din godeurile microplăcii de capturare, amplasând prosoape Kimtowels curate sau prosoape echivalente din hârtie cu conținut redus de scame deasupra microplăcii de capturare.
2. Asigurați-vă că prosoapele din hârtie intră în contact cu întreaga suprafață a microplăcii de capturare și răsturnați cu atenție.
3. Lăsați microplaca de capturare să se scurgă timp de 1-2 minute.
4. Ștergeți bine pe prosoape Kimtowels curate sau prosoape echivalente din hârtie cu conținut redus de scame.

Aruncați cu atenție prosoapele din hârtie folosite pentru a evita contaminarea cu fosfatază alcalină.

5. Folosind aparatul de spălare, spălați manual microplaca de capturare de 6 ori.

Pentru o spălare adecvată, inundați fiecare godeu al microplăcii de capturare cu soluție tampon de spălare. Aceasta va scoate DR1 din partea de sus a godeurilor microplăcii de capturare. Spălarea începe de la godeul A1 al microplăcii de capturare și continuă în serpentină la dreapta și în jos. După ce s-au umplut toate godeurile microplăcii de capturare, turnați lichidul în chiuvetă cu o mișcare descendentă puternică. Cea de-a doua spălare începe de la godeul H12 al microplăcii de capturare, printr-o mișcare de serpentină la stânga și în sus. Această secvență de 2 spălări este repetată de încă 2 ori pentru un total de 6 spălări pe fiecare godeu al microplăcii de capturare.

6. După spălare, ștergeți microplaca de capturare prin răsturnare pe prosoape Kimtowels curate sau prosoape echivalente din hârtie cu conținut redus de scame și atingând ferm de 3-4 ori. Înlocuiți prosoapele din hârtie și ștergeți din nou.
7. Lăsați microplaca de capturare răsturnată și lăsați să se scurgă timp de 5 minute. Ștergeți încă o dată microplaca de capturare.

Microplaca de capturare trebuie să fie albă și nu trebuie să rămână lichid roz rezidual în godeurile microplăcii de capturare.

8. Treceți la „Amplificarea semnalului”, pagina 55 pentru a continua testarea.

Amplificarea semnalului

- Utilizați o nouă pereche de mănuși pentru manipularea DR2.
 - Adăugați reactiv deasupra microplăcii de capturare, de la stânga la dreapta, folosind o pipetă cu 8 canale.
 - Dacă nu este folosită o pipetă cu 8 canale, aceasta poate fi înlocuită de o pipetă de repetare. Divizați DR2 în părți alicote într-o eprubetă din polipropilenă de dimensiuni suficiente pentru a integra volumul necesar.
 - Adăugați DR2 fără întrerupere. Perioada de incubare a tuturor godeurilor microplăcii de capturare trebuie să fie cât mai mică posibil.
 - Asigurați-vă că nu atingeți părțile laterale ale godeurilor microplăcii de capturare și că nu stropiți vârful cu reactiv, în caz contrar, poate avea loc contaminarea încrucișată a eșantioanelor (consultați Figura 2, pagina 51).
1. Amestecați bine DR2 și transferați volumul aplicabil (după caz, consultați Tabel 1, pagina 31 sau Tabel 4, pagina 32) într-un rezervor de reactiv curat, de unică folosință.
 2. Pipetați cu grijă 75 µl de DR2 în fiecare godeu al microplăcii de capturare folosind tehnica de pipetare inversă descrisă anterior (consultați „Detecție hibrid”, pagina 52).
Asigurați-vă că toate godeurile microplăcii de capturare au fost umplute cu precizie, observând intensitatea culorii galbene; toate godeurile microplăcii de capturare trebuie să aibă o intensitate similară a culorii galbene.
 3. Acoperiți microplaca de capturare cu un capac pentru microplăci și incubați la 20-25 °C timp de 15 minute (și nu mai târziu de 30 de minute de la incubare).
Important: Evitați lumina directă a soarelui.
 4. Treceți la „Măsurarea microplăcii de capturare și generarea rezultatelor” pentru a continua testarea.

Măsurarea microplăcii de capturare și generarea rezultatelor

1. Măsurați microplaca de capturare folosind un instrument DML.
Consultați manualul de utilizare al software-ului respectiv pentru detalii despre măsurarea unei microplăci de capturare și generarea de rapoarte privind rezultatele testării. Software-ul de analiză a testului *digene* va permite introducerea informațiilor de testare pertinente.
2. Dacă nu s-a utilizat o microplacă de capturare completă, scoateți godeurile folosite ale microplăcii de capturare din rama microplăcii, clătiți bine rama microplăcii cu apă distilată sau deionizată, uscați și păstrați pentru următoarea testare.
3. Dacă nu se specifică altfel, aruncați toate părțile alicote de reactiv și reactivii preparați.
Diluati DNR-ul rămas în flacon înainte de eliminare, conform procedurilor de laborator naționale și locale.

Interpretarea rezultatelor

CO a testului *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test de 1pg/ml este echivalentă cu 100.000 copii HPV/ml sau 5.000 copii HPV/test.

Rezultatele testării eșantioanelor în STM

Eșantioanele în STM cu o valoare RLU/CO $\geq 1,0$ sunt considerate „positive” (pozitive) pentru 1 sau mai multe tipuri de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 și 68.

Eșantioanele în STM cu o valoare RLU/CO $< 1,0$ sunt considerate „negative” (negative) sau „no HPV DNA detected” (nu s-a detectat ADN HPV) pentru cele 13 tipuri de HPV testate. Secvențele de ADN HPV de mare risc sunt fie absente, fie nivelurile de ADN HPV sunt sub limita de detecție a testării.

Rezultatele testării eșantioanelor SurePath

Eșantioanele SurePath cu o valoare RLU/CO $\geq 1,0$ sunt considerate „positive” (pozitive) pentru 1 sau mai multe tipuri de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 și 68.

Eșantioanele SurePath cu o valoare RLU/CO $< 1,0$ sunt considerate „negative” (negative) sau „no HPV DNA detected” (nu s-a detectat ADN HPV) pentru cele 13 tipuri de HPV testate. Secvențele de ADN HPV sunt fie absente, fie nivelurile de ADN HPV sunt sub limita de detecție a testării.

Rezultatele testării eșantioanelor PreservCyt

Eșantioanele PreservCyt cu o valoare RLU/CO $\geq 1,0$ sunt considerate „positive” (pozitive) pentru 1 sau mai multe tipuri de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 și 68.

Eșantioanele PreservCyt cu o valoare RLU/CO $< 1,0$ sunt considerate „negative” (negative) sau „no HPV DNA detected” (nu s-a detectat ADN HPV) pentru cele 13 tipuri de HPV testate. Secvențele de ADN HPV sunt fie absente, fie nivelurile de ADN HPV sunt sub limita de detecție a testării.

Pentru eșantioanele PreservCyt cu o valoare RLU/CO $\geq 1,0$ și $< 2,5$, QIAGEN recomandă retestarea eșantionului, după cum urmează:

- Dacă valoarea RLU/CO a primei retestări este $\geq 1,0$, raportați eșantionul ca „positive” (pozitiv). Nu mai este necesară o altă testare.
- Dacă valoarea RLU/CO a primei retestări este $< 1,0$, este necesară o a doua retestare (al treilea rezultat). Al doilea rezultat este rezultatul final ($< 1,0$ este negativ, $\geq 1,0$ este pozitiv) și este raportat.

Valoare RLU/CO apropiată de 1,0

Dacă valoarea RLU/CO a unui eșantion este apropiată, dar mai mică de 1,0 și se suspectează infecția cu HPV de mare risc, luați în considerare metode alternative de testare și/sau repetarea unui eșantion.

Alte tipuri de HPV

Deoarece acest test detectează doar tipurile de HPV de mare risc 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 și 68, rețineți că în eșantion pot fi prezente și alte tipuri de HPV cu risc redus. Dacă testați special pentru prezența HPV cu risc redus cu transmitere sexuală, folosiți *digene* HC2 HPV DNA Test, care detectează tipuri de ADN HPV cu risc redus și de mare risc.

Verificarea calibrării testului

Verificarea calibrării testului este realizată pentru a vă asigura că reactivii, calibratoarele și substanțele de control al calității funcționează corect, permițând determinarea exactă a CO a testului. *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test necesită calibrarea testului la fiecare testare; prin urmare, este necesar să verificați fiecare test. Această procedură de verificare nu este concepută pentru a înlocui testarea cu substanțe interne de control al calității. Intervalele acceptabile pentru calibrarea testului și substanțele de control al calității au fost stabilite numai pentru instrumentele DML aprobate de QIAGEN.

Calibrarea testului se efectuează automat de către software-ul de analiză a testului *digene* și este tipărită în raportul de analiză a datelor. Cu toate acestea, utilizatorii care folosesc *digene* Qualitative Software versiunea 1.03 sau anterioară trebuie să efectueze manual verificarea calibrării testului înainte de a fi raportate rezultatele pacientelor. Contactați Serviciile Tehnice QIAGEN pentru mai multe informații.

Testarea trebuie să îndeplinească criteriile de calibrare a testului specificate. Dacă oricare dintre următoarele criterii sunt nevalide, software-ul nu va interpreta rezultatele eșantioanelor.

Calibrator negativ

NC trebuie să fie testat în triplicat la fiecare testare. NC mediu trebuie să fie ≥ 10 și ≤ 250 RLU, iar coeficientul de variație (Coefficient of Variation, CV) trebuie să fie $\leq 25\%$. Dacă CV este $> 25\%$, software-ul elimină valoarea RLU cea mai îndepărtată de medie, ca valoare extremă, și recalculază media și CV folosind valorile rămase.

Dacă CV rămâne > 25%, calibrarea testului este nevalidă și testarea trebuie repetată pentru toate eșantioanele pacienților. În consecință, nu raportați rezultatele eșantioanelor pacienților.

Calibrator pozitiv

HRC trebuie să fie testat în triplicat la fiecare testare. CV a HRC trebuie să fie $\leq 15\%$. Dacă CV este > 15%, software-ul elimină valoarea RLU cea mai îndepărtată de medie, ca valoare extremă, și recalculază media și CV folosind valorile rămase.

Dacă CV rămâne > 15%, calibrarea testului este nevalidă și testarea trebuie repetată pentru toate eșantioanele pacienților. În consecință, nu raportați rezultatele eșantioanelor pacienților.

Calibrator pozitiv mediu/calibrator negativ mediu

Software-ul folosește $HRC\bar{X}$ și $NC\bar{X}$ pentru a calcula $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$. Un raport $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$ valid este definit ca $2,0 \leq HRC\bar{X}/NC\bar{X} \leq 15$. Dacă $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$ este < 2,0 sau > 15, calibrarea testului este nevalidă și testarea trebuie repetată pentru toate eșantioanele pacienților. În consecință, nu raportați rezultatele eșantioanelor pacienților.

Calculul valorii de prag

Software-ul de analiză a testului *digene* calculează și raportează RLU/CO și rezultatele pozitive/negative pentru toate eșantioanele. CO pentru determinarea eșantioanelor pozitive este $HRC\bar{X}$. Software-ul de analiză a testului *digene* folosește valorile RLU ale eșantionului pentru a exprima rezultatele ca RLU/CO eșantion.

Pentru testarea automatizată cu RCS, protocolul testului HPV RCS aplică un factor de ajustare a calibrării (Calibration Adjustment Factor, CAF) de 0,8 la $HRC\bar{X}$ valid. Acest CAF este necesar astfel încât caracteristicile de performanță ale testării automatizate cu RCS să rămână echivalente cu testarea manuală. CAF se aplică doar rezultatelor testării automatizate cu RCS; prin urmare, este esențial să selectați protocolul de test corect pentru a genera rezultate exacte ale testării.

Substanțe de control al calității

Probele de control al calității sunt furnizate împreună cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test și trebuie utilizate pentru controlul intern al calității. Substanțele de control al calității furnizate sunt ținte ADN HPV clonate și nu sunt derivate din HPV de tip sălbatic. Acesta este același tip de material folosit pentru calibratoarele furnizate. Substanțele suplimentare de control al calității pot fi testate în conformitate cu instrucțiunile sau cerințele reglementărilor naționale sau locale sau ale organizațiilor de acreditare. Substanțele de control al calității furnizate nu vor acționa ca substanță de control al calității adecvată pentru procesarea PreservCyt Solution sau SurePath Preservative Fluid.

Consultați manualul de utilizare al software-ului de analiză a testului *digene* aplicabil pentru instrucțiuni privind introducerea numerelor de lot și a datelor de expirare ale substanțelor de control al calității. Pentru ca un test să fie valid, valoarea RLU/CO a fiecărei substanțe de control al calității trebuie să se încadreze în criteriile definite, după cum este specificat în Tabel 10 de mai jos. Dacă substanțele de control al calității nu se încadrează în aceste intervale, testul este nevalid și testarea trebuie repetată. În consecință, nu raportați rezultatele pacientelor.

Tabel 10. Criterii de validitate a testului cu substanțe de control al calității

Substanță de control al calității	Valoare RLU/CO minimă	Valoare RLU/CO maximă	CV (%)
QC1-LR	0,001	0,999	≤ 25
QC2-HR	2	8	≤ 25

Limitări

- *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test pentru tipurile de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 și 68 nu este recomandat pentru evaluarea suspiciunii de abuz sexual.
- Prevalența infecției cu HPV în rândul unei populații poate afecta performanța. Valorile predictive pozitive scad la testarea populațiilor cu prevalență scăzută sau a persoanelor fără risc de infecție.
- Un rezultat negativ al testării nu exclude posibilitatea unei infecții cu HPV, deoarece nivelurile foarte mici de infecție sau eroarea de recoltare a eșantionului pot genera un rezultat fals-negativ al testării. De asemenea, această testare nu detectează ADN-ul tipurilor de HPV cu risc redus (6, 11, 42, 43 și 44).
- Infecția cu HPV nu este un indicator definitiv al prezenței unei boli cervicale de grad înalt, nici nu implică în toate cazurile faptul că se va dezvolta o boală cervicală de grad înalt sau cancer.
- Există un nivel redus de hibridizare încrucișată între sonda HPV de mare risc și tipurile de HPV 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 și MM9. Pacientele cu eșantioane care conțin niveluri ridicate ale acestor tipuri de HPV pot fi trimise în mod eronat la colposcopie (15, 35).
- *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test este conceput pentru a detecta tipuri de HPV de mare risc, inclusiv 39, 58, 59 și 68. Studiile analitice efectuate de QIAGEN, folosind ADN de plasmide de HPV clonat, demonstrează că testarea detectează aceste tipuri la concentrații cuprinse între 0,62 pg/ml și 1,39 pg/ml. Aceasta este echivalentă cu caracteristicile de detecție a celorlalte tipuri de HPV vizate de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. QIAGEN a putut valida detecția acestor tipuri de HPV doar pe un număr limitat de eșantioane clinice. Din cauza prevalenței scăzute a acestor tipuri la populația generală (28), caracteristicile de performanță ale *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test pentru detecția tipurilor de HPV 39, 58, 59 și 68 nu au fost confirmate statistic.
- În cazul în care sunt prezente concentrații mari de cremă antifungică, gel contraceptiv sau cremă de duș contraceptivă la momentul recoltării unui eșantion în STM pentru testare, există probabilitatea obținerii unui rezultat fals -negativ dacă aceste eșantioane conțin niveluri de ADN HPV care generează valori RLU/CO apropiate de CO a testului.
- În cazul în care sunt prezente concentrații mari de cremă antifungică, gel lubrifiant vaginal sau sânge la momentul recoltării unui eșantion cervical PreservCyt pentru prepararea probelor cu QIASymphony DSP HPV Media Kit, există probabilitatea obținerii unui rezultat fals-negativ în cazul în care aceste eșantioane conțin niveluri de ADN HPV care generează valori RLU/CO apropiate de CO a testului.

-
- În cazul prezenței de gel contraceptiv la momentul recoltării unui eșantion cervical PreservCyt pentru prepararea probelor cu QIASymphony DSP AXpH DNA Kit, poate apărea un rezultat fals-negativ al testării.
 - În cazul prezenței de gel contraceptiv, cremă antifungică sau cremă antiinflamatoare la momentul recoltării unui eșantion cervical SurePath pentru prepararea probelor cu QIASymphony DSP HPV Media Kit, poate apărea un rezultat fals-negativ al testării.
 - Este posibilă reactivitatea încrucișată între sonda HPV de mare risc și plasmida pBR322. Prezența secvențelor omoloage pBR322 a fost raportată la eșantioanele genitale umane și s-au putut produce rezultate fals-pozitive în prezența unor niveluri ridicate de plasmidă bacteriană.
 - Atunci când efectuați testarea automatizată cu RCS, dacă nu observați vizual placa de hibridizare pentru a vă asigura de transferul corect al eșantioanelor și dacă nu corectați posibilul transfer inadecvat al eșantioanelor puteți obține rezultate fals-negative.

Caracteristici de performanță

Performanța clinică la screeningul pacientelor cu frotiu normal de Papanicolau este un ajutor în evaluarea riscului pentru managementul pacientelor

Mai jos sunt descrise rezultatele a 8 studii clinice independente efectuate de instituții medicale, academice și guvernamentale importante la centrele din Statele Unite și din străinătate. Studiile au utilizat metodele Papanicolau consacrate, utilizate în țările în care a fost realizat studiul. În toate studiile, cu excepția a 2 cazuri, sistemul de clasificare Bethesda a fost utilizat pentru a interpreta rezultatele Papanicolau. Pentru terminologia echivalentă cu screeningul cancerului de col uterin în Comunitatea Europeană, consultați Ghidul european pentru asigurarea calității în screeningul cancerului de col uterin (36). În plus, boala cervicală de grad înalt a fost diagnosticată prin utilizarea biopsiei prelevate prin colposcopie pentru fiecare studiu. Aceste studii au evaluat utilitatea clinică a *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test în comparație cu frotiul Papanicolau pentru femeile cu vârsta mai mare (în general peste 30 de ani). Toate studiile, cu excepția unui caz, au efectuat testarea pentru HPV prospectivă, folosind *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Studiile au fost studii transversale de screening la populația generală, utilizând *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, cu excepția cazului în care se menționează altceva mai jos. Două dintre studii au fost efectuate în Statele Unite, 2 în Europa, 2 în America Latină, unul în Africa și unul în Asia.

Performanța *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test observată la 6 studii transversale este sintetizată (consultați Tabelele 11 și 12 de mai jos) pentru femei cu vârsta de minim 30 de ani inclusiv, diagnosticate cu neoplazie cervicală de grad înalt confirmată histologic, care este definită ca neoplazie cervicală intraepitelială (Cervical Intraepithelial Neoplasia, CIN) cel puțin stadiul 3.

Tabel 11. Estimări ale performanței – sensibilitate și specificitate

Populație	n	Sensibilitate (%)			Specificitate (%)		
		(n/N)			(n/N)		
		95% interval de încredere (Î)			Î 95%		
		Doar Papanicolau	Doar HPV	HPV + Pap	Doar Papanicolau	Doar HPV	HPV + Pap
Europa de Vest 1	7592	51,6 (14/27) 32,0-71,3	96,3 (26/27) 81,0-99,9	100,0 (27/27) 87,2-100,0	98,5 (7453/7565) 98,2-98,8	96,2 (7275/7565) 95,7-96,6	95,1 (7193/7565) 94,6-95,6
America Latină 1	6115	58,4 (45/77) 46,68-69,6	94,8 (73/77) 87,2-98,6	97,4 (75/77) 90,9-99,7	98,7 (5962/6038) 98,4-99,0	93,9 (5669/6038) 93,3-94,5	93,4 (5637/6038) 92,7-94,0
America Latină 2*	6176	77,9 (53/68) 66,2-87,1	89,7 (61/68) 79,9-95,8	94,1 (64/68) 85,6-98,4	94,1 (5745/6108) 93,4-94,6	94,0 (5742/6108) 93,4-94,6	89,9 (5490/6108) 89,1-90,6
Africa	2925	84,1 (90/107) 75,8-90,5	89,7 (96/107) 82,4-94,8	92,5 (99/107) 85,8-96,7	86,4 (2436/2818) 85,1-87,7	80,0 (2253/2818) 78,4-81,4	76,4 (2152/2818) 74,8-77,9
Asia	1936	97,6 (41/42) 87,4-99,9	100,0 (42/42) 91,6-100,0	100,0 (42/42) 91,6-100,0	76,3 (1445/1894) 74,3-78,2	83,0 (1572/1894) 81,2-85,0	68,0 (1287/1894) 65,8-70,1
SUA 1	1040	50,0 (1/2) 1,26-98,7	100,0 (2/2) 15,8-100,0	100,0 (2/2) 15,8-100,0	97,6 (1013/1038) 96,5-98,4	96,2 (999/1038) 94,9-97,3	95,5 (991/1038) 94,0-96,7

* Date ale *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, dacă acestea sunt disponibile, altfel fiind folosite datele HCS; date combinate.

Tabel 12. Estimări ale performanței – valoare predictivă pozitivă și negativă

Populație	n	Prevalență	Valoare predictivă pozitivă (%)			Valoare predictivă negativă (%)		
		CIN 3 (%)	(n/N)			(n/N)		
		(n/N)	ÎI 95%			ÎI 95%		
		ÎI 95%	Doar Papanicolau	Doar HPV	HPV + Pap	Doar Papanicolau	Doar HPV	HPV + Pap
Europa de Vest 1	7592	0,36 (27/7592) 0,23-0,52	11,1 (14/126) 6,2-17,9	8,23 (26/316) 5,5-11,8	6,77 (27/399) 4,5-9,7	99,83 (7453/7466) 99,7-99,9	99,99 (7275/7276) 99,9-100,0	100,0 (7193/7193) 99,9-100,0
America Latină 1	6115	1,26 (77/6115) 0,99-1,57	37,2 (45/121) 28,6-46,4	16,5 (73/442) 13,2-20,3	15,8 (75/476) 12,6-19,4	99,47 (5962/5994) 99,3-99,6	99,93 (5669/5673) 99,8-100,0	99,96 (5637/5639) 99,9-100,0
America Latină 2*	6176	1,10 (68/6176) 0,86-1,39	12,7 (53/416) 9,7-16,3	14,3 (61/427) 11,1-18,0	9,4 (64/682) 7,3-11,8	99,74 (5745/5760) 99,6-99,9	99,88 (5742/5749) 99,8-100,0	99,93 (5490/5494) 99,8-100,0
Africa	2925	3,66 (107/2925) 3,01-4,40	19,1 (90/472) 15,6-22,9	14,5 (96/661) 11,9-17,4	12,9 (99/765) 10,6-15,5	99,31 (2436/2453) 98,9-99,6	99,51 (2253/2264) 99,1-99,8	99,63 (2152/2160) 99,3-99,8
Asia	1936	2,17 (42/1936) 1,57-2,92	8,37 (41/490) 6,1-11,2	11,5 (42/364) 8,4-15,3	6,47 (42/649) 4,7-8,7	99,93 (1445/1446) 99,6-100,0	100,0 (1572/1572) 99,8-100,0	100,0 (1287/1287) 99,7-100,0
SUA 1	1040	0,19 (2/1040) 0,02-0,69	3,85 (1/26) 0,1-19,6	4,88 (2/41) 0,6-16,5	4,08 (2/49) 0,5-14,0	99,90 (1013/1014) 99,5-100,0	100,0 (999/999) 99,6-100,0	100,0 (991/991) 99,6-100,0

* Date ale *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, dacă acestea sunt disponibile, altfel fiind folosite datele HCS; date combinate.

În toate studiile, există o îmbunătățire uniformă și, adesea, foarte semnificativă, a sensibilității *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, raportat doar la Papanicolau. La fel ca în cazul sensibilității, valoarea predictivă negativă a HPV o depășește pe cea a testului Papanicolau în toate cazurile, apropiindu-se de 100%. Această valoare predictivă negativă demonstrează probabilitatea ridicată a absenței unei boli cervicale de grad înalt sau a cancerului la femeile cu o citologie normală, care nu sunt infectate cu HPV.

Deși specificitatea *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test este mai mică decât cea a testului Papanicolau, analiza raportului de probabilitate a demonstrat că scăderea specificității observate nu este suficient de semnificativă pentru a afecta utilitatea clinică a utilizării testării pentru identificarea femeilor care prezintă un risc redus sau care nu prezintă niciun risc de a avea sau de a dezvolta o afecțiune cervicală. Cu toate acestea, este important ca decizia de a trimite o pacientă la colposcopie să se bazeze pe toate informațiile clinice și de risc și pe istoricul pacientei, aflat la dispoziția medicului. Variabilele importante includ istoricul infecției cu HPV și/sau al unui frotiu anormal de Papanicolau, vârsta la primul act sexual, numărul partenerilor sexuali și bolile concomitente cu transmitere sexuală (37, 38).

Deși prevalența bolii de grad înalt nu variază semnificativ în rândul studiilor din care a fost determinată performanța, prevalența infecției cu HPV în rândul unei populații poate afecta performanța și variază de obicei în funcție de populația de pacienți. În plus, prevalența infecției cu HPV s-a dovedit a scădea dramatic odată cu vârsta (17, 24-29, 38-40). Valorile predictive pozitive scad la testarea populațiilor cu prevalență scăzută sau a persoanelor cu risc redus de infecție.

Analiza longitudinală a fost efectuată folosind rezultatele a 2 studii; unul realizat în Statele Unite de Institutul Național al Cancerului (National Cancer Institute, NCI) din Portland, Oregon, iar celălalt realizat în Franța la Laboratoire Pol Bouin C.H.U. de Reims. Aceste analize longitudinale au fost întreprinse pentru a demonstra că pacientele negative la Papanicolau/negative la HPV prezintă un risc mai mic de a avea afecțiuni cervicale, comparativ cu femeile cu risc redus, definit tradițional, a căror situație HPV nu este cunoscută și comparativ cu pacientele negative la Papanicolau/pozitive la HPV (consultați Tabelele 13 și 14 de mai jos).

Tabel 13. Analiza longitudinală – risc relativ de afecțiune de grad înalt

Grup de studiu	Vârsta	Clasificare risc redus	n	Cazuri de CIN 3	Rată (la 100 ani-pacient)	Risc relativ (Î 95%)
NCI	Peste 30 de ani inclusiv	Pap normal, HPV negativ	12.054	28	0,043	0,897 (0,596-1,348)
		Teste Papanicolau normale consecutive*	9429	19	0,048	1,000
	Toate	Pap normal, HPV negativ	17.594	48	0,056	0,678 (0,514-0,894)
		Teste Papanicolau normale consecutive*	13.392	44	0,082	1,000
Franța	Peste 30 de ani inclusiv	Pap normal, HPV negativ	1690	3	0,084	0,849 (0,307-2,35)
		Teste Papanicolau normale consecutive†	2026	4	0,099	1,000
	Toate	Pap normal, HPV negativ	2180	3	0,066	0,491 (0,221-1,09)
		Teste Papanicolau normale consecutive†	2650	7	0,136	1,000

*Trei teste Papanicolau normale în aproximativ 2 ani.

† Două teste Papanicolau normale în aproximativ 2 ani.

Tabel 14. Analiza longitudinală - rate de îmbolnăvire stratificate după stadiul HPV la linia de bază

Grup de studiu	Vârsta	Stadiu linie de bază	n	Cazuri de CIN 3	Rată (la 100 ani-pacient)	Risc relativ (ÎI 95%)
NCI	Peste 30 de ani inclusiv	Pap normal, HPV pozitiv	1078	24	0,451	10,50 (6,13-18,0)
		Pap normal, HPV negativ	12.054	28	0,043	1,00
	Toate	Pap normal, HPV pozitiv	2561	63	0,096	10,64 (7,33-15,5)
		Pap normal, HPV negativ	17.594	48	0,056	1,00
Franța	Peste 30 de ani inclusiv	Pap normal, HPV pozitiv	419	14	2,346	27,3 (8,41-88,3)
		Pap normal, HPV negativ	1696	3	0,084	1,00
	Toate	Pap normal, HPV pozitiv	619	22	2,520	37,0 (11,8-116)
		Pap normal, HPV negativ	2180	3	0,066	1,00

Utilitatea clinică a rezultatului testării HPV este demonstrată în continuare de riscul crescut de boli cervicale la femeile pozitive la HPV, comparativ cu femeile negative la HPV.

Performanță clinică la screeningul pacientelor cu rezultate de frotiu de Papanicolau ASC-US pentru a determina necesitatea trimerii la colposcopie

Un studiu intitulat „Utility of HPV DNA Testing for Triage of Women with Borderline Pap Smears” (Utilitatea testării pentru ADN HPV pentru triajul femeilor cu frotiuri Papanicolau la limită) a fost realizat în SUA în 1996, sub îndrumarea Kaiser Foundation Research Institute și Kaiser Permanente Medical Group. Eșantioanele cervicale pentru frotiul de Papanicolau de rutină și pentru *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test au fost obținute de la femeile care s-au prezentat la mai multe unități ale clinicii Kaiser. Frotiurile inițiale de Papanicolau au fost evaluate conform Clasificării Bethesda. Pentru terminologia echivalentă cu screeningul cancerului de col uterin în Comunitatea Europeană, consultați Ghidul european pentru asigurarea calității în screeningul cancerului de col uterin (36). Femeile (cu vârsta de 15 ani inclusiv) cu rezultate de frotiu Papanicolau cu celule scuamoase atipice cu semnificație nedeterminată (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance, ASC-US) au revenit pentru colposcopie și biopsie. Eșantioanele histologice prelevate prin colposcopie au fost examinate de patologi și a fost pus un diagnostic inițial. De asemenea, fiecare eșantion histologic a fost examinat de un patolog independent, iar discrepanțele dintre examinarea inițială și examinarea independentă au fost soluționate de un al treilea patolog.

Eșantionul inițial a fost testat cu un prototip al *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, care a conținut sonde pentru 11 dintre cele 13 tipuri de HPV (cu excepția tipurilor de HPV 59 și 68). Această diferență nu ar fi de așteptat să conducă la un profil de performanță semnificativ diferit pentru testare.

Rezultatele testării pentru ADN HPV de mare risc și diagnosticele histologice au fost disponibile de la 885 de femei cu frotiuri de Papanicolau ASC-US. Testarea la majoritatea pacientelor a fost efectuată cu eșantioane recoltate atât în STM, cât și în PreservCyt Solution. Datorită asemănărilor dintre caracteristicile de performanță ale *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test pentru STM și PreservCyt Solution, performanța testului este prezentată numai pentru PreservCyt Solution.

Printre cele care se prezintă cu un frotiu Papanicolau cu trimitere pentru ASC-US, valoarea predictivă negativă a *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test pentru depistarea HSIL sau a unei afecțiuni mai serioase la colposcopie este de 99% (consultați Tabel 15 de mai jos).

Tabel 15. Compararea *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test cu histologia de consens; populație de Papanicolau cu trimitere pentru ASC-US; studiu Kaiser, eșantioane PreservCyt

		HSIL sau mai grav la momentul colposcopiei		Total
		+	-	
Rezultat <i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA Test	+	66	317	383
	-	5	497	502
Total		71	814	885

Sensibilitate [TP/(TP+FN)] = 93,0% (66/71)
 ÎI 95% = 84,3-97,7
 Specificitate [TN/(TN+FP)] = 61,1% (497/814)
 ÎI 95% = 57,7-64,4
 Prevalența bolii = 8,0% (71/885)
 Valoare predictivă pozitivă a testului = 17,2% (66/383)
 Valoare predictivă negativă a testului = 99,0% (497/502)

Se determină valorile predictive pozitive și negative teoretice, pe baza diferitelor prevalențe pentru un ASC-US inițial, depistat ca HSIL sau mai grav, pe baza rezultatelor testării pentru HPV de mare risc (consultați Tabel 16 de mai jos).

Tabel 16. Valoarea predictivă pozitivă și negativă teoretică a testării pentru HPV de mare risc a rezultatelor frotiului Papanicolau ASC-US

Prevalență teoretică pentru HSIL	Rezultat inițial frotiu Papanicolau ASC-US	
	Valoare predictivă pozitivă a testului	Valoare predictivă negativă a testului
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

Se determină variația dintre diferitele grupe de vârstă incluse în acest studiu (consultați Tabel 17 de mai jos).

Tabel 17. Datele studiului Kaiser: Performanța *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test comparativ cu rezultatele histologice de consens (HSIL) – caracteristici specifice vârstei

	Vârsta < 30 de ani	Vârsta cuprinsă între 30 și 39 de ani	Vârsta > 39 de ani
n	287	233	365
Prevalența bolii (%)	12,2	11,2	2,7
Sensibilitate (%)	100	88,46	80,0
(n/N)	(35/35)	(23/26)	(8/10)
ÎI 95%	90,0-100,0	69,9-97,6	44,4-97,5
Specificitate (%)	31,4	66,2	79,15
(n/N)	(79/252)	(132/207)	(281/355)
ÎI 95%	25,7-37,5	59,3-72,6	74,6-83,3
Valoare predictivă negativă (%)	100,0	97,86	99,29
(n/N)	(79/79)	(137/140)	(281/283)
Valoare predictivă pozitivă (%)	16,83	24,73	9,76
(n/N)	(35/208)	(23/93)	(8/82)

Sensibilitate și specificitate clinică pentru determinarea riscului de boală de grad înalt la femeile cu frotiuri Papanicolau LSIL sau HSIL

Un studiu clinic multicentric folosind *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test a fost realizat folosind eșantioane recoltate de la mai multe spitale mari, cu prevalență de afecțiuni cervicale grave și HPV și clinici medicale de colposcopie (3 unități) din vestul și sudul Statelor Unite. Testarea pentru HPV a fost efectuată în 3 unități de investigație care nu sunt afiliate cu clinicile de colposcopie de unde au fost recoltate eșantioanele. Populația pentru acest studiu clinic a fost formată din femei diagnosticate cu LSIL sau cu HSIL, pe baza unui frotiu Papanicolau recent și trimise la colposcopie de monitorizare. Din 702 de paciente înscrise, 327 au avut rezultate de frotiu Papanicolau mai grave decât ASC-US și au avut la dispoziție informații adecvate; 96 dintre acestea au avut un stadiu de boală terminal HSIL sau mai grav.

Eșantioanele de celule scuamoase cervicale exfoliate au fost obținute fie cu *digene* HC2 DNA Collection Device și apoi amplasate în STM, fie cu un dispozitiv de tip mătură care a fost apoi clătit în PreservCyt Solution. Eșantioanele au fost recoltate la momentul colposcopiei. Eșantioanele au fost testate cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, iar rezultatele au fost comparate cu stadiul bolii determinat pentru fiecare pacientă. Stadiul bolii s-a bazat pe rezultatele evaluării histologice. Cu toate acestea, când histologia a fost negativă sau în absența unui rezultat histologic, stadiul bolii a fost determinat prin citologie în momentul examinării de colposcopie (consultați Tabel 18 de mai jos).

digene HC2 High-Risk HPV DNA Test a fost efectuat la 3 mari centre medicale metropolitane neafiliate la unitățile care au recoltat eșantioanele la colposcopie. Citologia a fost efectuată la un laborator de patologie de referință, iar histologia a fost efectuată la instituțiile care efectuează colposcopia. Rezultatele testării au fost comparate cu stadiul bolii pentru a evalua sensibilitatea, specificitatea și valorile predictive negative și pozitive ale testării pentru detecția neoplaziei cervicale de grad înalt. Datorită asemănărilor dintre caracteristicile de performanță ale *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test pentru STM și PreservCyt Solution, performanța testului este prezentată numai pentru PreservCyt Solution. Nu s-a observat nicio diferență între rezultatele testării pentru HPV de mare risc din eșantioane în STM și eșantioane în PreservCyt.

Tabel 18. Algoritmul de determinare a stadiului bolii pacientei

Rezultat citologic	Rezultat histologic	Stadiul bolii
Negativ	Negativ sau nerealizat*	Negativ
LSIL	Negativ	LSIL
HSIL	Negativ	HSIL
Cancer	Negativ	HSIL+
Negativ	LSIL	LSIL
LSIL	Nerealizat*	LSIL
LSIL	LSIL	LSIL
HSIL	LSIL	LSIL
Cancer	LSIL	LSIL
Negativ	HSIL	HSIL
LSIL	HSIL	HSIL
HSIL	HSIL	HSIL
HSIL	Nerealizat*	HSIL
Cancer	HSIL	HSIL
Negativ	Cancer	HSIL+
LSIL	Cancer	HSIL+
HSIL	Cancer	HSIL+
Cancer	Nerealizat*	HSIL+
Cancer	Cancer	HSIL+

* Biopsia și/sau chiuretajul endocervical (Endocervical Curettage, ECC) nu au fost efectuate deoarece nu au fost observate anomalii la colposcopie sau nu a fost disponibil rezultatul histologic.

Performanța *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test a fost determinată folosind 327 de eșantioane PreservCyt, dintre care 96 au fost recoltate de la femei diagnosticate cu boală cervicală de grad înalt (consultați Tabelele 19 și 20 de mai jos). Comparațiile au fost făcute folosind toate pacientele studiate cu rezultate anormale la trimiterea pentru testare Papanicolau.

Tabel 19. Rezultatele testării pentru HPV de mare risc

		Rezultat HPV de mare risc	Stadiu terminal al bolii HSIL		Stadiu terminal al bolii LSIL		Stadiu terminal al bolii negativ		Total
			+	-	+	-	+	-	
Rezultat trimitere frotiu Papanicolau	LSIL		44	4	78	33	28	37	224
	HSIL		45	3	29	14	5	7	103
	Total		89	7	107	47	33	44	327
Total			96		154		77		327

digene HC2 High-Risk HPV DNA Test a demonstrat aproximativ 93% sensibilitate generală pentru identificarea femeilor cu neoplazie de grad înalt într-o populație trimisă la colposcopie pe baza diagnosticului de frotiu Papanicolau de LSIL, HSIL sau echivalent (consultați Tabel 20 de mai jos). De asemenea, testarea a demonstrat o valoare predictivă negativă de aproape 95% la această populație.

Tabel 20. Caracteristicile de performanță ale testării ADN HPV de mare risc la pacientele cu trimitere pentru un frotiu Papanicolau LSIL sau mai grav și un stadiu terminal al bolii HSIL

		Stadiu terminal al bolii		Total
		HSIL	LSIL sau negativ	
Rezultat <i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA Test	+	89	140	229
	-	7	91	98
	Total	96	231	327

Sensibilitate [TP/(TP+FN)] = 92,7% (89/96)
 ÎI 95% = 85,6-97,0
 Specificitate [TN/(TN+FP)] = 39,4% (91/231)
 ÎI 95% = 33,1-46,0
 Prevalența bolii pentru LSIL la trimitere până la HSIL terminal = 21,4%
 Prevalența bolii pentru HSIL la trimitere până la HSIL terminal = 46,6%
 Valoare predictivă pozitivă generală = 38,9% (89/229)
 Valoare predictivă negativă generală = 92,8% (91/98)

Deși specificitatea *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test a părut să fie oarecum scăzută, nu se așteaptă o corelație strictă între absența neoplaziei și un rezultat negativ la HPV. ADN-ul HPV poate fi prezent la femeile care nu au progresat în boala de grad superior. De fapt, la testarea pentru HPV prin reacție de polimerizare în lanț (Polymerase Chain Reaction, PCR) (un test destinat exclusiv cercetării) pe eșantioane cu rezultate pozitive la *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test și a cărei stadiu corespunzător al bolii a fost mai mic decât neoplazia de grad redus, aproape 75% au fost pozitive.

Au fost determinate valorile predictive pozitive și negative teoretice ale *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test pentru rezultatele inițiale LSIL sau HSIL de frotiu Papanicolau, care s-au dovedit a fi HSIL sau o boală mai gravă la colposcopie (consultați Tabel 21 de mai jos).

Tabel 21. Valoarea predictivă pozitivă și negativă teoretică a *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test pentru rezultatele inițiale LSIL sau HSIL de frotiu Papanicolau

Prevalență teoretică pentru HSIL	Rezultat inițial frotiu Papanicolau LSIL sau HSIL	
	Valoare predictivă pozitivă a testului	Valoare predictivă negativă a testului
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

Performanță vaginală sau autorecoltare

În literatura de specialitate citată pentru performanța *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test din eșantioane vaginale auto-recoltate, au fost înscrise peste 141.000 de femei cu vârsta cuprinsă între 16 și 54 de ani. Grupurile de studiu au inclus femei din China (41, 42), Mexic (43, 44) și Regatul Unit (45). Modelele de studiu au variat ușor, dar, în general, femeilor cu un rezultat pozitiv al testării li s-a oferit o examinare suplimentară prin colposcopie, iar rezultatele au fost raportate din punct de vedere al sensibilității și specificității față de metoda comparativă.

În două studii în care au fost disponibile date pentru compararea eșantioanelor auto-recoltate cu eșantioanele recoltate de medic, rezultatele indică o sensibilitate ridicată pentru CIN2+ pentru ambele metode (42, 45), 81-85% pentru eșantioane auto-recoltate față de 96-100 % pentru eșantioane recoltate de medic. Rezultatele specificității au fost similare pentru CIN2+ pentru ambele metode (42, 45), 81-82% pentru eșantioane auto-recoltate față de 83-85% pentru eșantioane recoltate de medic. În alte studii doar cu date de performanță auto-recoltate disponibile, performanța sensibilității *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test pentru CIN2+ a fost de 3,4 ori mai mare decât citologia (43) și o sensibilitate de 98% înainte de ajustarea abaterii de verificare (44).

Sensibilitate analitică

A fost testat un panel non-clinic de ADN de plasmidă de HPV clonat pentru a stabili dacă fiecare dintre cele 13 tipuri de HPV pot fi detectate de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test și pentru a stabili sensibilitatea analitică a testului pentru fiecare tip de HPV. Fiecare concentrație a țintei HPV (100 pg/ml, 10 pg/ml, 2,5 pg/ml, 1,0 pg/ml, 0,5 pg/ml și 0,2 pg/ml) pentru fiecare dintre cele 13 tipuri de ADN HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 and 68) a fost rulată în triplicat. RLU mediu pentru fiecare concentrație a fiecărui tip de HPV a fost calculat și comparat cu calibratorul pozitiv.

A fost determinată limita detectabilă a fiecărui tip de HPV în STM (consultați Tabel 22 de mai jos). Limitele detectabile au variat de la 0,62 pg/ml la 1,39 pg/ml, în funcție de tipul de HPV testat. Limita detectabilă medie pentru toate cele 13 tipuri de ADN HPV a fost de 1,08 pg/ml cu o abatere standard de 0,05 pg/ml.

Tabel 22. Rezumatul limitelor detectabile de sensibilitate pentru fiecare tip de ADN HPV în STM

Tip de ADN HPV	Concentrație detectabilă de ADN HPV (pg/ml)	Abatere standard	IÎ 95%
16	1,09	0,06	0,94-1,29
18	1,05	0,05	0,88-1,29
31	1,01	0,05	0,91-1,15
33	1,35	0,02	1,26-1,45
35	1,11	0,05	0,95-1,31
39	1,39	0,09	1,16-1,71
45	1,14	0,04	0,99-1,35
51	0,78	0,10	0,70-0,88
52	1,37	0,06	1,21-1,58
56	0,62	0,04	0,58-0,67
58	0,82	0,04	0,73-0,94
59	1,10	0,06	1,00-1,21
68	1,19	0,04	1,03-1,39
Medie (toate tipurile)	1,08	0,05	0,95-1,25

Echivalență între tipurile de eșantioane

Echivalență între eșantioanele în STM și PreservCyt

Echivalența între eșantioanele în STM și PreservCyt a fost examinată pentru recuperarea uniformă a ADN-ului HPV 18. Aproximativ 106 celule HeLa pozitive conținând genomurile HPV 18 integrate au fost îmbogățite în STM și într-un grup de celule negative PreservCyt. Fiecare tip de eșantion a fost procesat în conformitate cu procedurile de preparare și denaturare ale probelor respective, așa cum este descris în instrucțiunile de utilizare aplicabile și testat cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Rezultatele au demonstrat că recuperarea ADN-ului HPV 18 din celulele carcinomului uman este echivalentă pentru cele două medii și că prepararea probelor în PreservCyt Solution nu afectează sensibilitatea analitică a *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Echivalența dintre prepararea manuală a probelor de eșantioane PreservCyt și prepararea probelor de eșantioane PreservCyt folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit

Studiile au fost efectuate folosind eșantioane PreservCyt recoltate dintr-o subpopulație de femei cu citologie normală (n = 1276) și o subpopulație de femei cu o citologie a ASC-US sau mai mare decât ASC-US (n = 402). Prepararea manuală a probelor și prepararea probelor folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit au fost efectuate pentru fiecare eșantion, urmate de testarea automatizată cu RCS cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test (consultați Tabel 23 de mai jos).

Tabel 23. Acordul rezultatelor eșantioanelor PreservCyt între prepararea manuală a probelor și prepararea probelor folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit (n = 1678)

Acord pozitiv (%) (n/N) ÎI 95%		Acord negativ (%) (n/N) ÎI 95%	
Toate pozitive	Regiune puternic pozitivă RLU/CO ≥ 2,5	Toate negative	Regiune puternic negativă RLU/CO < 0,8
96,0	97,6	96,2	99,1
(409/426)	(372/381)	(1204/1252)	(1173/1184)
93,7-97,5	95,6-98,8	95,0-97,1	98,3-99,5

Sensibilitatea relativă a testului și specificitatea eșantioanelor PreservCyt preparate folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit se corelează foarte mult cu rezultatele obținute folosind metoda de preparare manuală a probelor, astfel cum rezultă din limita inferioară a 95% ÎI atât pentru acordul pozitiv, cât și pentru acordul negativ.

Echivalența dintre prepararea manuală a probelor de eșantioane PreservCyt și prepararea probelor de eșantioane PreservCyt folosind QIASymphony DSP AXpH DNA Kit

Studiile au fost efectuate folosind eșantioane PreservCyt recoltate dintr-o subpopulație de femei cu vârsta de cel puțin 30 de ani inclusiv cu citologie normală (n = 1901) și o subpopulație de femei cu o citologie ASC-US (n = 398). Prepararea manuală a probelor și prepararea probelor folosind QIASymphony DSP AXpH DNA Kit au fost efectuate pentru fiecare eșantion, urmate de testarea cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test (consultați Tabel 24 de mai jos).

Tabel 24. Acordul rezultatelor eșantioanelor PreservCyt între prepararea manuală a probelor și prepararea probelor folosind QIASymphony DSP AXpH DNA Kit (n = 2299)

Acord pozitiv (%) (n/N) ÎI 95%		Acord negativ (%) (n/N) ÎI 95%	
Toate pozitive	Regiune puternic pozitivă RLU/CO ≥ 2,5	Toate negative	Regiune puternic negativă RLU/CO < 0,8
92,7 (281/303) 89,3-95,2	96,5 (245/254) 93,4-98,1	99,1 (1978/1996) 98,6-99,4	99,9 (1967/1969) 99,6-100,0

Sensibilitatea relativă a testului și specificitatea eșantioanelor PreservCyt preparate folosind QIASymphony DSP AXpH DNA Kit se corelează foarte mult cu rezultatele obținute folosind metoda de preparare manuală a probelor, astfel cum rezultă din limita inferioară a 95% ÎI atât pentru acordul pozitiv, cât și pentru acordul negativ.

Echivalența dintre prepararea probelor în STM și prepararea manuală a probelor de tip peleți celulari post-gradient SurePath

A fost realizată o evaluare clinică în două faze folosind 6 centre de recoltare și 3 unități de testare din Statele Unite. Pacientele care s-au prezentat la o clinică de BTS, o clinică de obstetrică/ginecologie, o clinică de colposcopie, un spital sau un centru de planificare familială au fost eligibile pentru înscriere în conformitate cu criteriile prestabilite de includere și excludere. Faza de fezabilitate, destinată determinării unei valori CO *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test aplicabile pentru utilizarea cu probe sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath, a înscris aproximativ 400 de paciente. Faza de validare clinică, care a înscris aproximativ 1500 de paciente pentru a valida valoarea CO aleasă, a început după ce o analiză intermediară a fazei de fezabilitate a demonstrat că o CO de 1,0 RLU/CO folosind probe sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath a produs un acord acceptabil cu rezultatele eșantioanelor în STM.

În ambele faze de evaluare, au fost recoltate perechi de eșantioane cervicale SurePath și STM de la fiecare participant de sex feminin care și-a exprimat consimțământul. După aceea, eșantionul SurePath a fost trimis la un laborator de citologie pentru prepararea lamelelor. După prepararea citologică, probele sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath rămase și eșantionul în STM corespondent au fost testate cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test folosind o CO de 1,0 RLU/CO (consultați Tabel 25 de mai jos).

Tabel 25. Acordul rezultatelor probelor sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath cu rezultatele eșantioanelor în STM (toate vârstele și clasificările citologice) (n = 1490)

Acord pozitiv (%) (n/N) ÎI 95%		Acord negativ (%) (n/N) ÎI 95%	
Toate pozitive	Regiune puternic pozitivă RLU/CO ≥ 2,5	Toate negative	Regiune puternic negativă RLU/CO < 0,8
93,5	96,4	95,3	96,0
(401/429)	(378/392)	(1011/1061)	(1002/1044)
90,7-95,6	94,1-98,0	93,8-96,5	94,6-97,1

Sensibilitatea relativă a testului și specificitatea testării probelor sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath se corelează foarte mult cu rezultatele obținute la testarea eșantioanelor în STM, astfel cum rezultă din limita inferioară a 95% ÎI atât pentru acordul pozitiv, cât și pentru acordul negativ.

Echivalența dintre prepararea manuală a probelor sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath și prepararea probelor de eșantioane SurePath folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit

Studiile au fost efectuate folosind eșantioane SurePath recoltate de la următoarele subpopulații:

- Femei cu citologie normală (n = 1189)
- Femei cu o citologie ASC-US sau mai gravă decât ASC-US (n = 199)

Pentru fiecare eșantion SurePath, s-au efectuat prepararea probelor de eșantion SurePath folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit și pregătirea manuală a probelor sub formă de peleți celulari post-gradient. Testarea automatizată cu RCS cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test (consultați Tabel 26 de mai jos) a fost efectuată pentru fiecare dintre probele preparate.

Tabel 26. Acordul rezultatelor dintre prepararea manuală a probelor SurePath și prepararea probelor de eşantioane SurePath folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit (n = 1388)

Acord pozitiv (%) (n/N) ÎI 95%		Acord negativ (%) (n/N) ÎI 95%	
Toate pozitive	Regiune puternic pozitivă RLU/CO ≥ 2,5	Toate negative	Regiune puternic negativă RLU/CO < 0,8
91,7	97,5	99,0	99,7
(222/242)	(192/197)	(1134/1146)	(1124/1127)
87,6-94,6	94,2-98,9	98,2-99,4	99,2-99,9

Sensibilitatea relativă a testului și specificitatea eşantioanelor SurePath preparate folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit se corelează foarte mult cu rezultatele obținute folosind metoda de preparare manuală a probelor, astfel cum rezultă din limita inferioară a 95% ÎI atât pentru acordul pozitiv, cât și pentru acordul negativ.

Echivalența dintre prepararea manuală a probelor sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath și prepararea probelor sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit

Studiile au fost efectuate folosind eşantioane SurePath recoltate de la următoarele subpopulații:

- Femei cu citologie normală (n = 1200)
- Femei cu o citologie ASC-US sau mai gravă decât ASC-US (n = 183)

Prepararea manuală a probelor și prepararea probelor folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit au fost efectuate pentru fiecare probă sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath, urmate de testarea automatizată cu RCS cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test (consultați Tabel 27 de mai jos).

Tabel 27. Acordul rezultatelor probelor sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath între prepararea manuală a probelor și prepararea probelor folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit (n = 1383)

Acord pozitiv (%) (n/N) ÎI 95%		Acord negativ (%) (n/N) ÎI 95%	
Toate pozitive	Regiune puternic pozitivă RLU/CO \geq 2,5	Toate negative	Regiune puternic negativă RLU/CO < 0,8
92,6	97,4	94,4	99,3
(188/203)	(147/151)	(1114/1180)	(1078/1086)
88,2-95,5	93,4-99,0	92,9-95,6	98,6-99,6

Sensibilitatea relativă a testului și specificitatea probelor sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath preparate folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit se corelează foarte mult cu rezultatele obținute folosind metoda de preparare manuală a probelor, astfel cum rezultă din limita inferioară a 95% ÎI atât pentru acordul pozitiv, cât și pentru acordul negativ.

Acordul între metodele de testare

Un studiu multicentric (n = 2270) a fost realizat pentru a evalua rezultatele testărilor clinice cu RCS în comparație cu rezultatele testării folosind metoda manuală. Testarea a fost efectuată la 3 unități, externe față de QIAGEN, cu eșantioane ale pacienților recoltate de la 5 unități de recoltare. Setul de date a fost format din 1269 de eșantioane cervicale recoltate în PreservCyt Solution și 1001 de eșantioane recoltate în STM.

Acordurile statistice între eșantioanele pereche testate cu RCS și cu testarea manuală au fost calculate pentru această populație de paciente (consultați Tabelele 28 și 29 de mai jos).

Tabel 28. Rezumatul acordului dintre testarea automatizată cu RCS și cea manuală – eșantioane în STM (n = 1001)

Clasificare citologică	Prevalența HPV (%)	Acord pozitiv (%) (n/N) ÎI 95%		Acord negativ (%) (n/N) ÎI 95%	
		Toate pozitive	Regiune puternic pozitivă (RLU/CO ≥ 2,5)	Toate negative	Regiune puternic negativă (RLU/CO < 0,8)
WNL* < 30 ani	21	99,3 (139/140) 96,1-100,0	99,1 (112/113) 95,2-100,0	99,3 (538/542) 98,1-99,8	100,0 (531/531) 99,3-100,0
WNL ≥ 30 ani	15	92,0 (23/25) 74,0-99,0	93,8 (15/16) 69,8-99,8	100,0 (143/143) 97,5-100,0	100,0 (142/142) 97,4-100,0
ASC-US	65	98,1 (51/52) 89,7-100,0	100,0 (47/47) 92,4-100,0	96,4 (27/28) 81,7-99,9	100,0 (26/26) 86,8-100,0
LSIL+	96	100,0 (65/65) 94,5-100,0	100,0 (62/62) 94,2-100,0	66,7 (2/3) 9,4-99,2	66,7 (2/3) 9,4-99,2
Altele	33	100,0 (1/1) 2,5-100,0	100,0 (1/1) 2,5-100,0	100,0 (2/2) 15,8-100,0	100,0 (2/2) 15,8-100,0
Toate eșantioanele în STM	28	98,6 (279/283) 96,4-99,6	99,2 (237/239) 97,0-99,9	99,2 (712/718) 98,2-99,7	99,9 (703/704) 99,2-100,0

* WNL = în limite normale.

Tabel 29. Rezumatul acordului dintre testarea automatizată cu RCS și cea manuală – eșantioane în PreservCyt (n = 1269)

Clasificare citologică	Prevalența HPV (%)	Acord pozitiv (%) (n/N) ÎI 95%		Acord negativ (%) (n/N) ÎI 95%	
		Toate pozitive	Regiune puternic pozitivă (RLU/CO ≥ 2,5)	Toate negative	Regiune puternic negativă (RLU/CO < 0,8)
WNL* < 30 ani	20	96,2 (75/78) 89,2-99,2	100,0 (64/64) 94,4-100,0	98,4 (301/306) 96,2-99,5	99,0 (293/296) 97,1-99,8
WNL ≥ 30 ani	8	88,7 (47/53) 77,0-95,7	92,1 (35/38) 78,6-98,3	99,1 (578/583) 98,0-99,7	99,5 (571/574) 98,5-99,9
ASC-US	36	100,0 (48/48) 92,6-100,0	100,0 (46/46) 92,3-100,0	96,6 (84/87) 90,3-99,3	96,5 (83/86) 90,1-99,3
LSIL+	77	100,0 (64/64) 94,4-100,0	100,0 (62/62) 94,2-100,0	89,5 (17/19) 66,9-98,7	88,9 (16/18) 65,3-98,6
Altele	11	100,0 (3/3) 29,2-100,0	100,0 (3/3) 29,2-100,0	100,0 (24/24) 85,6-100,0	100,0 (24/24) 85,8-100,0
Toate eșantioanele în PreservCyt†	20	96,4 (238/247) 93,2-98,3	98,6 (211/214) 96,0-99,7	98,5 (1007/1022) 97,6-99,2	98,9 (990/1001) 98,0-99,4

*WNL = în limite normale.

† Date citologice indisponibile de la 4 paciente.

Un studiu clinic suplimentar a fost realizat folosind eșantioane PreservCyt reziduale arhivate, recoltate de la o subpopulație de femei cu vârsta de cel puțin 30 de ani inclusiv cu citologie normală (consultați Tabel 30 de mai jos) cu o prevalență a HPV de 4,8%.

Tabel 30. Rezumatul acordului dintre testarea automatizată cu RCS și cea manuală – WNL femei cu vârsta de cel puțin 30 de ani inclusiv (n = 2077)

Toate pozitive	Acord pozitiv (%) (n/N) ÎI 95%		Toate negative	Acord negativ (%) (n/N) ÎI 95%	
	Regiune puternic pozitivă (RLU/CO ≥ 2,5)	Regiune puternic negativă (RLU/CO < 0,8)			
92,0 (92/100) 84,84-96,48	91,8 (78/85) 83,77-96,62	99,3 (1964/1977) 98,88-99,65	99,7 (1944/1949) 99,40-99,92		

Au existat 7 rezultate discordante între rezultatele testării manuale și cele ale testării automatizate cu RCS în regiunea puternic pozitivă. Rezultatele inițiale ale testării manuale pentru aceste 7 eșantioane au fost în afara algoritmului recomandat pentru retestarea eșantioanelor PreservCyt; cu toate acestea, deoarece modelul studiului a necesitat testarea tuturor eșantioanelor în triplicat, rezultatele repetării au fost disponibile pentru soluționarea discrepanțelor.

Datele testării repetate pentru fiecare din cele 7 eșantioane discordante sugerează că toate eșantioanele discordante sunt negative pentru ADN HPV (consultați Tabel 31 de mai jos). Pe baza rezultatelor negative repetate obținute pentru ambele replicare, fiecare dintre rezultatele inițiale pozitive ale testării manuale au fost probabil fals- pozitive.

Tabel 31. Eșantioanele PreservCyt discordante pentru femeile WNL cu vârsta de cel puțin 30 ani inclusiv (n = 7)

Probă	Unitate	Testare manuală (RLU/CO)			Testare automatizată cu RCS (RLU/CO)		
		Inițial	Repetare 1	Repetare 2	Inițial	Repetare 1	Repetare 2
1	A	2,51	0,08	0,08	0,12	0,17	0,14
2	A	20,18	0,08	0,09	0,19	0,24	0,20
3	A	3,88	0,12	0,11	0,17	0,22	0,22
4	A	9,37	0,09	0,09	0,15	0,21	0,20
5	A	6,01	0,17	0,13	0,25	0,30	0,30
6	B	2,97	0,71	0,99	1,59	0,89	0,90
7	C	11,01	0,16	0,14	0,19	0,15	0,21

Rezultatele acestui studiu clinic indică un acord general între testarea automatizată cu RCS și testarea manuală folosind fie eșantioane în STM, fie eșantioane în PreservCyt.

Reproductibilitate

Reproductibilitatea generală a testării manuale

Un studiu multicentric pentru reproductibilitate a fost efectuat pentru a determina reproductibilitatea între zile, între unități și reproductibilitatea generală ale *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test folosind un panel de ținte ADN HPV și eșantioane în STM clinice pozitive la HPV și negative la HPV.

Trei laboratoare externe au efectuat testarea cu același lot de kituri *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test în 3 zile diferite, cu un panel de reproductibilitate identic. Panelul de reproductibilitate a inclus următoarele eșantioane:

- 12 grupe de eșantioane în STM clinice denaturate
- 3 grupe de eșantioane în PreservCyt clinice nedenaturate

- Calibrator negativ
- Calibrator pozitiv HPV de mare risc la concentrații de 0,5, 1, 2,5, 5 și 10 pg/ml.

Toți membrii panelului au fost testați în fiecare zi în triplicat, folosind *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Rezultatele indică faptul că reproductibilitatea *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test cu eșantioane clinice este foarte bună (consultați Tabel 32 de mai jos).

Tabel 32. Reproductibilitate generală – reproductibilitate multicentrică (toate rulările din toate unitățile)

Măsură statistică	Rezultat
Pozitive preconizate cu un rezultat pozitiv observat (Î 95%)	100,0% (99,0-100,0)
Pozitive preconizate cu un rezultat negativ observat (Î 95%)	99,0% (97,49-99,73)
Acord (Î 95%)	99,5% (98,70-99,86)
Kappa	0,990

Reproductibilitatea cu eșantioane în STM clinice

Testare manuală

A fost realizat un studiu pentru a accesa reproductibilitatea testării manuale a eșantioanelor în STM clinice cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. A fost pregătit un panel de 20 de membri format din grupuri clinice (10 pozitive și 10 negative) prin combinarea eșantioanelor în STM testate anterior. Eșantioanele au fost testate în replicate de 4 în fiecare din cele 5 zile pentru un total de 20 de replicate pe eșantion. Testarea a fost efectuată folosind un amestec de sondă combinat format din sonda HPV de mare risc și o sondă HPV cu risc redus. Nu este de așteptat ca reproductibilitatea testării să difere atunci când se utilizează doar amestecul de sondă în *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. S-au calculat RLU/CO mediu și 95% Î cu privire la medie (consultați Tabel 33 de mai jos).

Tabel 33. Reproducibilitatea eșantioanelor în STM – testare manuală (ordinea descrescătoare după RLU/CO mediu)

Specimen ID (ID eșantion)	Valoare RLU/CO medie	ÎI 95%	Rezultat pozitiv al testării (%) (n/N)
10	3,18	3,02-3,35	100 (20/20)
20	1,43	1,36-1,50	100 (20/20)
11	1,25	1,20-1,28	100 (20/20)
12	1,21	1,15-1,27	100 (20/20)
15	1,20	1,14-1,25	100 (20/20)
13	1,07	1,01-1,11	80 (16/20)
16	1,06	1,01-1,09	75 (15/20)
17	1,04	1,00-1,06	80 (16/20)
14	0,98	0,92-1,02	45 (9/20)
18	0,92	0,87-0,96	20 (4/20)
19	0,72	0,68-0,75	0 (0/20)
7	0,40	0,33-0,46	0 (0/20)
4	0,38	0,35-0,39	0 (0/20)
9	0,37	0,32-0,41	0 (0/20)
1	0,35	0,32-0,36	0 (0/20)
2	0,35	0,31-0,37	0 (0/20)
8	0,32	0,29-0,34	0 (0/20)
3	0,30	0,27-0,31	0 (0/20)
6	0,27	0,24-0,30	0 (0/20)
5	0,26	0,23-0,28	0 (0/20)

Pentru cele 5 eșantioane cu un RLU/CO mediu de 20% sau mai mult peste CO, 100 din 100 de replicare (100,0%) au fost pozitive. Pentru cele 5 eșantioane cu un RLU/CO mediu de 20% peste sau sub CO, 60 din 100 (60%; 95% ÎI = 49,7-69,6) dintre replicare au fost pozitive și 40 din 100 (40%) au fost negative. Pentru cele 10 eșantioane cu un RLU/CO mediu de 20% sau mai mult sub CO, 200 din 200 de replicare (100%) au fost negative.

Rezultatele indică faptul că eșantioanele aflate la 20% sau mai mult de CO este de așteptat să genereze rezultate concordante. Eșantioanele apropiate de CO au generat un număr aproximativ egal de rezultate pozitive și negative. Aceste date demonstrează că testarea manuală a eșantioanelor în STM cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test generează rezultate reproductibile.

Testare automatizată cu RCS

A fost realizat un studiu pentru a evalua reproductibilitatea în rulare, de la o zi la alta și între laboratoare a testării automatizate cu RCS a eșantioanelor în STM cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Un panel cu 16 membri de eșantioane clinice comasate (consultați Tabel 34 de mai jos) a fost testat folosind un singur lot de reactivi, de două ori pe zi, în 3 zile diferite. Fiecare membru al panelului a fost testat în cvadruplicat.

Tabel 34. Reproductibilitatea eșantioanelor în STM – componența panelului de testare automatizată cu RCS

Membru al panelului	Valoare RLU/CO aproximativă	Rezultat preconizat al testării
1N	< 0,4	Negativ
2N	0,4-0,8	Negativ
3P	0,8-1,2	Puternic negativ/slab pozitiv
4P	0,8-1,2	Puternic negativ/slab pozitiv
5P	0,8-1,2	Puternic negativ/slab pozitiv
6P	1,2-2,0	Slab pozitiv
7P	1,2-2,0	Slab pozitiv
8P	1,2-2,0	Slab pozitiv
9P	2,0-5,0	Slab pozitiv
10P	5,0-10,0	Moderat pozitiv
11N	< 0,4	Negativ
12N	< 0,4	Negativ
13N	< 0,4	Negativ
14XR	Materialul clinic pozitiv de ADN HPV cu risc redus în grupul negativ clinic STM	Puternic negativ/slab pozitiv
15XR	Plasmidă de ADN HPV cu risc redus în grupul negativ clinic STM	Puternic negativ/slab pozitiv
16XR	Substanță de control plasmidă vectorială de ADN în grupul negativ clinic STM	Puternic negativ/slab pozitiv

Doi membri ai panelului (14XR și 15XR) au fost incluși pentru a evalua potențialul de hibridizare încrucișată al amestecului de sondă al *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test cu eșantioane care conțin doar tipuri de ADN HPV cu risc redus 6, 11, 42, 43 și 44. Membrul de panel 16XR a fost compus din ADN-ul pGEM® la o concentrație de 1,49 ng/ml și a servit ca o substanță de control vectorial pentru membrul de panel 15XR. Rezultatele acestei testări nu au indicat rezultate fals-pozitive ale testării, datorită prezenței tipurilor de ADN HPV cu risc redus din eșantioanele clinice. Aceste rezultate sunt în concordanță cu testarea manuală.

Reproductibilitatea a fost calculată conform metodei descrise de NCCLS E5-A (46) (consultați Tabel 35 de mai jos). Această metodă necesită calculul componentelor de variație pentru fiecare dintre sursele de variabilitate: laborator, zi, rulare și eroare (definită ca variație inter-teste și variație între teste).

Tabel 35. Reproductibilitatea eșantioanelor în STM – testarea automatizată cu RCS; reproductibilitate cantitativă

Membru al panelului	n	Valoare RLU/CO medie	Abatere standard				Total	CV total (%)
			În rulare	Între rulări	Între zile	Între laboratoare		
1N	72	0,13	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	15,10
2N	72	0,36	0,03	0,01	0,03	0*	0,04	11,69
3P	72	0,96	0,06	0,06	0,04	0*	0,09	9,55
4P	72	1,03	0,06	0,18	0,06	0*	0,19	18,81
5P	72	1,41	0,11	0,14	0,15	0,06	0,24	17,00
6P	72	1,73	0,10	0,27	0*	0,11	0,31	18,10
7P	72	1,74	0,12	0,21	0*	0*	0,24	13,78
8P [†]	70	1,95	nu se aplică [‡]	nu se aplică [‡]	nu se aplică [‡]	nu se aplică [‡]	0,47	23,80
9P	72	5,21	0,34	0,44	0,21	0*	0,59	11,36
10P	72	7,67	0,46	0,63	0,71	0*	1,05	13,70
11N	72	0,13	0,01	0,01	0,01	0*	0,02	16,89
12N	72	0,17	0,03	0,06	0,03	0*	0,07	39,14
13N	72	0,15	0,02	0,02	0*	0,01	0,03	17,01

* Componentele de variație negativă sunt setate ca fiind egale cu zero.

[†] Două replicare nevalide pentru membrul de panel 8P au exclus analiza componentelor de variație din cauza grupurilor de dimensiuni inegale comparate.

[‡] Nu se aplică: analiza variației nu este posibilă din cauza unui număr mai mic de replicare comparativ cu ceilalți membri ai panelului.

Reproductibilitatea eșantioanelor PreservCyt clinice

Testare manuală

Reproductibilitatea testării manuale a eșantioanelor PreservCyt cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test a fost determinată într-un studiu folosind 24 de eșantioane simulate la diferite concentrații de ADN HPV. Eșantioanele au constat din PreservCyt Solution și globule albe sanguine, cu și fără bacterii care conțin plasmide HPV 16.

Eșantioanele au fost testate în replicare de 4 în fiecare din cele 5 zile pentru un total de 20 de replicare pe eșantion. În fiecare din cele 5 zile ale studiului, s-a preparat câte o probă de 8 ml din fiecare eșantion, conform instrucțiunilor de utilizare *digene* HC2 Sample Conversion Kit, apoi acestea au fost testate. Au fost calculate media și 95% ÎI (consultați Tabel 36 de mai jos).

Tabel 36. Reproducibilitatea eșantioanelor PreservCyt – testare manuală cu prepararea manuală a probelor; reproducibilitate calitativă (ordine descendentă după RLU/CO mediu)

Specimen ID (ID eșantion)	Valoare RLU/CO medie	Î 95%	Rezultat pozitiv al testării (%) (n/N)
21	3,51	3,19-3,83	100 (20/20)
12	1,58	1,48-1,69	100 (20/20)
13	1,42	1,32-1,52	100 (20/20)
17	1,38	1,23-1,53	90 (18/20)
18	1,36	1,23-1,48	95 (19/20)
15	1,32	1,16-1,49	85 (17/20)
23	1,17	1,06-1,27	75 (15/20)
16	1,14	1,07-1,20	75 (15/20)
20	1,10	0,96-1,21	85 (17/20)
19	1,06	0,95-1,17	45 (9/19)
22	1,05	0,99-1,10	70 (14/20)
11	1,04	0,96-1,11	65 (13/20)
14	0,94	0,86-1,01	25 (5/20)
24	0,77	0,73-0,81	0 (0/20)
3	0,28	0,25-0,30	0 (0/20)
1	0,27	0,24-0,30	0 (0/20)
7	0,27	0,25-0,30	0 (0/20)
2	0,27	0,25-0,28	0 (0/20)
5	0,26	0,24-0,28	0 (0/20)
4	0,24	0,22-0,25	0 (0/20)
9	0,23	0,21-0,25	0 (0/20)
8	0,22	0,18-0,27	0 (0/20)
10	0,22	0,20-0,25	0 (0/20)
6	0,19	0,17-0,21	0 (0/20)

Pentru cele 6 eșantioane cu un RLU/CO mediu de 20% sau mai mult peste CO, 114 din 120 de replicare (95,0%) au fost pozitive. Pentru cele 7 eșantioane cu un RLU/CO mediu de 20% peste sau sub CO, 88 din 139 (63,3%; 95% Î = 54,3-70,9) dintre replicare au fost pozitive și 51 din 139 (36,7%) au fost negative. Pentru cele 4 eșantioane cu 10% peste sau sub CO, 41 din 79 (51,9%) dintre replicare au fost pozitive și 38 din 79 (48,1%) au fost negative. Pentru cele 11 eșantioane cu un RLU/CO mediu de 20% sau mai mult sub CO, 220 din 220 de replicare (100%) au fost negative.

Rezultatele indică faptul că eșantioanele aflate la 20% sau mai mult de CO este de așteptat să genereze rezultate concordante. Eșantioanele apropiate de CO au generat un număr aproximativ egal de rezultate pozitive și negative. Aceste date demonstrează că testarea manuală a eșantioanelor în PreservCyt cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test generează rezultate reproductibile.

Testarea automatizată cu RCS cu prepararea manuală a probelor

A fost realizat un studiu intern al testării automatizate cu RCS folosind eșantioane PreservCyt clinice obținute preponderent de la femei cu un rezultat citologic ASC-US sau mai grav decât ASC-US (prevalență HPV 57%). Eșantioanele au fost împărțite în 2 părți alicote; fiecare parte alicotă a fost apoi procesată individual folosind *digene* HC2 Sample Conversion Kit și testată în duplicat cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Ca și în cazul altor testări IVD calitative, variabilitatea în rezultatele *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test obținute din eșantioanele clinice este asociată în primul rând cu una dintre următoarele sau o combinație a acestora: recoltarea eșantioanelor, prepararea probelor și procedura de testare. Deoarece rezultatele testărilor comparate au fost obținute din același eșantion clinic, modelul experimental a controlat variabilitatea cauzată de recoltarea eșantioanelor. Repetabilitatea rezultatelor obținute din 2 părți alicote de probă preparate individual din același eșantion clinic (denumite mai jos „între părțile alicote preparate”) reflectă variația cauzată de combinația dintre prepararea probelor și procedura de testare. Repetabilitatea rezultatelor obținute din aceeași parte alicotă de probă (denumită mai jos „în partea alicotă preparată”) reflectă doar variația din procedura de testare (consultați Tabel 37 de mai jos).

Tabel 37. Reproducibilitatea eșantioanelor PreservCyt – testarea automatizată cu RCS cu prepararea manuală a probelor; reproducibilitate calitativă

Analiză	Acord pozitiv (%)	Acord negativ (%)	Acord total (%)	
	(n/N)	(n/N)	(n/N)	
	ÎI 95%	ÎI 95%	ÎI 95%	
În partea alicotă preparată	Toate datele	99,62 (261/262)	94,7 (160/169)	97,7 (421/431)
		97,9-100,0	90,1-97,5	95,8-98,9
	Regiuni puternic pozitive și puternic negative	100,0 (249/249)	98,2 (160/163)	99,3 (409/412)
		98,5-100,0	94,7-99,6	97,9-99,9
Între părțile alicote preparate	Toate datele	99,6 (264/265)	98,2 (163/166)	99,1 (427/431)
		97,9-100,0	94,8-99,6	97,6-99,8
	Regiuni puternic pozitive și puternic negative	100,0 (249/249)	99,4 (161/162)	99,8 (410/411)
		98,5-100,0	96,6-100,0	98,7-100,0

A fost realizat un studiu suplimentar pentru a evalua reproducibilitatea cantitativă a rezultatelor obținute cu testarea automatizată cu RCS a eșantioanelor PreservCyt simulate. La studiu au participat trei unități de testare, inclusiv QIAGEN.

Fiecare laborator de testare a efectuat atât testarea automatizată cu RCS, cât și testarea manuală ale *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test de două ori pe zi în 5 zile diferite, cu un panel de reproducibilitate furnizat de 6 membri. Fiecare membru al panelului a fost compus din celule de cultură îmbogățite în PreservCyt Solution, destinate să genereze o valoare RLU/CO aproximativă (consultați Tabel 38 de mai jos).

Membrii panelului pozitivi la ADN HPV au fost preparați prin adăugarea unor cantități diferite de celule SiHa pozitive la ADN HPV (dintr-o linie de celule de laborator). Membrul negativ al panelului a fost compus din celule Jurkat negative la HPV (dintr-o linie de celule de laborator diferită). Concentrația celulară finală a tuturor celor 6 membri ai panelului a fost de aproximativ 5×10^4 celule/ml.

Tabel 38. Reproducibilitatea eșantioanelor PreservCyt – testarea automatizată cu RCS cu prepararea manuală a probelor; reproductibilitate cantitativă membri ai panelului

Membru al panelului	Tip celulă	Valoare RLU/CO aproximativă	Rezultat preconizat al testării
1N	Jurkat	< 1,0	Negativ
2N	Jurkat	< 1,0	Negativ
3P	SiHa și Jurkat	5,0-8,0	Slab pozitiv
4P	SiHa și Jurkat	5,0-8,0	Slab pozitiv
5P	SiHa	30,0-50,0	Moderat pozitiv
6P	SiHa	200,0	Puternic pozitiv

Reproducibilitatea a fost calculată conform metodei descrise de NCCLS E5-A (46) (consultați Tabel 39 de mai jos). Această metodă necesită calculul componentelor de variație pentru fiecare dintre sursele de variabilitate: laborator, zi, rulare și eroare (definită ca variație inter-teste și variație între teste). Fiecare dintre cei 6 membri ai panelului a fost testat în cvadruplicat în fiecare dintre cele 10 rulări (2 rulări pe zi în 5 zile de testare) la fiecare dintre cele 3 laboratoare de testare.

Tabel 39. Reproducibilitatea eșantioanelor PreservCyt – testarea automatizată cu RCS cu prepararea manuală a probelor; reproductibilitate cantitativă

Membru al panelului	n	Valoare RLU/CO medie	Abatere standard				Total	CV total (%)
			În rulare	Între rulări	Între zile	Între laboratoare		
1N	120	0,20	0,04	0,01	0,01	0,08	0,089	44,4
2N	120	0,20	0,06	0,01	0*	0,08	0,10	52,2
3P	120	4,05	0,76	1,17	0*	0,26	1,42	35,1
4P	120	4,23	0,74	0,86	0*	0,31	1,18	27,8
5P	120	28,6	5,00	5,61	4,41	0*	8,71	30,5
6P	120	214,6	33,95	27,25	18,09	25,53	53,61	25,0

* Componentele de variație negativă sunt setate ca fiind egale cu zero.

Pentru a suplimenta acest studiu inițial al reproductibilității cu date de la eșantioane foarte apropiate de valoarea de prag a testului, a fost efectuat un studiu suplimentar de precizie la o unitate externă față de QIAGEN, folosind RCS.

Panoul a fost format din 1 membru negativ, 2 membri negativi sau slab pozitivi și 2 membri slab pozitivi. Fiecare membru al panelului a fost preparat prin îmbogățirea celulelor Jurkat și SiHa de cultură în PreservCyt Solution pentru a genera valorile RLU/CO țintă (consultați Tabel 40 de mai jos).

Această unitate externă a finalizat testarea automatizată cu RCS folosind un singur lot din reactivii *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test pentru fiecare rulare de testare, efectuând testarea de 2 ori pe zi în 3 zile diferite, cu un panel de 5 membri furnizat de eşantioane PreservCyt simulate. Fiecare membru al panelului a fost împărțit în 4 probe și toate cele 4 probe au fost testate pe aceeași microplacă (consultați Tabel 41 de mai jos).

Tabel 40. Reproducibilitatea eşantioanelor PreservCyt – testarea automatizată cu RCS cu prepararea manuală a probelor; reproducibilitate cantitativă apropiată de CO a testului pentru membrii panelului

Membru al panelului	Valoare RLU/CO aproximativă	Rezultat preconizat al testării
1N	0,2	Negativ
2N	0,8-1,2	Puternic negativ/slab pozitiv
3P	0,8-1,2	Puternic negativ/slab pozitiv
4P	1,2-2,0	Slab pozitiv
5P	1,2-2,0	Slab pozitiv

Tabel 41. Reproducibilitatea eşantioanelor PreservCyt – testarea automatizată cu RCS cu prepararea manuală a probelor; reproducibilitate cantitativă apropiată de CO a testului

Membru al panelului	n	Valoare RLU/CO medie	Abatere standard				CV total (%)
			În rulare	Între rulări	Între zile	Total	
1N	24	0,14	0,01	0*	0,02	0,02	15,12
2N	24	1,39	0,14	0,15	0*	0,21	14,84
3P	24	1,31	0,16	0*	0,11	0,19	14,70
4P	24	1,74	0,13	0,21	0,18	0,31	17,73
5P	24	1,63	0,24	0,20	0,26	0,40	24,63

* Componentele de variație negativă sunt setate ca fiind egale cu zero.

Prepararea probelor folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit

Un studiu intern privind prepararea probelor folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit a fost realizat folosind eşantioane PreservCyt clinice obținute de la femei cu unul dintre cele două rezultate citologice următoare:

- ASC-US sau mai grav decât ASC-US
- Negativ la leziune intraepitelială sau caracter malign (Negative for intraepithelial lesion or malignancy, NILM)

Din fiecare eşantion au fost eliminate câte două probe. Fiecare probă a fost preparată individual folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit și rezultatele au fost determinate prin testarea automatizată cu RCS cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Ca și în cazul altor testări IVD calitative, variabilitatea în rezultatele *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test obținute din eșantioanele clinice este asociată în primul rând cu una dintre următoarele sau o combinație a acestora: recoltarea eșantioanelor, prepararea probelor și procedura de testare. Deoarece rezultatele testărilor comparate au fost obținute din același eșantion clinic (denumit „între probe”), modelul experimental a controlat variabilitatea cauzată de recoltarea eșantioanelor. Reproducibilitatea rezultatelor (consultați Tabel 42 de mai jos) obținute din 2 probe preparate individual din același eșantion clinic reflectă variația cauzată de prepararea probelor și de procedura de testare.

Tabel 42. Reproducibilitatea eșantioanelor PreservCyt – prepararea probelor folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit; reproducibilitate calitativă între probe

Acord pozitiv (%)	Acord negativ (%)	Acord total (%)
(n/N)	(n/N)	(n/N)
Îl 95%	Îl 95%	Îl 95%
99,0	96,4	97,3
(95/96)	(161/167)	(256/263)
94,3-99,8	92,4-98,3	94,6-98,7

A fost realizat un studiu suplimentar pentru a evalua reproducibilitatea rezultatelor folosind eșantioane PreservCyt simulate. Prepararea probelor folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit a fost urmată de testări automatizate cu RCS cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Cei 8 membri pozitivi ai panelului au fost preparați prin adăugarea de celule SiHa sau HeLa pozitive la ADN HPV în celule C-33 A negative la ADN HPV în PreservCyt Solution, în timp ce cei 2 membri ai panelului negativi la ADN HPV au conținut doar celule C-33 A negative la ADN HPV.

Trei operatori diferiți au efectuat testarea într-o singură zi folosind 3 instrumente QIASymphony SP diferite și 3 loturi diferite de QIASymphony DSP HPV Media Kit cu membrii panelului 2N, 3E, 5P, 7P și 9P. Membrii panelului 2N, 3E, 5P și 7P au fost testați cu 18 replicare în 3 rulări diferite, generând câte 54 de puncte de date pentru fiecare membru al panelului. Membrul panelului 9P a fost testat cu 16 replicare în 3 rulări diferite, generând 48 de puncte de date.

Un operator a efectuat *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test în 3 zile diferite folosind 3 instrumente QIASymphony SP diferite și un lot QIASymphony DSP HPV Media Kit cu membrii panelului 1N, 4E, 6P, 8P și 10P. Membrii panelului 1N, 4E, 6P și 8P au fost testați cu 18 replicare în 8 rulări diferite, generând câte 144 de puncte de date pentru fiecare membru al panelului. Membrul panelului 10P a fost testat cu 16 replicare în 8 rulări diferite, generând 128 de puncte de date.

Pentru membrii panelului cu un RLU/CO mediu de 20% sau mai mult peste CO, 572 din 572 (100,0%) au fost pozitivi. Pentru membrii panelului cu un RLU/CO mediu de 20% peste sau sub CO, 98 din 198 (49,5%) au fost pozitivi și 100 din 198 (50,5%) au fost negativi. Pentru membrii panelului cu un RLU/CO mediu de 20% sau mai mult sub CO, 198 din 198 (100,0%) au fost negativi (consultați Tabel 43 de mai jos).

Tabel 43. Reproducibilitatea eșantioanelor PreservCyt – prepararea probelor folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit; reproducibilitate calitativă

Membru al panelului	Tip celulă	Valoare RLU/CO medie	Abatere standard	Rezultat pozitiv al testării (%) (n/N)
1N	C-33 A	0,37	0,05	0 (0/144)
2N	C-33 A	0,41	0,06	0 (0/54)
3E	HeLa și C-33 A	0,81	0,11	6 (3/54)
4E	SiHa și C-33 A	1,09	0,18	66 (95/144)
5P	HeLa și C-33 A	3,17	0,46	100 (54/54)
6P	SiHa și C-33 A	4,81	0,74	100 (144/144)
7P	HeLa și C-33 A	6,77	0,97	100 (54/54)
8P	SiHa și C-33 A	9,41	1,39	100 (144/144)
9P	HeLa și C-33 A	13,72	2,81	100 (48/48)
10P	SiHa și C-33 A	28,13	5,08	100 (128/128)

Rezultatele indică faptul că eșantioanele aflate la 20% sau mai mult de CO este de așteptat să genereze rezultate concordante. Eșantioanele apropiate de CO au generat un număr aproximativ egal de rezultate pozitive și negative. Aceste date demonstrează că prepararea probelor de eșantioane PreservCyt folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit urmată de testarea cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test generează rezultate reproductibile.

Rezultatele studiului intern au fost, de asemenea, utilizate pentru a evalua reproducibilitatea cantitativă a rezultatelor obținute cu prepararea probelor de eșantioane PreservCyt folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit (consultați Tabel 44 și Tabel 45 de mai jos).

Tabel 44. Reproducibilitatea eșantioanelor PreservCyt – prepararea probelor folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit; reproductibilitate cantitativă cu același operator

Membru al panelului	n	Valoare RLU/CO medie	Abatere standard			Abatere standard totală estimată	CV total estimat (%)
			În rulări	Între rulări	Între combinații*		
1N	144	0,37	0,04	0,03	0,03	0,06	14,92
4E	144	1,09	0,12	0,11	0,09	0,19	17,24
6P	144	4,81	0,49	0,40	0,42	0,77	15,92
8P	144	9,41	0,96	0,97	0,46	1,44	15,32
10P	128	28,13	4,00	2,04	2,54	5,16	18,35

* Între combinații de instrumente QIASymphony SP și zile diferite.

Tabel 45. Reproducibilitatea eșantioanelor PreservCyt – prepararea probelor folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit; reproductibilitate cantitativă în aceeași zi

Membru al panelului	n	Valoare RLU/CO medie	Abatere standard			Abatere standard totală estimată	CV total estimat (%)
			În rulări	Între rulări†			
2N	54	0,41	0,04	0,05	0,06	15,86	
3E	54	0,81	0,08	0,08	0,12	14,48	
5P	54	3,17	0,38	0,33	0,50	15,72	
7P	54	6,77	0,92	0,38	1,00	14,73	
9P	48	13,72	2,64	1,15	2,88	21,01	

† O rulare constă dintr-o combinație dintr-un QIASymphony DSP HPV Media Kit, un instrument QIASymphony SP și un operator.

Reproducibilitatea cantitativă este foarte mare, așa cum este indicat de toate valorile CV rămase sub 25%. Abaterile standard între rulări sunt comparabile cu valoarea corespunzătoare din cadrul rulărilor, ceea ce indică rezultate concordante, indiferent de instrumentul sau lotul de kit folosit.

Prepararea probelor folosind QIASymphony DSP AXpH DNA Kit

Un studiu intern privind prepararea probelor folosind QIASymphony DSP AXpH DNA Kit a fost realizat folosind eșantioane PreservCyt clinice obținute de la femei cu citologie de ASC-US sau NILM. Din fiecare eșantion au fost eliminate câte două probe. Fiecare probă a fost preparată individual folosind QIASymphony DSP AXpH DNA Kit și rezultatele au fost determinate prin testarea automatizată cu RCS cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Ca și în cazul altor testări IVD calitative, variabilitatea în rezultatele *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test obținute din eșantioanele clinice este asociată în primul rând cu una dintre următoarele sau o combinație a acestora: recoltarea eșantioanelor, prepararea probelor și procedura de testare. Deoarece rezultatele testărilor comparate au fost obținute din același eșantion clinic (denumit „între probe”), modelul experimental a controlat variabilitatea cauzată de recoltarea eșantioanelor. Reproducibilitatea rezultatelor (consultați Tabel 46 de mai jos) obținute din 2 probe preparate individual din același eșantion clinic reflectă variația cauzată de prepararea probelor și de procedura de testare.

Tabel 46. Reproducibilitatea eșantioanelor PreservCyt – prepararea probelor folosind QIASymphony DSP AXpH DNA Kit; reproducibilitate calitativă între probe

Acord pozitiv (%) (n/N) ÎI 95%	Acord negativ (%) (n/N) ÎI 95%	Acord total (%) (n/N) ÎI 95%
95,3 (101/106) 89,4-98,0	96,7 (176/182) 92,3-98,5	96,2 (277/288) 93,3-97,9

A fost realizat un studiu suplimentar pentru a evalua reproducibilitatea rezultatelor folosind eșantioane PreservCyt simulate. Prepararea probelor folosind QIASymphony DSP AXpH DNA Kit a fost urmată de testări automatizate cu RCS cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Trei operatori diferiți au efectuat *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test în zile diferite folosind instrumente diferite și loturi de reactivi diferite cu un panel format din 9 membri. Fiecare membru al panelului a fost testat în duplicat în 24 de rulări diferite, generând câte 48 de puncte de date pentru fiecare membru al panelului. Cei 8 membri pozitivi ai panelului au fost preparați prin adăugarea de celule SiHa sau HeLa pozitive la ADN HPV în celule H9 negative la ADN HPV în PreservCyt Solution, în timp ce membrii panelului negativi la ADN HPV au conținut doar celule H9 negative la ADN HPV.

Pentru membrii panelului cu un RLU/CO mediu de 20% sau mai mult peste CO, 237 din 240 (98,8%) au fost pozitivi. Pentru membrii panelului cu un RLU/CO mediu de 20 % peste sau sub CO, 95 din 144 (66,0%) au fost pozitivi și 49 din 144 (34,0%) au fost negativi. Pentru membrii panelului cu un RLU/CO mediu de 20% sau mai mult sub CO, 48 din 48 (100,0%) au fost negativi (consultați Tabel 47 de mai jos).

Tabel 47. Reproducibilitatea eșantioanelor PreservCyt – prepararea probelor folosind QIASymphony DSP AXpH DNA Kit; reproducibilitate calitativă

Membru al panelului	Tip celulă	Valoare RLU/CO medie	Abatere standard	Rezultat pozitiv al testării (%) (n/N)
1N	H9	0,17	0,03	0 (0/48)
2E	H9 și HeLa	1,00	0,16	56 (27/48)
3E	H9 și HeLa	1,16	0,57	54 (26/48)
4E	H9 și SiHa	1,18	0,23	88 (42/48)
5P	H9 și SiHa	1,89	0,20	100 (48/48)
6P	H9 și HeLa	2,05	0,43	96 (46/48)
7P	H9 și SiHa	2,97	0,45	100 (48/48)
8P	H9 și HeLa	5,67	0,61	100 (48/48)
9P	H9 și SiHa	9,91	1,63	98 (47/48)

Rezultatele indică faptul că eșantioanele aflate la 20% sau mai mult de CO este de așteptat să genereze rezultate concordante. Eșantioanele apropiate de CO au generat un număr aproximativ egal de rezultate pozitive și negative. Aceste date demonstrează că prepararea probelor de eșantioane PreservCyt folosind QIASymphony DSP AXpH DNA Kit urmată de testarea cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test generează rezultate reproductibile.

Rezultatele studiului intern au fost, de asemenea, utilizate pentru a evalua reproductibilitatea cantitativă a rezultatelor obținute cu prepararea probelor de eșantioane PreservCyt folosind QIASymphony DSP AXpH DNA Kit (consultați Tabel 48 de mai jos).

Tabel 48. Reproducibilitatea eşantioanelor PreservCyt – prepararea probelor folosind QIASymphony DSP AXpH DNA Kit; reproducibilitate cantitativă

Membru al panelului	n	Valoare RLU/CO medie	Abatere standard			Abatere standard totală estimată	CV total estimat (%)
			În rulări	Între rulări	Între combinații*		
1N	48	0,17	0,02	0,02	0,01	0,03	18,13
2E	48	1,00	0,14	0,05	0,06	0,16	16,20
3E	48	1,16	0,48	0,22	0,23	0,57	49,27
4E	48	1,18	0,16	0,14	0,10	0,23	19,63
5P	48	1,89	0,09	0,09	0,16	0,20	10,63
6P	48	2,05	0,18	0,34	0,19	0,43	20,83
7P	48	2,97	0,27	0,23	0,28	0,45	15,14
8P	48	5,67	0,35	0,44	0,24	0,61	10,85
9P	48	9,91	1,36	0,55	0,71	1,63	16,42

* Între combinațiile de kituri de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, kituri QIASymphony DSP AXpH DNA Kit, RCS folosit, QIASymphony SP folosit și operator.

Reproducibilitatea eşantioanelor SurePath clinice

Testare manuală

Reproducibilitatea testării manuale a probelor sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test a fost determinată într-un studiu folosind 3 laboratoare diferite. Membrii panelului au fost testați utilizând o CO de 1,0 RLU/CO în zile diferite și cu rulări diferite folosind un set identic de membri ai panelului cu stadiu de HPV pozitiv sau negativ cunoscut. Panelul a fost format din 5 membri pozitivi, 2 membri puternic negativi/slab pozitivi și 5 membri negativi.

Fiecare membru al panelului a fost preparat combinând eşantioane clinice unice recoltate în SurePath Preservative Fluid cu un stadiu de HPV negativ și pozitiv cunoscut pentru a obține valorile țintă dorite ale RLU/CO. Fiecare membru al panelului a fost testat în duplicat, de două ori pe zi, pe o perioadă de 5 zile la fiecare dintre cele 3 laboratoare participante (consultați Tabel 49 de mai jos).

Tabel 49. Reproductibilitatea probelor sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath – testare manuală; reproductibilitate calitativă

Membru al panelului	Valoare RLU/CO medie	Rezultat pozitiv al testării (%) (n/N)
1	0,20	0,0 (0/60)
2	0,21	0,0 (0/60)
3	0,22	0,0 (0/60)
4	0,28	3,3 (2/60)
5	0,36	3,3 (2/60)
6	0,83	21,7 (13/60)
7	1,17	43,3 (26/60)
8	19,47	100,0 (60/60)
9	25,65	100,0 (60/60)
10	81,52	100,0 (60/60)
11	154,18	100,0 (60/60)
12	765,29	100,0 (60/60)

Testare automatizată cu RCS

Reproductibilitatea rezultatelor probelor sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath prin testarea automatizată cu RCS a fost comparată cu rezultatele obținute prin testarea manuală. Au fost testate două părți alicote separate din aceeași probă sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath procesată (din același eșantion) (consultați Tabel 50 de mai jos).

Tabel 50. Reproductibilitatea probelor sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath – testare automatizată cu RCS; acordul rezultatelor între testarea automatizată cu RCS și testarea manuală

Acord pozitiv (%) (n/N) ÎI 95%		Acord negativ (%) (n/N) ÎI 95%	
Toate pozitive	Regiune puternic pozitivă (RLU/CO ≥ 2,5)	Toate negative	Regiune puternic negativă (RLU/CO < 0,80)
99,0 (417/421)	100,0 (375/375)	97,7 (1057/1079)	98,7 (1050/1064)
97,6-99,7	99,0-100,0	96,9-98,75	97,8-99,28

Prepararea probelor de eșantioane SurePath folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit

A fost realizat un studiu pentru a evalua reproductibilitatea rezultatelor folosind eșantioane SurePath simulate. Prepararea probelor folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit a fost urmată de testări automatizate cu RCS cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Cei 4 membri pozitivi ai panelului au fost preparați prin adăugarea de celule SiHa pozitive la ADN HPV în celule H-9 negative la ADN HPV în SurePath Preservative Fluid, în timp ce membrii panelului negativi la ADN HPV au conținut doar celule H-9 negative la ADN HPV în SurePath Preservative Fluid.

Trei operatori diferiți au efectuat testarea în 6 zile diferite folosind 3 instrumente QIASymphony SP diferite și 3 loturi diferite de QIASymphony DSP HPV Media Kit cu membrii panelului 1N, 2E, 3P, 4P și 5P. Membrii panelului 1N, 2E, 3P și 4P au fost testați cu 18 replicare în 37 de rulări diferite, generând câte 666 de puncte de date pentru membrii panelului 2E și 3P și 665 de puncte de date pentru membrii panelului 1N și 4P. Membrul panelului 5P a fost testat cu 16 replicare în 37 rulări diferite, generând 590 de puncte de date. Patru puncte de date au fost excluse din cauza volumului insuficient, semnalizat de QIASymphony SP în timpul preparării probelor.

Pentru membrii panelului cu un RLU/CO mediu de 20% sau mai mult peste CO, 1921 din 1921 (100,0%) au fost pozitivi. Pentru membrii panelului cu un RLU/CO mediu de 20% peste sau sub CO, 410 din 666 (61,6%) au fost pozitivi și 256 din 666 (38,4%) au fost negativi. Pentru membrii panelului cu un RLU/CO mediu de 20% sau mai mult sub CO, 664 din 665 (99,8%) au fost negativi (consultați Tabel 51 de mai jos).

Tabel 51. Reproductibilitatea eșantioanelor SurePath – prepararea probelor folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit; reproductibilitate calitativă

Membru al panelului	Tip celulă	Valoare RLU/CO medie	Abatere standard	Rezultat pozitiv al testării (%) (n/N)
1N	H-9	0,38	0,06	0,2 (1/665)
2E	SiHa și H-9	1,06	0,17	61,6 (410/666)
3P	SiHa și H-9	4,51	0,78	100,0 (666/666)
4P	SiHa și H-9	8,34	1,57	100,0 (665/665)
5P	SiHa și H-9	24,69	5,12	100,0 (590/590)

Rezultatele indică faptul că eșantioanele SurePath aflate la 20% sau mai mult de CO este de așteptat să genereze rezultate concordante. Eșantioanele SurePath apropiate de CO au generat un număr aproximativ egal de rezultate pozitive și negative. Aceste date demonstrează că prepararea probelor de eșantioane SurePath folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit urmată de testarea cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test generează rezultate reproductibile.

Rezultatele studiului intern au fost, de asemenea, utilizate pentru a evalua reproductibilitatea cantitativă a rezultatelor obținute cu prepararea probelor de eșantioane SurePath folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit.

Trei operatori diferiți au efectuat testarea în 6 zile diferite folosind 3 instrumente QIASymphony SP diferite și 3 loturi diferite de QIASymphony DSP HPV Media Kit cu membrii panelului 1N, 2E, 3P, 4P și 5P. Membrii panelului 1N, 2E, 3P și 4P au fost testați cu 18 replicare, generând câte 162 de puncte de date pentru fiecare membru al panelului. Membrul panelului 5P a fost testat cu 16 replicare, obținând 144 de puncte de date (consultați Tabel 52 de mai jos).

Tabel 52. Reproductibilitatea eșantioanelor SurePath – prepararea probelor folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit; reproductibilitate cantitativă

Membru al panelului	n	Valoare RLU/CO medie	Abatere standard			Abatere standard totală estimată	CV total estimat (%)
			În rulări	Între zile	Între combinații*		
1N	162	0,37	0,06	0,02	0,03	0,07	19,18
2E	162	1,05	0,14	0,07	0,10	0,18	17,41
3P	162	4,40	0,62	0,00	0,43	0,75	17,09
4P	162	8,24	1,15	1,01	1,34	1,77	21,42
5P	144	23,89	3,95	4,10	4,67	6,11	25,59

* O rulare constă dintr-o combinație dintr-un QIASymphony DSP HPV Media Kit, un instrument QIASymphony SP și un operator într-o anumită zi.

Reproductibilitatea cantitativă este foarte mare, așa cum este indicat de toate valorile CV rămase sub 26%. Abaterile standard între rulări sunt comparabile cu valoarea corespunzătoare din cadrul rulărilor, ceea ce indică rezultate concordante, indiferent de instrumentul sau lotul de kit folosit.

Prepararea probelor celulare post-gradient SurePath folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit

A fost realizat un studiu pentru a evalua reproductibilitatea rezultatelor folosind probe sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath simulate. Prepararea probelor folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit a fost urmată de testări automatizate cu RCS cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Materialul de cultură celulară în 70% SurePath Preservative Fluid a fost utilizat pentru a imita probele sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath. Cei 4 membri pozitivi ai panelului au fost preparați prin adăugarea de celule SiHa pozitive la ADN HPV în celule H-9 negative la ADN HPV în SurePath Preservative Fluid, în timp ce membrii panelului negativi la ADN HPV au conținut doar celule H-9 negative la ADN HPV în SurePath Preservative Fluid.

Patru operatori diferiți au efectuat testarea în 6 zile diferite folosind 3 instrumente QIASymphony SP diferite și 3 loturi diferite de QIASymphony DSP HPV Media Kit cu membrii panelului 1, 2, 3, 4 și 5. Membrii panelului 1, 2, 3 și 4 au fost testați cu 18 replicare în 37 de rulări diferite, generând câte 666 de puncte de date pentru membrii panelului 1 și 3 și 665 de puncte de date pentru membrii panelului 2 și 4. Două puncte de date au fost excluse din cauza volumului insuficient, semnalizat de QIASymphony SP în timpul preparării probelor. Membrul panelului 5 a fost testat cu 16 replicare în 37 rulări diferite, generând 592 de puncte de date.

Pentru membrii panelului cu un RLU/CO mediu de 20% sau mai mult peste CO, 1923 din 1923 (100,0%) au fost pozitivi. Pentru membrii panelului cu un RLU/CO mediu de 20% peste sau sub CO, 416 din 665 (62,6%) au fost pozitivi și 249 din 665 (37,4%) au fost negativi. Pentru membrii panelului cu un RLU/CO mediu de 20% sau mai mult sub CO, 666 din 666 (100%) au fost negativi (consultați Tabel 53 de mai jos).

Tabel 53. Reproductibilitatea probelor sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath – prepararea probelor folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit; reproductibilitate calitativă

Membru al panelului	Tip celulă	Valoare RLU/CO medie	Abatere standard	CV (%)	Rezultat pozitiv al testării (%) (n/N)
1	H-9	0,12	0,02	18,77	0,0 (0/666)
2	SiHa și H-9	0,96	0,11	11,15	62,6 (416/665)
3	SiHa și H-9	4,72	0,56	11,89	100,0 (666/666)
4	SiHa și H-9	9,34	0,98	10,46	100,0 (665/665)
5	SiHa și H-9	24,9	3,37	13,55	100,0 (592/592)

Rezultatele indică faptul că probele sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath aflate la 20% sau mai mult de CO este de așteptat să genereze rezultate concordante. Probele sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath apropiate de CO au generat un număr aproximativ egal de rezultate pozitive și negative. Aceste date demonstrează că prepararea probelor sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit urmată de testarea cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test generează rezultate reproductibile.

Rezultatele studiului intern au fost, de asemenea, utilizate pentru a evalua reproductibilitatea cantitativă a rezultatelor obținute cu prepararea probelor sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit.

Patru operatori diferiți au efectuat testarea în 6 zile diferite folosind 3 instrumente QIASymphony SP diferite și 3 loturi diferite de QIASymphony DSP HPV Media Kit cu membrii panelului 1, 2, 3, 4 și 5. Membrii panelului 1, 2, 3 și 4 au fost testați cu 18 replicare, generând câte 162 de puncte de date pentru fiecare membru al panelului. Membrul panelului 5 a fost testat cu 16 replicare, obținând 144 de puncte de date (consultați Tabel 54 de mai jos).

Tabel 54. Reproductibilitatea probelor sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath – prepararea probelor folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit; reproductibilitate cantitativă

Membru al panelului	n	Valoare RLU/CO medie	Abatere standard			Abatere standard totală estimată	CV total estimat (%)
			În rulări	Între zile	Între combinații*		
1	162	0,12	0,02	0,00	0,01	0,02	19,80
2	162	1,00	0,08	0,02	0,06	0,10	10,27
3	162	4,99	0,37	0,13	0,38	0,55	11,00
4	162	9,78	0,61	0,23	0,54	0,85	8,72
5	144	26,40	2,19	0,70	1,51	2,75	10,41

* Între combinații de zile diferite, operatori diferiți, loturi diferite de QIASymphony DSP HPV Media Kit și instrumente QIASymphony SP diferite.

Reproductibilitatea cantitativă este foarte mare, așa cum este indicat de toate valorile CV rămase sub 20%. Abaterile standard între rulări sunt comparabile cu valoarea corespunzătoare din cadrul rulărilor, ceea ce indică rezultate concordante, indiferent de instrumentul sau lotul de kit folosit.

Reactivitatea încrucișată

A fost analizată o sursă de bacterii, virusuri și plasmide întâlnite în mod obișnuit în tractul anogenital feminin, precum și o colecție de tipuri de HPV cutaneo-tropice pentru care au fost disponibile clone, pentru a determina dacă reactivitatea încrucișată s-ar putea produce cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Toate microorganismele au fost analizate la concentrații de 1×10^5 și 1×10^7 organisme pe ml. ADN-ul purificat al virusurilor și plasmidelor a fost analizat la o concentrație de 4 ng/ml.

Următoarele bacterii au fost testate și toate au fost testate negativ în *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test:

- *Acinetobacter anitratus*
- *Acinetobacter Iwoffii* (ATCC® 17908)
- *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285)
- *Bacteroides melaninogenicus*
- *Candida albicans* (ATCC 14053 or 10231)
- *Chlamydia trachomatis*
- *Enterobacter cloacae*
- *Escherichia coli* (HB101)*
- *Escherichia coli**
- *Fusobacterium nucleatum*
- *Gardnerella vaginalis*
- *Haemophilus ducreyi*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Lactobacillus acidophilus*
- *Mobiluncus curtisii*
- *Mobiluncus mulieris*
- *Mycoplasma hominis*
- *Mycoplasma hyorhinis*
- *Neisseria gonorrhoeae* (ATCC 19424)
- *Neisseria lactamica* (NRL 2118)
- *Neisseria meningitidis* (ATCC 13077)
- *Neisseria sicca* (ATCC 29256)
- *Peptostreptococcus anaerobius*
- *Proteus vulgaris* (ATCC 21117, 8427, 33420)
- *Serratia marcescens*
- *Staphylococcus aureus* (tulpina Cowan)

* Au fost testate atât tulpina de *E. coli* folosită pentru dezvoltarea plasmidelor (HB101), cât și un izolat clinic de *E. coli*.

- *Staphylococcus epidermidis*
- *Streptococcus faecalis* (ATCC 14508)
- *Streptococcus pyogenes* (ATCC27762)
- *Treponema pallidum*
- *Trichomonas vaginalis*
- *Ureaplasma urealyticum*

Următorul ADN viral sau plasmidic sau ser uman au fost testate și toate au fost testate negativ în *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test:

- Adenovirus 2
- Citomegalovirus
- Virusul Epstein-Barr
- Ser pozitiv la antigenul de suprafață al virusului hepatitei B
- Herpes simplex I
- Herpes simplex II
- Virusul imunodeficienței umane (HIV, ADN RT)
- Tipurile de HPV 1, 2, 3, 4, 5, 8, 13 și 30
- Virusul simian tip 40 (SV40)

Singura plasmidă care a prezentat reactivitate încrucișată în *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test a fost pBR322. Reactivitatea încrucișată între pBR322 și amestecul de sondă nu este neașteptată, deoarece este dificil să eliminați tot ADN-ul vectorial pBR322 la izolarea elementului de inserție HPV. Prezența secvențelor omoloage pBR322 a fost raportată la eșantioanele genitale umane și s-au putut produce rezultate fals-pozitive în prezența unor niveluri ridicate de plasmidă bacteriană. Cu toate acestea, 298 de eșantioane clinice testate pozitiv cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test nu au avut rezultate pozitive din cauza pBR322 atunci când au fost testate cu o sondă pBR322. Astfel, probabilitatea unui rezultat fals-pozitiv cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test din cauza secvențelor omoloage pBR322 din eșantioane clinice pare să fie scăzută.

Hibridizarea încrucișată

Optsprezece tipuri diferite de HPV (de mare risc și cu risc redus) au fost testate cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test la concentrații de 4 ng/ml de ADN HPV. Toate țintele HPV de mare risc au fost pozitive. Acest studiu a demonstrat, de asemenea, că există o cantitate mică de hibridizare încrucișată între tipurile de HPV 6 și 42 și *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Eșantioanele pacienților cu niveluri ridicate (4 ng/ml sau mai mari) ale tipurilor de HPV 6 sau 42 pot avea rezultate fals-pozitive la *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Semnificația clinică este aceea că pacientele cu 4 ng/ml sau mai mult din tipurile de HPV 6 sau 42 pot fi trimise în mod inutil la colposcopie.

De asemenea, s-a demonstrat că *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test reacționează încrucișat cu tipurile de HPV 40, 53 și 66. Aceste tipuri sunt rare și nu există dovezi suficiente pentru a stabili corelația exactă între infecția cu aceste tipuri și dezvoltarea bolii de grad înalt (15). De asemenea, s-a raportat în literatura de specialitate că sondele complexe similare cu cele utilizate în această testare pot genera rezultate fals-pozitive din cauza hibridizării încrucișate cu tipurile de HPV 11, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 sau MM9 (35). Deși multe dintre aceste tipuri de HPV sunt rare sau tipuri inedite care nu sunt deseori întâlnite la boala de grad înalt, pacientele ale căror eșantioane conțin niveluri ridicate ale acestor tipuri de ADN HPV pot fi trimise în mod eronat colposcopie.

Efectul sângelui și al altor substanțe asupra eșantioanelor în STM

Efectul sângelui și al altor substanțe potențial interferente, definite sau nedefinite, a fost evaluat în *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Sângele integral, crema de duș, crema antifungică și gelul contraceptiv (agenți care se găsesc în mod obișnuit în eșantioanele cervicale) au fost adăugate în eșantioane STM-negative și STM-pozitive (grupuri de eșantioane clinice și eșantioane non-clinice) la concentrații care pot fi găsite în eșantioanele cervicale.

Nu s-au observat rezultate fals-pozitive cu niciunul dintre cei patru agenți, indiferent de concentrație. Cu toate acestea, un rezultat fals-negativ poate fi raportat la eșantioane clinice cu niveluri de ADN HPV apropiate de CO pentru testare (1 pg/ml) dacă sunt prezente concentrații mari de cremă antifungică sau gel contraceptiv. Totuși, este foarte puțin probabil ca un eșantion clinic să fie format aproape în întregime dintr-una din aceste substanțe, deoarece colul uterin este curățat în mod normal înainte de obținerea de eșantioane pentru frotiul Papanicolau și pentru testarea HPV.

Efectul sângelui și al altor substanțe asupra eșantioanelor în PreservCyt

Prepararea manuală a probelor

Efectul sângelui și al altor substanțe potențial interferente, definite sau nedefinite, potențial prezente în eșantioanele în PreservCyt, a fost evaluat în *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Sângele integral, crema de duș, crema antifungică și gelul contraceptiv (agenți care se găsesc în mod obișnuit în eșantioanele cervicale) au fost adăugate în grupuri de eșantioane clinice negative și pozitive în PreservCyt la concentrații care pot fi găsite în eșantioanele cervicale. Nu s-au observat rezultate fals-pozitive sau fals-negative cu niciunul dintre cei 4 agenți, indiferent de concentrație. Mai mult, substanțele inerente din unele eșantioane clinice nu inhibă detecția ADN-ului HPV de către *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Prepararea probelor folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit

Efectele sângelui și ale altor substanțe potențial interferente din eșantioanele PreservCyt au fost evaluate folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit pentru prepararea probelor și testarea automatizată cu RCS folosind *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Au fost testate efectele următoarelor substanțe potențial interferente:

- Cremă antifungică
- Cremă antiinflamatoare
- Sânge
- Gel contraceptiv
- Cremă de duș
- Supozitoare deodorante pentru femei
- Gel lubrifiant
- Spermicid

Fiecare substanță a fost adăugată în grupuri clinice negative și pozitive. Nu s-au observat rezultate fals-pozitive sau fals-negative cu niciuna dintre substanțe la o concentrație care poate fi găsită în eșantioane cervicale. Cu toate acestea, un rezultat fals-negativ poate fi raportat la eșantioane clinice cu niveluri de ADN HPV apropiate de CO pentru testare, dacă sunt prezente concentrații mari de cremă antifungică, gel lubrifiant vaginal sau sânge. Totuși, este foarte puțin probabil ca un eșantion clinic să fie format aproape în întregime dintr-una din aceste substanțe, deoarece colul uterin este curățat în mod normal înainte de obținerea de eșantioane pentru frotiul Papanicolau și pentru testarea HPV.

Prepararea probelor folosind QIASymphony DSP AXpH DNA Kit

Efectul sângelui integral din eșantioanele PreservCyt a fost evaluat folosind QIASymphony DSP AXpH DNA Kit pentru prepararea probelor și *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test pentru testare. Eșantioanele clinice cu conținut vizibil de sânge au fost selectate și testate folosind atât metoda de preparare manuală a probelor, cât și metoda automatizată de preparare a probelor, folosind QIASymphony DSP AXpH DNA Kit. Au fost comparate rezultatele pentru 238 de eșantioane și s-a obținut un acord total de 94,12% și o valoare p McNemar de 0,2850, ceea ce indică faptul că nu există nicio diferență semnificativă statistic în performanța clinică între metoda de preparare manuală a probelor și metoda de preparare automatizată a probelor, folosind QIASymphony DSP AXpH DNA Kit.

Au fost testate efectele următoarelor substanțe potențial interferente:

- Cremă de duș
- Cremă antifungică

- Gel contraceptiv
- Celule mononucleare din sânge periferic (Peripheral blood mononuclear cells, PBMC)
- Gel lubrifiant
- Spray pentru femei
- Spermicid
- Particule magnetice
- TopElute Fluid

Fiecare substanță a fost adăugată în grupuri celulare negative și pozitive la concentrații care pot fi găsite în eșantioane cervicale sau pot fi adăugate în timpul preparării probelor. Nu s-au observat rezultate fals-pozitive cu niciuna dintre substanțe, indiferent de concentrație. Nu s-au observat rezultate fals-negative, cu excepția gelului contraceptiv.

Nu recoltați un eșantion cervical PreservCyt pentru prepararea automatizată a probelor folosind QIASymphony DSP AXpH DNA Kit, dacă există gel contraceptiv.

Efectul sângelui și al altor substanțe asupra eșantioanelor în SurePath

Prepararea probelor SurePath folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit

Efectele sângelui și ale altor substanțe potențial interferente din probele SurePath au fost evaluate folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit pentru prepararea probelor și testarea automatizată cu RCS folosind *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Au fost testate efectele următoarelor substanțe potențial interferente:

- Cremă antifungică
- Cremă antiinflamatoare
- Sânge
- Gel contraceptiv
- Cremă de duș
- Supozitoare deodorante pentru femei
- Gel lubrifiant
- Spermicid

Fiecare substanță a fost adăugată în grupuri clinice negative și pozitive. Nu s-au observat rezultate fals-pozitive cu niciuna dintre substanțe la o concentrație care poate fi găsită în eșantioane cervicale.

Nu s-au observat rezultate fals-negative, cu excepția următoarelor substanțe:

- Gelul contraceptiv a generat rezultate fals-negative la o concentrație foarte mică.
- Dacă în eșantion există o concentrație ridicată de cremă antifungică, un rezultat fals-negativ poate fi raportat la eșantioanele clinice cu niveluri de ADN HPV apropiate de CO pentru testare. Totuși, este foarte puțin probabil ca un eșantion clinic să fie format aproape în întregime din cremă antifungică, deoarece colul uterin este curățat în mod normal înainte de obținerea de eșantioane pentru frotiul Papanicolau și pentru testarea HPV.

Nu recoltați un eșantion cervical SurePath pentru prepararea automatizată a probelor folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit, dacă există cremă antifungică sau gel contraceptiv.

Prepararea probelor sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit

Efectele sângelui și ale altor substanțe potențial interferente din probele sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath au fost evaluate folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit pentru prepararea probelor și testarea automatizată cu RCS folosind *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Au fost testate efectele următoarelor substanțe potențial interferente:

- Cremă antifungică
- Cremă antiinflamatoare
- Sânge
- Gel contraceptiv
- Cremă de duș
- Supozitoare deodorante pentru femei
- Gel lubrifiant
- Spermicid

Fiecare substanță a fost adăugată la grupuri clinice negative și pozitive care au fost apoi procesate prin BD PrepMate System pentru a imita o probă sub formă de peleți celulari post-gradient SurePath. Un singur rezultat fals-positiv a fost observat atât pentru sânge, cât și pentru crema antifungică; totuși, analiza statistică nu a prezentat nicio interferență semnificativă. Nu s-au observat rezultate fals- pozitive cu niciuna dintre celelalte substanțe la o concentrație care poate fi găsită în eșantioane cervicale.

Au fost observate rezultate fals-negative pentru crema antifungică, crema antiinflamatoare și gelul contraceptiv. Nu recoltați un eșantion cervical SurePath pentru prepararea automatizată a probelor folosind QIASymphony DSP HPV Media Kit, dacă există cremă antifungică, cremă antiinflamatoare sau gel contraceptiv.

Transfer

RCS a fost conceput pentru a reduce la minimum contaminarea eșantioanelor sau transferul fosfatazei alcaline reziduale prin utilizarea de vârfuri de pipetă de unică folosință pentru aspirarea reactivului și a eșantionului. Pentru a confirma această caracteristică de proiectare, QIAGEN a efectuat mai multe studii pentru a evalua dacă utilizarea RCS a crescut potențialul de transfer sau contaminare încrucișată a eșantioanelor în comparație cu metoda manuală. Au fost folosite mai multe instrumente RCS pentru a evalua potențialul de transfer de la un sistem la altul.

Într-un studiu, 2 ng și 20 ng de plasmidă ADN HPV au fost adăugate materialului pentru substanța de control negativă pentru a prepara eșantioane în STM puternic pozitive. Concentrația de 20 ng/ml generează valori RLU de aproximativ 3-5 ori mai mari decât cele ale eșantionului clinic cel mai puternic pozitiv, preconizat a fi observat în timpul testării clinice de rutină. Aceste eșantioane puternic pozitive simulate au fost amplasate pe întreaga microplacă într-un tipar tablă de șah, alternând cu godeuri care conțin doar substanță de control negativă (godeuri de testare). Acest model ia în considerare efectele aditive potențiale ale eșantioanelor puternic pozitive secvențiale. Apoi, microplăcile au fost testate utilizând atât metoda de testare automatizată cu RCS, cât și cea manuală. După procesare au fost comparate numerele de pugodeuri de testare fals- pozitive. Testarea automatizată cu RCS nu a produs mai multe godeuri de testare fals- pozitive decât testarea manuală cu aceste eșantioane în STM simulate, chiar și atunci când o secvență extrem de mare de eșantioane pozitive a fost inclusă pe microplacă.

În a doua evaluare transferului, eșantioanele PreservCyt ale pacientelor pozitive la HPV au fost combinate pentru a crea un panel de eșantioane cu niveluri diferite de chemiluminiscență pentru a produce valori RLU/CO reprezentative ale intervalului preconizat în timpul testării clinice automatizate cu RCS de rutină. Eșantioanele pozitive au variat de la aproximativ 200 la 1800 RLU/CO. Pentru a evalua potențialul de transfer, inclusiv efectele potențial aditive ale rezultatelor secvențiale puternic pozitive, acești membri pozitivi ai panelului au fost amplasați pe microplăci într-un tipar tablă de șah, lângă godeurile cu substanțe de control negative. Aceste plăci au fost apoi testate folosind metoda de testare automatizată cu RCS.

Rezultatele acestei evaluări a transferului, folosind eșantioane comasate de la pacient, sugerează o rată potențială fals- pozitivă de 0,3% din cauza efectelor de transfer atunci când se efectuează testarea automatizată cu RCS cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Experiența QIAGEN în efectuarea de testări cu eșantioane PreservCyt comasate sugerează că gruparea eșantioanelor PreservCyt ale pacientelor creează eșantioane care nu prezintă caracteristici similare cu eșantioanele recoltate de la o singură pacientă. Deși efectele acestei comasări asupra potențialului de transfer al testării automatizate cu RCS sunt necunoscute, testarea pre-clinică suplimentară a testării automatizate cu RCS nu a indicat potențial crescut de rezultate fals- pozitive din cauza transferului. Aceste evaluări au fost efectuate folosind eșantioane de plasmide artificiale cu concentrații ADN de aproape 5 ori mai mari decât cele observate în mediul clinic.

O a treia evaluare a transferului a creat eșantioane de testare prin adăugarea unui colorant fluorescent în concentrații reprezentative pentru intervalul dinamic RLU al testului față de matricele de fundal care au aproximat viscozitatea eșantioanelor clinice și a reactivilor *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Aceste eșantioane de testare au fost apoi procesate folosind 3 instrumente RCS separate și a fost evaluat potențialul de transfer al fiecăreia dintre următoarele etape procedurale cheie ale RCS:

- Transfer eșantion
- Transfer de la o placă la alta
- Adăugare sondă
- Agitare microplăci
- Spălare microplăci

Fluorescența rezultată a fost măsurată la o lungime de undă de excitație de 485 nm și o lungime de undă de emisie de 535 nm și a fost suficient de sensibilă pentru a detecta un eveniment de transfer de ordinul a 1:20.000, ceea ce ar corespunde unui rezultat fals-pozitiv cu *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test (adică 1 pg în 20 ng). Rezultatele acestei evaluări nu au demonstrat niciun eveniment de transfer în timpul oricăreia dintre etapele procedurale cheie ale RCS care ar duce la un rezultat fals-pozitiv al *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Stabilitatea reactivului pe instrument

QIAGEN a evaluat caracteristicile de performanță ale testării automatizate cu RCS atunci când a utilizat reactivi care au rămas pe aparat, pe platforma sistemului, pentru perioade îndelungate. Reactivii cel mai probabil să fie supuși unei amplasări prelungite pe aparat includ amestecul de sondă, DR1, DR2 și microplaca de capturare.

Performanța testării a fost evaluată folosind atât reactivi proaspăt preparați, cât și reactivi care au fost lăsați să stea pe instrumentul RCS la temperatura camerei pentru o perioadă de 16 ore (pentru a simula 2 ture de lucru în laborator). Testarea eșantioanelor clinice simulate a fost efectuată folosind 2 instrumente RCS în fiecare din cele 2 zile de testare cu o matrice de reactivi definită (consultați Tabel 55 de mai jos).

Tabel 55. Model de studiu pentru stabilitatea reactivului pe aparat

Instrument RCS	Ziua 1	Ziua 2
1	Reactivi vechi	Reactivi proaspeți
2	Reactivi proaspeți	Reactivi vechi

O reprezentare grafică a tuturor punctelor de date RLU/CO este prezentată în Figura 3 de mai jos. Reprezentarea grafică și analiza de regresie pentru reactivi vechi comparativ cu reactivi proaspeți indică acordul între reactivii vechi și cei proaspeți.

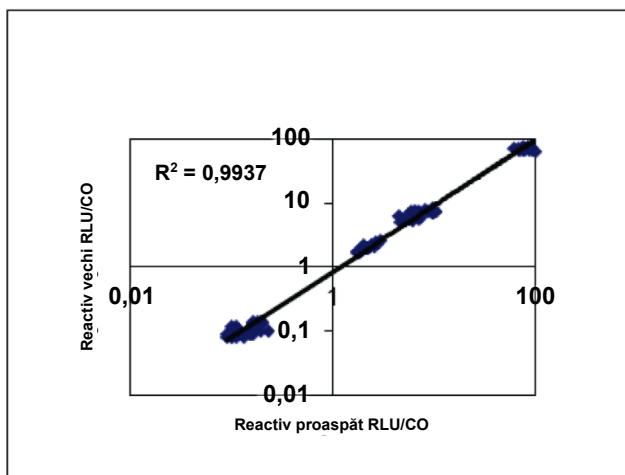


Figura 3. Perspectivă explodată, care compară valorile calibratorului testului cu valorile substanței de control folosind reactivi vechi și proaspeți.

Examinarea ulterioară a rezultatelor acordului indică faptul că rezultatele calitative nu s-au schimbat la folosirea reactivilor vechi (consultați Tabel 56 de mai jos).

Tabel 56. Acordul dintre reactivii proaspeți și cei vechi

Măsură statistică	Rezultat
Acord total (%)	100,0%
(n/N)	(96/96)
IÎ 95%	97,97-100,0
Acord pozitiv (%)	100,0%
(n/N)	(64/64)
IÎ 95%	97,97-100,0
Acord negativ (%)	100,0%
(n/N)	(32/32)
IÎ 95%	97,97-100,0
R ²	0,9937
Pantă	0,97
Intersecție	0,47
Kappa	1,0

Analiza datelor arată că rezultatele sunt identice statistic pentru reactivii proaspeți și cei vechi, ceea ce indică faptul că reactivii sunt suficient de stabili când sunt amplasați pe instrument pentru o perioadă de până la 16 ore.

Referințe

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

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












21. Lorincz, A.T., Quinn, A.P., Goldsborough, M.D., McAllister, P., and Temple, G.F. (1989) Human papillomavirus type 56: a new virus detected in cervical cancers. *J. Gen. Virol.* **70**, 3099.
22. Lorincz, A.T., Quinn, A.P., Goldsborough, M.D., Schmidt, B.J., and Temple, G.F. (1989) Cloning and partial DNA sequencing of two new human papillomavirus types associated with condylomas and low grade cervical neoplasia. *J. Virol.* **63**, 2829.
23. Beaudenon, S. et al. (1987) Plurality of genital human papillomaviruses: characterization of two new types with distinct biological properties. *Virology* **161**, 374.
24. Schiffman, M. (1993) Latest HPV findings: some clinical implications. *Contemp. Ob. Gyn.* **38**, 27.
25. Volpers, C.; and Streeck, R.E. (1991) Genome organization and nucleotide sequence of human papillomavirus type 39. *Virology* **181**, 419.
26. Matsukura, T., and Sugase, M. (1990) Molecular cloning of a novel human papillomavirus (type 58) from an invasive cervical carcinoma. *Virology* **177**, 833.
27. Rho, J., Roy-Burman, A., Kim, H., de Villiers, E.M., Matsukura, T., and Choe, J. (1994) Nucleotide sequence and phylogenetic classification of human papillomavirus type 59. *Virology* **203**, 158.
28. Bosch, F.X. et al. (1995) International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**, 796.
29. Kahn, T., Schwarz, E., and zur Hausen, H. (1986) Molecular cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus (HPV 30) from a laryngeal carcinoma. *Int. J. Cancer* **51**, 61.
30. Koutsky, L.A. et al. (1992) A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N. Engl. J. Med.* **327**, 1272.
31. Nieminen, P., Aho, M., Vesterinen, E., Stellato, G., Vaheri, A., Soares, V.R.X., Paavonen, J. (1991) Natural history of HPV infection: preliminary results of a cohort study [abstract]. In: 1991 Papillomavirus Workshop. Seattle, WA p 77.

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

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

Simboluri

Simbolurile din tabelul următor sunt folosite în etichetarea asociată a produselor.

Simbol	Definiția simbolului
	Conține suficient pentru 96/384 de testări
	Cod lot
	Dispozitiv medical pentru diagnostic in vitro
	Simbol marcat CE-IVD
	Număr de catalog
	Producător
	Reprezentant autorizat în Comunitatea Europeană
	Data de expirare
	Limitări de temperatură
	Consultați instrucțiunile de utilizare
	Număr de comercializare global articol

Ghid de depanare

Comentarii și sugestii

Modificare incorectă a culorii sau lipsa modificării culorii observată în timpul denaturării

- | | |
|---|---|
| a) DNR nu a fost preparat corect | Asigurați-vă că DNR conține colorantul indicator și are o culoare violet închis. |
| b) DNR nu a fost adăugat | Asigurați-vă că s-a adăugat DNR la eșantion, măsurând volumul eșantionului (valoare preconizată 1,5 ml). Dacă volumul indică faptul că DNR nu a fost adăugat, faceți adăugarea corectă, amestecați și continuați testarea dacă se observă modificarea corespunzătoare a culorii. |
| c) Eșantionul conține sânge sau alte materiale care maschează modificarea culorii | Modificarea exactă descrisă a culorii nu este de așteptat cu aceste tipuri de eșantioane; rezultatele testării nu trebuie afectate negativ. |
| d) pH-ul eșantionului poate fi neobișnuit de acid | Dacă nu se aplică niciuna dintre celelalte cauze, eșantionul poate fi neobișnuit de acid și modificarea preconizată a culorii nu se va produce. Recoltați un nou eșantion înainte de aplicarea acidului acetic pe colul uterin, deoarece pH-ul incorect al eșantionului va afecta negativ rezultatele testării. |

Substanțele de control al calității generează rezultate incorecte

- | | |
|---|--|
| a) Protocol de testare ales greșit pentru testare | Dacă protocolul de testare este incorect pentru testarea efectuată, citiți din nou microplaca în termen de 30 de minute de la adăugarea DR2 folosind protocolul de testare corect. |
| b) Amplasarea inversă a QC1-LR și QC2-HR | Retestați eșantioanele. |

Comentarii și sugestii

- c) Amplasarea inversă a HRC și QC2-HR Retestați eșantioanele.

Modificare incorectă a culorii observată în timpul hibridizării

- a) Amestecare inadecvată a amestecului de sondă cu calibratoarele, substanțele de control al calității și/sau eșantioanele denaturate; sau amestecul de sondă nu a fost adăugat; sau a fost adăugat un volum incorect de reactiv Agitați microplaca de hibridizare sau suportul pentru microtuburi care conține microtuburi pentru încă 2 minute. Dacă există microtuburi sau godeuri de microplăci care încă rămân violet, adăugați încă 25 μ l de amestec de sondă corect și amestecați bine. Dacă la adăugarea și reamestecarea amestecului de sondă, modificarea corespunzătoare a culorii nu are loc și eșantionul nu a conținut sânge sau alte materiale, retestați eșantionul.
- b) Eșantionul conține sânge sau alte materiale care maschează modificarea culorii Modificarea exactă descrisă a culorii nu este de așteptat cu aceste tipuri de eșantioane; rezultatele testării nu trebuie afectate negativ.
- c) Eșantionul a avut < 1000 μ l STM Verificați volumul eșantionului original. Volumul trebuie să fie 1425 μ l \pm 20 μ l (după scoaterea unei părți alicote de 75 μ l pentru testare). Dacă volumul este < 1425 μ l, eșantionul original a conținut < 1000 μ l STM. Obțineți un eșantion nou.

Testarea nu trece de validarea testului; nu s-a observat niciun semnal la calibratoarele, la substanțele de control al calității sau la eșantioanele pozitive

- a) Nu s-a adăugat nicio sondă în diluantul pentru sondă Preparați amestecul de sondă conform descrierii din aceste instrucțiuni de utilizare. Etichetați cu atenție tuburile.
- b) Sondă contaminată cu RNază în timpul preparării Utilizați vârfuri de pipete cu barieră de aerosoli atunci când pipetați sonda și purtați mănuși. Preparați amestecul de sondă într-un recipient steril. Folosiți doar rezervoare de reactiv curate, noi, de unică folosință.

Comentarii și sugestii

- | | |
|--|---|
| c) Amestecare inadecvată a amestecului de sondă | După adăugarea sondei în diluantul pentru sondă, se amestecă foarte bine prin vortexare la viteză mare timp de cel puțin 5 secunde. Trebuie să se producă un vortex vizibil. |
| d) Amestecare inadecvată a amestecului de sondă Mix și a eșantionului denaturat | După adăugarea amestecului de sondă și a eșantionului în fiecare godeu al microplăcii de hibridizare sau microtub de hibridizare, agitați pe Rotary Shaker I setat la 1100 ± 100 rpm timp de 3 ± 2 minute. Verificați dacă se schimbă culoarea de la violet la galben în fiecare godeu al microplăcii sau în fiecare microtub. |
| e) Timp sau temperatură incorect(ă) în timpul etapei de hibridizare | Hibridizați timp de 60 ± 5 minute la 65 ± 2 °C. Verificați temperatura Microplate Heater I sau a băii de apă. Asigurați-vă că Microplate Heater I sau baia de apă este setat(ă) pentru a încălzi eșantioanele la temperatura corectă și este preîncălzit(ă) timp de 60 de minute înainte de utilizare. Asigurați-vă că nivelul apei este adecvat pentru încălzirea eșantioanelor la temperatura corectă. Băile de apă trebuie calibrate periodic. |
| f) Amestecare inadecvată în timpul etapei de capturare | Agitați pe un Rotary Shaker I timp de 60 ± 5 minute la 20-25 °C, conform descrierii din aceste instrucțiuni de utilizare. Verificați viteza Rotary Shaker I prin calibrare. (Consultați <i>Manualul de utilizare Rotary Shaker I</i>). |
| g) Lipsa adăugării cantității corecte de DR1 sau lipsa incubării pe perioada specificată | Pipetați 75 μl DR1 în fiecare godeu al microplăcii folosind o pipetă cu 8 canale. Incubați la 20-25 °C timp de 30-45 de minute. |
| h) Lipsa adăugării cantității corecte de DR2 sau lipsa incubării pe perioada specificată | Pipetați 75 μl DR2 în fiecare godeu al microplăcii folosind o pipetă cu 8 canale. Incubați la 20-25 °C timp de 15-30 de minute. |

Comentarii și sugestii

- | | |
|---|---|
| i) Defecțiune a instrumentului DML sau programare incorectă | Consultați manualul de utilizare al instrumentului DML respectiv și manualul de utilizare al software-ului pentru instrucțiuni suplimentare sau contactați Serviciile tehnice QIAGEN. |
|---|---|

Valori RLU ridicate în calibratoare, substanțele de control al calității și/sau eșantioane (≥ 200 RLU în multe sau în toate godeurile microplăcii); testarea poate eșua la validarea testului

- | | |
|--|--|
| a) DNR nu a fost adăugat; volum incorect de reactiv adăugat; amestecare inadecvată a DNR cu eșantioane, calibratoare sau substanțe de control al calității | Asigurați-vă că pipeta de repetare administrează cu exactitate înainte de a adăuga DNR. Pipetele calibrate sunt esențiale. Adăugați o jumătate de volum de DNR în fiecare eprubetă și amestecați bine. Pentru a evita rezultatele fals-pozitive, asigurați-vă că lichidul spală toată suprafața interioară a eprubetei. Calibratoarele, substanțele de control al calității și eșantioanele trebuie să devină violet după adăugarea DNR. |
| b) Scurgere de lumină în instrumentul DML; ușa nu este etanșă; sigilați garnitura din jurul ușii | Verificați citirea de fundal (măsurarea datelor brute) a instrumentului DML citind o microplacă goală. O citire mai mare de 50 RLU indică faptul că există o scurgere de lumină. Consultați manualul de utilizare al instrumentului DML respectiv pentru instrucțiuni sau contactați Serviciile tehnice QIAGEN. |
| c) Contaminarea DR2 sau a godeurilor microplăcii de capturare cu DR1 sau fosfatază alcalină exogenă | Consultați „Verificarea contaminării DR2”, pagina 127. |
| d) Soluție tampon de spălare contaminată | Consultați „Verificarea contaminării aparatului de spălare și/sau a sursei de apă”, pagina 127. |
| e) Automated Plate Washer contaminat | Consultați „Verificarea contaminării aparatului de spălare și/sau a sursei de apă”, pagina 127. |

Comentarii și sugestii

- | | |
|--|---|
| f) Spălarea inadecvată a godeurilor microplăcii de capturare după incubarea DR1 | Spălați bine godeurile microplăcii de capturare cu soluție tampon de spălare de 6 ori, fie prin inundarea godeurilor, fie folosind Automated Plate Washer. După spălare, în godeurile microplăcii nu trebuie să fie vizibil lichid roz rezidual. Consultați <i>Manualul de utilizare Automated Plate Washer</i> pentru instrucțiuni privind testarea pentru contaminare sau defecțiuni. |
| g) Contaminarea cu DR1 a godeurilor microplăcii | Asigurați-vă că toate suprafețele de lucru sunt curate și uscate. Aveți grijă la utilizarea DR1. Evitați aerosolii. |
| h) Ștergerea soluției de hibridizare pe aceeași zonă a prosoapelor Kimtowels sau a prosoapelor echivalente din hârtie cu conținut redus de scame | Nu ștergeți din nou pe prosoape Kimtowels sau prosoape echivalente din hârtie cu conținut redus de scame folosite anterior. |
| i) Prosoape de ștergere incorecte folosite | Folosiți prosoape Kimtowels sau prosoape din hârtie echivalente cu conținut redus de scame pentru ștergere. |

Raporturi PC/NC scăzute sau număr mare de eșantioane slab pozitive cu rapoarte < 2,0 (> 20%); este posibil ca testarea să nu treacă validarea testului

- | | |
|--------------------------------------|---|
| a) Prepararea eșantionului inadecvat | <p>Adăugați volumul corect de DNR și amestecați bine prin vortexare. Pentru a evita rezultatele fals-pozitive, asigurați-vă că lichidul spală toată suprafața interioară a eprubetei.</p> <p>Pentru eșantioanele PreservCyt, asigurați-vă că ați finalizat amestecarea și resuspensia adecvate ale peletului celular înainte de incubarea pentru denaturare.</p> <p>Trebuie să se vadă o modificare distinctă a culorii, de la incolor la violet închis. Incubați timp de 45 ± 5 minute la 65 ± 2 °C.</p> |
|--------------------------------------|---|

Comentarii și sugestii

- | | |
|--|---|
| b) Amestec de sondă amestecat inadecvat sau amestec de sondă insuficient adăugat | Preparați amestecul de sondă conform descrierii. Amestecați bine prin vortexare, asigurându-vă că este produs un vortex vizibil. Amestecul de sondă trebuie adăugat în tuburi cu o pipetă de dislocuire pozitivă sau o pipetă multicanal pentru a asigura administrarea precisă. |
| c) Volum inadecvat de amestec de sondă adăugat în fiecare microtub de hibridizare sau godeu al microplăcii | Asigurați-vă că pipeta cu 8 canale administrează cu exactitate înainte de a adăuga amestec de sondă. Adăugați 25 µl de amestec de sondă în fiecare microtub sau godeu al microplăcii care conține calibratoare, substanțe de control al calității și eșantioane denaturate. Modificarea culorii trebuie să fie de la violet închis la galben după adăugare și amestecare temeinică. Eșantioanele PreservCyt trebuie să devină roz în loc de galben. |
| d) Lipsa activității DR1 | Depozitați DR1 la 2-8 °C. A se utiliza înainte de data de expirare. |
| e) Capturare insuficientă | Etapa de capturare trebuie realizată folosind un Rotary Shaker I setat la 1100 ±100 rpm. Validați viteza agitatorului prin calibrare. |
| f) Spălare necorespunzătoare | Spălați bine godeurile microplăcii cu soluție tampon de spălare de 6 ori, fie prin inundarea godeurilor, fie folosind Automated Plate Washer. |
| g) Soluție tampon de spălare contaminată | Consultați „Verificarea contaminării aparatului de spălare și/sau a sursei de apă”, pagina 127. |

Comentarii și sugestii

Serie de eșantioane pozitive cu valori RLU aproximativ identice

- a) Contaminarea godeurilor microplăcii de capturare în timpul testării Acoperiți microplaca de capturare în timpul tuturor incubărilor. Evitați expunerea eprubetelor la contaminarea cu aerosoli în timpul efectuării testului. Purtați mănuși fără pudră în timpul manipulărilor.
- b) Contaminare cu DR2 Asigurați-vă că nu contaminați stocul atunci când pipetați DR2 în godeurile microplăcii de capturare. Evitați contaminarea DR2 cu aerosoli proveniți de la DR1 sau din praful din laborator etc.
- c) Defecțiuni la Automated Plate Washer Consultați „Verificarea contaminării aparatului de spălare și/sau a sursei de apă”, pagina 127 sau consultați *Manualul de utilizare Automated Plate Washer* pentru instrucțiuni privind testarea pentru contaminare sau defecțiuni.

CV-uri mari între replicare

- a) Pipetare inexactă Verificați pipeta pentru a vă asigura că sunt administrate volume reproductibile. Calibrați cu regularitate pipetele.
- b) Amestecare insuficientă Amestecați bine în toate etapele. Vortexați înainte și după incubarea pentru denaturare și după adăugarea amestecului de sondă. Asigurați-vă că este produs un vortex vizibil.
- c) Transfer incomplet de lichid din microtuburile de hibridizare sau godeurile microplăcii de hibridizare pentru capturarea godeurilor microplăcii Asigurați-vă că în timpul etapei de transfer de la microplaca de hibridizare sau microtuburile de hibridizare în godeurile microplăcii de capturare sunt transferate volume reproductibile.

Comentarii și sugestii

- | | |
|---|---|
| d) Condiții inadecvate de spălare | Spălați bine godeurile microplăcii cu soluție tampon de spălare de 6 ori, fie prin inundarea godeurilor, fie folosind Automated Plate Washer. |
| e) Contaminarea cu DR1 a godeurilor microplăcii | Asigurați-vă că toate suprafețele de lucru sunt curate și uscate. Aveți grijă la utilizarea DR1. Evitați aerosolii. |

Rezultate fals-pozitive obținute din eșantioane negative cunoscute

- | | |
|---|---|
| a) DR2 contaminat | Asigurați-vă că nu veți contamina încrucișat eșantioanele pe măsură ce divizați în părți alicote DR2 între eșantioane. Dacă utilizați doar o parte dintr-un kit, divizați în părți alicote volumul necesar pentru testarea respectivă într-un rezervor cu reactiv curat de unică folosință înainte de umplerea pipetei. |
| b) Contaminarea cu DR1 a godeurilor microplăcii | Spălați bine godeurile microplăcii cu soluție tampon de spălare de 6 ori, fie prin inundarea godeurilor, fie folosind Automated Plate Washer. După spălare, în godeurile microplăcii nu trebuie să fie vizibil lichid roz rezidual. |
| c) Ștergerea pe aceeași zonă a prosoapelor Kimtowels sau a prosoapelor echivalente din hârtie cu conținut redus de scame în mai multe rânduri | Nu ștergeți pe zona care a fost utilizată anterior. |

Comentarii și sugestii

- d) Prepararea eșantionului inadecvat
- Adăugați volumul corect de DNR și amestecați bine prin vortexare. Pentru a evita rezultatele fals-pozitive, asigurați-vă că lichidul spală toată suprafața interioară a eprubetei.
- Pentru prepararea manuală a eșantioanelor PreservCyt, asigurați-vă că ați finalizat amestecarea și resuspensia adecvate ale peletului celular înainte de incubarea pentru denaturare. Consultați instrucțiunile de utilizare *digene* HC2 Sample Conversion Kit.
- Trebuie să se vadă o modificare distinctă a culorii, de la incolor la violet închis. Incubați timp de 45 ± 5 minute la 65 ± 2 °C. Pentru prepararea manuală a eșantioanelor SurePath, asigurați-vă că eșantioanele sunt incubate timp de 90 ± 5 minute la 65 ± 2 °C.
- e) Condiții inadecvate de spălare
- Spălați bine godeurile microplăcii cu soluție tampon de spălare de 6 ori, fie prin inundarea godeurilor, fie folosind Automated Plate Washer.
- f) Contaminarea vârfului de pipetă cu material nedenaturat în timpul transferului eșantionului denaturat în microtubul de hibridizare sau în godeul microplăcii de hibridizare
- Etapa de denaturare a procedurii de procesare a eșantionului trebuie efectuată conform indicațiilor din aceste instrucțiuni de utilizare. Vortexarea inadecvată a eșantioanelor, răsturnarea eprubetei și agitarea pot duce la denaturarea incompletă a hibrizilor ARN-ADN nespecifici endogeni față de eșantioanele cervicale. Pentru eșantioanele PreservCyt sau SurePath în special, acești hibridi sunt probabil prezenți pe pereții interiori ai eprubetei de denaturare a eșantionului. Pentru a preveni transferul acestui material celular nedenaturat, vârful de pipetă nu trebuie să atingă părțile laterale ale eprubetei de denaturare a eșantionului în timpul transferului eșantionului denaturat în microtubul de hibridizare sau în godeul microplăcii de hibridizare.

Comentarii și sugestii

Valori crescute ale NC RLU (> 200 RLU); restul testării se derulează conform așteptărilor

- a) DR2 a fost incubat la o temperatură mai mare de 20-25 °C Rulați din nou testarea și asigurați-vă că etapele de capturare și detecție sunt incubate la 20-25 °C.
- b) DR2 a fost incubat o perioadă mai mare de 30 de minute Citiți microplaca după 15 minute de incubare (și nu mai târziu de 30 de minute de incubare) la 20-25 °C.
- c) DR2 sau soluția tampon de spălare a fost contaminat(ă) cu fosfatază alcalină sau DR1 Consultați „Verificarea contaminării DR2”, pagina 127 sau „Verificarea contaminării aparatului de spălare și/sau a sursei de apă”, pagina 127.

Testarea nu trece de validarea testului; valoare $PC\bar{X}/NC\bar{X}$ crescută

- Amplasarea inversă a HRC și QC2 HR Retestați eșantioanele. Citiți cu atenție etichetele de pe flacoanele de calibrator și substanță de control al calității pentru a preveni inversarea amplasării acestor reactivi.

Verificarea contaminării DR2

1. Pipetați 75 µl din flaconul divizat în părți alicote, rezidual sau original de DR2 într-un godeu gol al microplăcii de capturare.

Notă: Testarea DR2 în replicare de 3 oferă o evaluare optimă a performanței.

2. Incubați la 20-25 °C timp de 15 minute. Evitați lumina directă a soarelui.
3. Măsurați microplaca folosind un instrument DML.

Substanța de control DR2 trebuie să fie < 50 RLU.

Dacă valorile DR2 sunt < 50 RLU, DR2 poate fi utilizat pentru a repeta testarea.

Dacă este contaminat (> 50 RLU), obțineți un kit nou și repetați testarea.

Verificarea contaminării aparatului de spălare și/sau a sursei de apă

1. Etichetați godeurile 1-4. Pipetați 75 µl de DR2 în 4 godeuri separate ale microplăcii de capturare.

Godeul 1 servește ca substanță de control DR2.

2. Pipetați 10 µl de soluție tampon de spălare din flaconul de spălare în godeul 2 al microplăcii.
3. Lăsați soluția tampon de spălare să curgă prin tubulatura de spălare. Pipetați 10 µl de soluție tampon de spălare din tubulatură în godeul 3 al microplăcii.
4. Obțineți o parte alicotă din apa folosită pentru prepararea soluției tampon de spălare. Pipetați 10 µl de apă în godeul 4 al microplăcii.
5. Incubați la 20-25 °C timp de 15 minute. Evitați lumina directă a soarelui.
6. Măsurați microplaca folosind un instrument DML.

Substanța de control DR2 (godeul 1) trebuie să fie < 50 RLU.

Comparați RLU din godeurile 2, 3 și 4 cu RLU al substanței de control DR2. RLU individual pentru godeurile 2, 3 și 4 nu trebuie să depășească 50 RLU din RLU al substanței de control DR2.

Valorile care depășesc 50 RLU ale substanței de control DR2 indică contaminarea.

Consultați „Metoda de spălare manuală”, pagina 54 pentru instrucțiuni cu privire la curățarea și întreținerea aparatului de spălare.

Verificarea contaminării Automated Plate Washer

1. Etichetați godeurile 1-5. Pipetați 75 µl de DR2 în 5 godeuri separate ale microplăcii de capturare.
Godeul 1 servește ca substanță de control DR2.
2. Pipetați 10 µl de soluție tampon de spălare din flaconul de spălare al Plate Washer în godeul 2 al microplăcii.
3. Pipetați 10 µl de lichid de clătire din flaconul de clătire al Plate Washer în godeul 3 al microplăcii.
4. Apăsăți butonul **Prime** (Amorsare) de pe tastatura Plate Washer, lăsând soluția tampon de spălare să curgă prin conducte. Pipetați 10 µl de soluție tampon de spălare din compartiment în godeul 4 al microplăcii.
5. Apăsăți butonul **Rinse** (Clătire) de pe tastatura Plate Washer, lăsând lichidul de clătire să curgă prin conducte. Pipetați 10 µl de soluție tampon de spălare din compartiment în godeul 5 al microplăcii.
6. Acoperiți și incubați 15 minute la 20-25 °C. Evitați lumina directă a soarelui.
7. Măsurați microplaca folosind un instrument DML.

Substanța de control DR2 (godeul 1) trebuie să fie < 50 RLU.

Comparați RLU din godeurile 2, 3, 4 și 5 cu RLU al substanței de control DR2. RLU individual pentru godeurile 2, 3, 4 și 5 nu trebuie să depășească 50 RLU din RLU al substanței de control DR2.

Valorile care depășesc 50 RLU ale substanței de control DR2 indică contaminarea Plate Washer.

Consultați *Manualul de utilizare Automated Plate Washer* pentru procedura de decontaminare.

Date de contact

Folosiți fișa de informații de contact QIAGEN furnizată în kitul de testare pentru a contacta reprezentanța locală QIAGEN.

Modificări semnificative

Modificările semnificative în această revizuire a acestor instrucțiuni de utilizare *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test sunt sintetizate în tabelul de mai jos:

Secțiune	Pagină	Modificare/Modificări
Avertizări și precauții	20	Informații noi GHS
Biopsii cervicale	26	Biopsii de până la 5 mm
Mărci comerciale	132	Brevete eliminate

Această pagină a fost lăsată necompletată în mod intenționat

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

Denumirile înregistrate, mărcile comerciale etc. utilizate în documentul de față, chiar dacă nu sunt marcate în mod specific, sunt protejate prin lege.

Acord de licență limitată pentru *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test

Utilizarea acestui produs înseamnă acceptarea următorilor termeni de către orice cumpărător sau utilizator al produsului:

1. Produsul poate fi utilizat doar în conformitate cu protocoalele furnizate împreună cu produsul și prezentul prospect și doar împreună cu componentele incluse în trusă. QIAGEN nu acordă nicio licență pentru niciuna dintre proprietățile sale intelectuale în vederea utilizării sau încorporării componentelor incluse în această trusă cu orice componentă care nu este inclusă în această trusă, dacă nu este precizat astfel în protocoalele furnizate împreună cu produsul, în prezentul manual și acest prospect.
2. În afară de licențele acordate în mod explicit, QIAGEN nu garantează sub nicio formă că acest kit și/sau utilizarea (utilizările) acestuia nu încalcă drepturile terților.
3. Această trusă și componentele sale sunt licențiate pentru o singură utilizare și nu pot fi reutilizate, recondiționate sau revândute, în afara cazului unei prevederi speciale QIAGEN.
4. QIAGEN declină în mod specific orice licențe, explicite sau implicite, altele decât cele declarate în mod explicit.
5. Cumpărătorul și utilizatorul kitului acceptă să nu ia măsuri și să nu permită niciunei persoane să ia măsuri care ar putea conduce la sau facilita oricare dintre faptele interzise prezentate mai sus. QIAGEN poate pune în aplicare interdicțiile din acest Acord de licență limitată în orice instanță și va recupera toate costurile anchetelor și cheltuielile de judecată, inclusiv onorariile avocaților, în orice acțiune pentru aplicarea acestui Acord de licență limitată sau a oricăruia dintre drepturile sale de proprietate intelectuală legate de kit și/sau componentele acestuia.

Pentru termenii actualizați ai licenței, consultați www.qiagen.com.

© 2012-2018 QIAGEN, toate drepturile rezervate.

