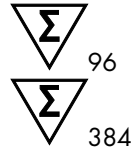


Augustus 2015

Gebruiksaanwijzing digene® HC2 High-Risk HPV DNA test



IVD

Een in vitro nucleïnezuurhybridisatie-assay met signaalamplificatie door middel van microtiterplaat-chemiluminescentie voor de kwalitatieve detectie van DNA van 13 hoogrisico typen humaan papillomavirus (HPV) in cervicale en vaginale samples

Voor gebruik met:

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

CE

REF

5197-1330 (set met 1 plaat)
618111 (set met 4 platen)



QIAGEN
19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874
VS

EC REP

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
DUITSLAND

1058538NL Rev. 02

Belangrijkste wijzigingen ten opzichte van de vorige herziene gebruiksaanwijzing:

- Toegevoegd samplebereidingsprocedure van SurePath postgradiënt-celletsamples met behulp van de QIAAsymphony® DSP HPV Media Kit samen met de bijbehorende prestatiegegevens.
- Bijgewerkt voor conformiteit met het wereldwijd geharmoniseerde systeem voor de indeling en etikettering van chemische stoffen (GHS).

Inhoud

Beoogd gebruik	8
Samenvatting en uitleg	10
Informatie met betrekking tot het pathogeen	11
Principe van de procedure	11
Samplebereiding met behulp van de QIA Symphony SP	13
Samplebereiding met de QIA Symphony DSP HPV Media kit	13
Samplebereiding met de QIA Symphony DSP AXpH DNA kit	14
Testen met behulp van het Rapid Capture System	14
Meegeleverde materialen	17
1-plaats kit	17
4-plaats kit	17
Inhoud van de kit	18
Benodigde maar niet meegeleverde materialen	20
Apparatuur en materialen voor in-vitrodiagnostiek	20
Algemene laboratoriumapparatuur en -materialen	21
Extra apparatuur en materialen voor de bereiding van PreservCyt-samples	23
Extra apparatuur en materialen voor de bereiding van SurePath-samples	23
Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen	24
Waarschuwingen	24
Samples	24
Natriumazide	25
Buffer N2	25
RCS-geautomatiseerd testen	26
Veiligheids- en risico's voor componenten	26
Voorzorgsmaatregelen	27
Bewaren en hanteren van reagentia	29
Componenten van de kit	29

Bereide reagentia	29
Afname en bereiding van samples.....	29
Cervicale en vaginale samples in STM.....	30
Cervixbiopten	31
Cervicale samples in PreservCyt-oplossing.....	31
Cervicale samples in SurePath-conserveervloeistof.....	32
Geautomatiseerde samplebereiding van SurePath-samples.....	33
Geautomatiseerde samplebereiding van SurePath postgradiënt-celletsamples.....	33
Handmatige samplebereiding van SurePath postgradiënt-celletsamples	34
Procedure	35
Bereiding van reagentia.....	35
Denaturation Reagent (Denaturatiereagens).....	37
Denaturatiereagens 2	38
Probemix	39
Wasbuffer.....	40
De plaatindeling maken	41
Samplebereiding.....	43
Geautomatiseerde samplebereiding van PreservCyt-samples met de QIASymphony DSP HPV Media kit	43
Samplebereiding van SurePath-samples en SurePath postgradiënt-cellets met behulp van de QIASymphony DSP HPV Media Kit	44
Samplebereiding van PreservCyt-samples met de QIASymphony DSP AXpH DNA kit.....	44
Handmatige samplebereiding van PreservCyt-samples.....	45
Handmatige samplebereiding van SurePath postgradiënt-cellets	45
Denaturatie en hybridisatie van samples die met de QIASymphony SP zijn verwerkt.....	47
Denaturatie van kalibrators, kwaliteitscontroles en DNA-eluatens voor handmatig testen	47
Optioneel stoppunt voor DNA-eluatens	48
Hybridisatie van DNA-eluatens	49
Denaturatie en hybridisatie van STM-samples en handmatig bereide PreservCyt en SurePath postgradiënt-celletsamples	49
Denaturatie van kalibrators, kwaliteitscontroles en STM-samples	50

Optioneel stoppunt voor bereide STM-samples en handmatig bereide PreservCyt en SurePath postgradiënt-cel pelletsamples	52
Hybridisatie van bereide STM-samples en handmatig bereide PreservCyt en SurePath postgradiënt-cel pelletsamples	52
Hybridisatie met gebruik van een microtiterplaat en Microplate Heater I.....	53
Hybridisatie met microbuisjes en een waterbad	54
Hybriden-capturing.....	56
Hybriden-detectie.....	57
Wassen	59
Methode met Automated Plate Washer (automatische plaatwasser).....	59
Methode met handmatig wassen.....	60
Signaalamplificatie.....	61
Meten van de capturing-microtiterplaten en genereren van resultaten	61
Interpretatie van de resultaten	63
Resultaten van metingen van STM-samples	63
Resultaten van metingen van SurePath-samples	63
Resultaten van metingen van PreservCyt-samples.....	63
RLE/CO-waarden dicht bij 1,0	64
Andere HPV-typen	64
Verificatie van de assaykalibratie	64
Negatieve kalibrator (NC).....	65
Positieve kalibrator	65
Gemiddelde van de positieve kalibrator /gemiddelde van de negatieve kalibrator	65
Berekening van de grenswaarde.....	66
Kwaliteitscontroles.....	66
Beperkingen	67
Werkingseigenschappen.....	68
Klinische werking bij het screenen van patiënten met een normale uitslag van een cervixuitstrijkje, als hulpmiddel bij de risicobeoordeling voor de behandeling van patiënten.....	68
Klinische prestaties bij het screenen van patiënten met een ASCUS-pap-uitslag ter bepaling van de noodzaak van een verwijzing voor een colposcopie.....	72

Klinische sensitiviteit en specificiteit voor de bepaling van het risico van hooggradige pathologie bij vrouwen met paptestuitslagen met LSIL- of HSIL pap-uitstrijkjes	74
Werkingeigenschappen bij vaginaal door een arts of zelf afnemen	78
Analytische sensitiviteit.....	79
Gelijkwaardigheid van sampletypen	80
Gelijkwaardigheid van STM- en PreservCyt-samples.....	80
Gelijkwaardigheid van handmatige samplebereiding van PreservCyt-samples en samplebereiding van PreservCyt-samples met de QIASymphony DSP HPV Media kit	80
Equivalentie tussen de handmatige samplebereiding van PreservCyt-samples en samplebereiding van PreservCyt-samples met de QIASymphony DSP AXpH DNA kit	81
Gelijkwaardigheid tussen STM en handmatige samplebereiding van SurePath postgradiënt-celpelletsamples	81
Gelijkwaardigheid tussen handmatige samplebereiding van Sure Path postgradiënt-celpelletsamples en samplebereiding van SurePath-samples met behulp van de QIASymphony DSP HPV Media Kit.....	82
Gelijkwaardigheid tussen handmatige samplebereiding van Sure Path postgradiënt-celpelletsamples en samplebereiding van SurePath postgradiënt-celpelletsamples met behulp van de QIASymphony DSP HPV Media Kit.....	83
Overeenkomst tussen testmethoden.....	84
Reproduceerbaarheid	88
Totale reproduceerbaarheid bij handmatig testen	88
Reproduceerbaarheid met klinische STM-samples.....	88
Reproduceerbaarheid van het testen van klinische PreservCyt-samples.....	92
Reproduceerbaarheid van het testen van klinische SurePath-samples	103
Kruisreactiviteit	108
Kruishybridisatie	110
Effect van bloed en andere stoffen op STM-samples.....	111
Effect van bloed en andere stoffen op PreservCyt-samples	111
Handmatige samplebereiding.....	111
Samplebereiding met de QIASymphony DSP HPV Media kit.....	112
Samplebereiding met de QIASymphony DSP AXpH DNA kit	112
Effect of blood and other substances on SurePath specimens	113

Samplebereiding van SurePath-samples met de QIA Symphony DSP HPV Media Kit	113
Samplebereiding van SurePath postgradiënt-cel pelletsamples met de QIA Symphony DSP HPV Media Kit.....	114
Carry-over	115
Stabiliteit van het reagens in het instrument	116
Referenties.....	119
Symbolen	124
Oplossen van problemen.....	125
Controle op contaminatie van DR2.....	133
Controle op contaminatie van Wash Apparaat en/of waterbron	134
Controle op contaminatie van de Automated Plate Washer	134
Contactgegevens.....	136

Beoogd gebruik

Voor in-vitrodiagnostiek (IVD).

De *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test waarbij de Hybrid Capture® 2 (HC2)-technologie wordt toegepast, is een nucleïnezuur-hybridisatie-assay met signaalversterking met behulp van microtiterplaat-chemiluminescentie voor de kwalitatieve detectie van DNA van 13 hoogrisico HPV-typen in cervicale en vaginale samples.

Cervicale en vaginale samples die met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test mogen worden getest, zijn:

- Cervixsamples die zijn afgenomen door een arts met het *digene* HC2 DNA sampleafnamehulpmiddel
- Zelfgenomen vaginale samples die zijn afgenomen met het *digene* HC2 DNA sampleafnamehulpmiddel
- Biopten die zijn opgenomen in *digene* Specimen Transport Medium (STM, sampletransportmedium)
- Samples die zijn afgenomen met behulp van een cervixborstel of met een endocervicale borstel-/spatelcombinatie en vervolgens in PreservCyt-oplossing of in SurePath-conserveervloeistof zijn opgenomen

Het gebruik van deze test is geïndiceerd:

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

behandelmethode van de patiënt, doordat de uitslag kan dienen als hulpmiddel bij de risicobeoordeling van deze vrouwen op de afwezigheid van hooggradige cervixafwijkingen.

Samenvatting en uitleg

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

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

Van oudsher werden HPV-typen 16 en 18 beschouwd als HPV-typen die een hoog risico van kanker met zich meebrachten (8-10). Van HPV-typen 31, 33 en 35 is aangetoond dat zij een middelsterk verband hebben met kanker (2,11-14). Dit middelsterke verband is toe te schrijven aan het feit dat deze typen vaker worden gedetecteerd bij HSIL dan bij kanker. Het ontstaan van kanker als gevolg van de aanwezigheid van deze typen is derhalve minder waarschijnlijk dan bij aanwezigheid van hoogrisico HPV-DNA-typen (15). Deze vijf HPV-typen zijn samen verantwoordelijk voor ongeveer 73% van de HPV-infecties (16, 17). Andere HPV-DNA-typen, waaronder typen 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 en 68, zijn geïdentificeerd als de voornaamste HPV-typen die detecteerbaar zijn in de overige laesies (17-27). Deze HPV-typen kunnen ook worden onderverdeeld in midden- en hoogrisico groepen, op basis van hun relatieve indeling in de diverse histopathologische diagnosecategorieën (16, 17, 24-28).

HPV-DNA blijkt bij ongeveer 10% van de vrouwen met normaal cervicaal epitheel aanwezig te zijn, maar de werkelijke prevalentie in specifieke groepen vrouwen wordt sterk beïnvloed door leeftijd en andere demografische variabelen (2, 10, 16, 29). Uit prospectieve onderzoeken is gebleken dat 15-28% van de HPV-DNA-positieve vrouwen binnen 2 jaar squameuze intra-epitheliale neoplasie (SIL) ontwikkelde, in vergelijking met slechts 1-3% van de HPV-DNA-negatieve vrouwen (30, 31). Met name het risico van progressie bij HPV-typen 16 en 18 was groter (ongeveer 40%) dan bij andere HPV-typen (30).

Informatie met betrekking tot het pathogeen

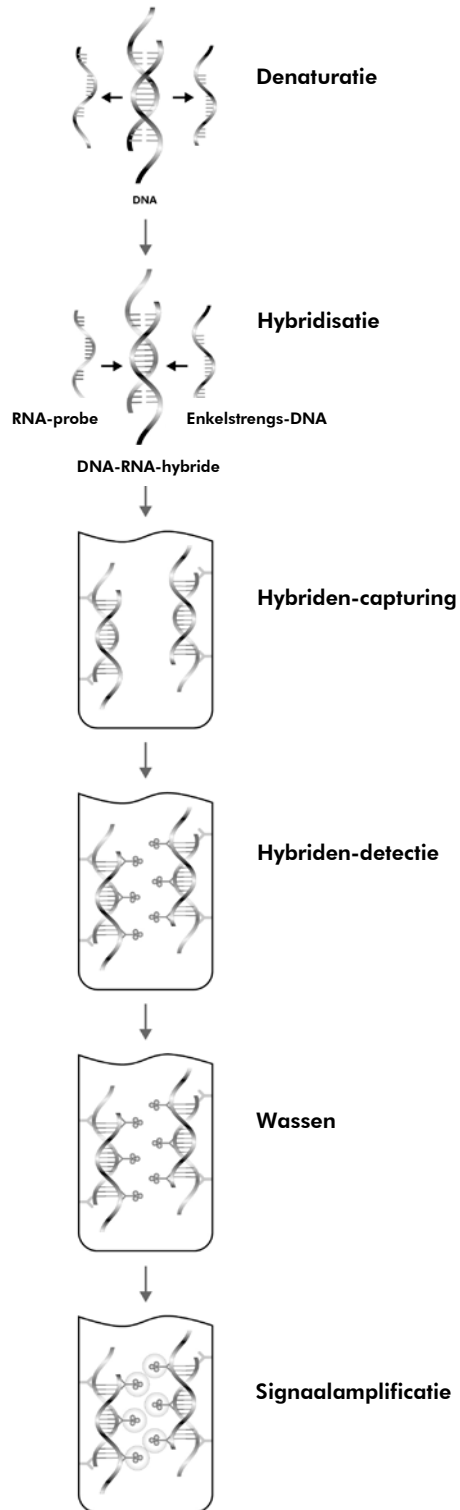
Humane papillomavirussen bestaan uit een icosahedraal viruspartikel (virion), dat bestaat uit een circulair dubbelstrengs DNA-molecuul van 8000 baseparen omgeven door een capsid. Na infectie van epitheelcellen nestelt het virale DNA zich door de gehele dikte van het epitheel, maar intacte virions worden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

Principe van de procedure

De *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test met gebruikmaking van HC2-technologie is een nucleïnezuur-hybridisatieassay met signaalversterking waarbij detectie plaatsvindt met behulp van microtiterplaat-chemiluminescentie. Samples die het target-DNA bevatten, hybridiseren met een specifieke HPV-RNA-probe. De gevormde RNA-DNA-hybriden worden gevangen op het oppervlak van een microtiterplaatwell die is gecoat met antilichamen specifiek tegen RNA:DNA-hybriden. De geïmmobiliseerde hybriden worden vervolgens blootgesteld aan specifieke, met alkalische fosfatase geconjugeerde antilichamen tegen de RNA-DNA-hybriden en gedetecteerd met een chemiluminescent substraat. Elk antilichaam is geconjugeerd met meerdere moleculen alkalische fosfatase. Meerdere geconjugeerde antilichamen binden aan elke gevangen hybride, met als gevolg een substantiële signaalversterking. Wanneer het substraat door de gebonden alkalische fosfatase wordt gesplitst, wordt licht uitgezonden, dat met behulp van een *digene* Microplate Luminometer (DML) wordt gemeten als relatieve lichteenheden (RLE's). De intensiteit van het uitgezonden licht geeft de aanwezigheid of afwezigheid van target-DNA in het sample aan.

Een RLE-meting gelijk aan of groter dan de grenswaarde van de assay wijst op aanwezigheid van hoogrisico HPV-DNA-sequenties in het sample. Een RLE-meting kleiner dan de grenswaarde van de assay wijst op afwezigheid van de specifieke hoogrisico HPV-DNA-sequenties die zijn getest of op HPV-DNA-concentraties die lager zijn dan de detectiegrens van de test.

Hybrid Capture Workflow



Samplebereiding met behulp van de QIASymphony SP

Geautomatiseerde samplebereiding van PreservCyt-samples kan worden gedaan met de QIASymphony SP met de QIASymphony DSP HPV Media kit of de QIASymphony DSP AXpH DNA kit.

Samplebereiding met de QIASymphony DSP HPV Media kit

De QIASymphony DSP HPV Media kit biedt sampleextracten op de hybridisatie-microtiterplaat die direct kunnen worden gebruikt voor geautomatiseerde tests met het Rapid Capture® System (RCS) met de digene HC2 High-Risk HPV DNA test. De QIASymphony SP voert alle stappen van de samplebereidingsprocedure uit voor maximaal 88 samples, in batches van maximaal 24 samples, in een enkele run.

De QIASymphony SP verwerkt 88 PreservCyt-samples in 2 uur en 15 minuten zonder interventie van de gebruiker, nadat de samples in het instrument zijn geplaatst.

De QIASymphony SP verwerkt 88 SurePath-samples in 1 uur en 45 minuten zonder interventie van de gebruiker, nadat de samples in het instrument zijn geplaatst. De samplebereiding met behulp van de QIASymphony SP wordt direct gevolgd door een 90 minuten durende incubatie van de sampleextracten in de hybridisatie-microtiterplaat op een Microplate Heater. Tijdens de incubatie van het sample-extract, worden de kalibrators en kwaliteitscontroles afzonderlijk gedenatureerd in een waterbad en vervolgens handmatig gepipetteerd in de eerste kolom van de hybridisatie-microtiterplaat zodra de incubatie van het sample-extract voltooid is. De samplebereiding van SurePath-samples met QIASymphony SP en de QIASymphony DSP HPV Media Kit kan plaatsvinden ofwel voor aanvang van de cytologieverwerking ofwel nadat de cytologieverwerking is voltooid.

Belangrijk: De sampleextracten die het resultaat zijn van de samplebereiding van PreservCyt- en SurePath-samples met behulp van de QIASymphony DSP HPV Media kit mogen alleen met het RCS worden getest. De handmatige uitvoering van de test met sampleextracten is niet gevalideerd.

Raadpleeg, wanneer u geautomatiseerde samplebereiding met de QIASymphony uitvoert, naast deze gebruiksaanwijzing ook de toepasselijke gebruikershandleidingen van de QIASymphony en de Gebruiksaanwijzing voor QIASymphony DSP HPV Media kit (Handleiding) (*QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)*), voor de noodzakelijke informatie over de procedures en voor de beschrijvingen.

Samplebereiding met de QIASymphony DSP AXpH DNA kit

De QIASymphony DSP AXpH DNA kit levert DNA-eluat in de hybridisatie-microtiterplaat die klaar zijn voor het handmatig of RCS-geautomatiseerd testen met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test. De QIASymphony SP voert alle stappen van de samplebereidingsprocedure uit voor maximaal 88 samples, in batches van maximaal 24 samples, in een enkele run. De QIASymphony SP verwerkt 88 samples in 4 uur en 30 minuten zonder interventie van de gebruiker, nadat de samples in het instrument zijn geplaatst.

Raadpleeg, wanneer u geautomatiseerde samplebereiding met de QIASymphony uitvoert, naast deze gebruiksaanwijzing ook de toepasselijke gebruikershandleidingen van de QIASymphony en de Handleiding QIASymphony DSP AXpH DNA kit (*QIASymphony DSP AXpH DNA Kit Handbook*), voor de noodzakelijke informatie over de procedures en voor de beschrijvingen.

Testen met behulp van het Rapid Capture System

Tests met een hoog sampledoorvoervolume met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test kunnen worden uitgevoerd met behulp van het RCS. De kit met 4 platen (cat.nr. 618111) kan alleen worden gebruikt met het RCS en kan niet worden gebruikt voor handmatig testen.

Het RCS is een geautomatiseerd systeem voor pipetteren en verdunnen voor algemeen gebruik, dat kan worden gebruikt met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test voor het testen met een hoog sampledoorvoervolume. Met dit systeem kunnen maximaal 352 samples in 8 uur worden verwerkt, inclusief een periode van 3,5 uur waarin geen interventie van de gebruiker vereist is; zo kunnen maximaal 704 uitslagen van samples in 13 uur worden gegenereerd.

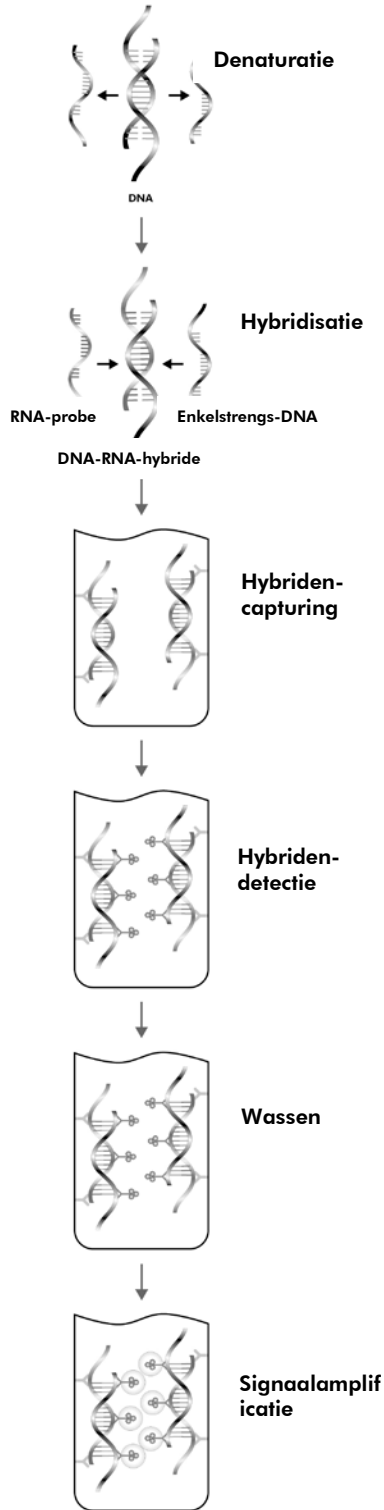
De samplebereiding wordt onafhankelijk van het RCS uitgevoerd, voordat de samples op het RCS-platform worden geladen. Bovendien worden het chemiluminescentiesignaal gedetecteerd en de resultaten gerapporteerd met behulp van een offline DML-instrument, dat zowel voor handmatige als voor RCS-geautomatiseerde tests wordt gebruikt.

Alle stappen van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test worden in exact dezelfde volgorde uitgevoerd als bij de handmatige test. Met het RCS kunnen maximaal 4 microtiterplaten beurtelings worden verwerkt, waarbij elke microtiterplaat de samples en de vereiste kalibrators en kwaliteitscontroles voor de test bevat.

Raadpleeg bij het uitvoeren van RCS-geautomatiseerde tests, naast deze gebruiksaanwijzing, de Gebruikershandleiding voor het Rapid Capture System (*Rapid Capture System User Manual*) en de Gebruikershandleiding voor het Rapid Capture System – Uitvoeren van *digene* HC2 DNA

tests met behulp van door QIA Symphony SP verwerkte samples (*Rapid Capture System User Manual – Performing digene HC2 DNA Tests Using QIA Symphony SP Processed Samples*), voor de noodzakelijke informatie over de procedures en voor de beschrijvingen.

Hybrid Capture Workflow



Handmatige monsterbereiding

Geautomatiseerd op het Rapid Capture System

Meegeleverde materialen

1-plaats kit

Er zitten 96 tests in de 1-plaats *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test (cat. nr. 5197-1330).

Bij handmatig testen met de kit met 1 plaat wordt aanbevolen om als kleinste aantal bij elk gebruik 24 tests aan te houden. Indien het gewenst is om minder dan 24 tests per keer uit te voeren, kan het totale aantal tests per kit kleiner zijn als gevolg van beperkte volumes reagens. Het aantal patiëntresultaten varieert, afhankelijk van het aantal keer dat de kit wordt gebruikt, zoals hieronder is weergegeven:

Aantal keer dat de kit wordt gebruikt	Aantal patiëntresultaten
1	88
2	80
3	72
4	64

Bij RCS-geautomatiseerd testen met de kit met 1 plaat moet per RCS-run een volle microtiterplaat (88 samples) worden getest om de inhoud van de kit volledig te gebruiken. Het testen van delen van microtiterplaten is aanvaardbaar, maar vanwege het dode volume dat nodig is voor de werking van het instrument wordt wel de hele kit gebruikt.

4-plaats kit

Er zitten 384 tests in de 4-plaats *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test (cat. nr. 618111).

De 4-plaats kit kan alleen worden gebruikt voor RCS-geautomatiseerd testen. Om 384 tests te verkrijgen moet de 4-plaats kit in 1 of 2 RCS-runs worden gebruikt. Indien er meer dan 2 runs gewenst zijn, kan het totale aantal tests per kit kleiner zijn als gevolg van beperkte volumes reagens.

Inhoud van de kit

digene HC2 High-Risk HPV DNA Test		
Catalogusn.	5197-1330	618111
Aantal tests	96	384
Indicator Dye (indicatorkleurstof) Bevat 0,05% (w/v) natriumazide	0.35 ml	2.0 ml
Denaturation Reagent (Denaturatiereagens)* Verdunde oplossing van natriumhydroxide (NaOH)	50 ml	2 x 100 ml
Probe Diluent (Probe-verdunningsmiddel)* Gebufferde oplossing met 0,05% (w/v) natriumazide	5 ml	20 ml
High-Risk HPV Probe (hoogrisico HPV-probe) RNA-probes voor HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 en 68 in een gebufferde oplossing (rode dop)	200 µl	3 x 200 µl
Low-Risk HPV Quality Control (Kwaliteitscontrole voor laagrisico-HPV) 5 pg/ml (500.000 kopieën/ml) gekloond HPV 6-DNA en drager-DNA in STM met 0,05% (w/v) natriumazide	1 ml	1 ml
High-Risk HPV Quality Control (Kwaliteitscontrole voor hoogrisico HPV) 5 pg/ml (500.000 kopieën/ml) gekloond HPV 16-DNA en drager-DNA in STM met 0,05% (w/v) natriumazide	1 ml	1 ml
Negative Calibrator (Negatieve kalibrator) Drager-DNA in STM met 0,05% (w/v) natriumazide	2 ml	2 ml
High-Risk HPV Calibrator (High-Risk HPV-kalibrator) 1 pg/ml gekloond HPV 16-DNA en drager-DNA in STM met 0,05% (w/v) natriumazide	1 ml	2 ml
Capture Microplate (Capturing-microtiterplaat) Gecoat met polyklonale geiten-antilichamen tegen RNA-DNA-hybriden	1	4
Detection Reagent 1 (Detectiereagens 1) Antilichamen tegen RNA-DNA-hybriden, geconjugeerd met alkalische fosfatase, in een gebufferde oplossing met 0,05% (w/v) natriumazide	12 ml	40 ml

<i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA Test		
Catalogusn.	5197-1330	618111
Aantal tests	96	384
Detection Reagent 2 (Detectiereagens 2)	12 ml	40 ml
CDP-Star [®] met Emerald II (substraat voor chemiluminescentie)		
Wash Buffer Concentrate (Wasbufferconcentraat)* Bevat 1,5% (w/v) natriumazide	100 ml	2 x 100 ml

* Zie "Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen," blz. 24, voor gezondheids- en veiligheidsinformatie.

Benodigde maar niet meegeleverde materialen

Belangrijk: Zorg ervoor dat de in deze procedure gebruikte apparaten zijn gecontroleerd en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

Apparatuur en materialen voor in-vitrodiagnostiek

Bij QIAGEN zijn uitsluitend apparatuur en materialen verkrijgbaar die zijn gevalideerd met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-test.

- *digene* Hybrid Capture 2 System ("*digene* HC2 System"), bestaande uit een door QIAGEN goedgekeurde luminometer ("*DML*-instrument"), een door QIAGEN goedgekeurde personal computer en bijbehorende randapparatuur (monitor, toetsenbord, muis, printer en printerkabel), *digene* HC2 System Software ("*digene* assay analysis software") (HC2-systeemsoftware, *digene* assay-analysesoftware), *digene* HC2 System Assay Protocols for HPV (assayprotocollen HC2-systeem voor HPV), LumiCheck Plate Software (software voor de LumiCheck Plate) en de Gebruikershandleiding voor het *digene* HC2-systeem (*digene* HC2 System Software User Manual)
- Hybrid Capture System Rotary Shaker I
- Hybrid Capture System Microplate Heater I
- Hybrid Capture System Automated Plate Washer
- Hybrid Capture System Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 (optioneel) *
- Conversierek met deksel (optioneel) *
- *digene* samplerek met deksel (optioneel) *
- EXPAND-4-pipet met standaard (optional) †
- Dispenser en snijtoestel voor buisafdichtmiddel (tube sealer film) (optioneel, gebruikt met de MST Vortexer 2)
- Rapid Capture System (vereist voor gebruik met de kit met 4 platen; optioneel voor de kit met 1 plaat)
- Wasapparaat
- Microtiterplaten voor hybridisatie
- Microplate lids (Deksels voor microtiterplaten)
- RCS-wellstrips voor microtiterplaten *

* Benodigd voor RCS-geautomatiseerd testen

† Speciaal instrument dat wordt gebruikt voor het overbrengen van STM-samples naar de hybridisatie-microtiterplaat. Andere speciale, multikanaalspipetten met instelbare tipafstand kunnen worden gebruikt, zolang een maximale tipafstand van 3,2 cm kan worden ingesteld.

- RCS-reagenstroggen*
- Dekfels voor RCS-reagenstroggen*
- RCS-disposable tips*
- RCS 'drop-on'-doppen*
- Buffer N2†
- Buffer D2†
- Blauwe RCS Washer Boat‡
- Extra lange pipettips
- Sampleafnamebuisjes
- Rek voor sampleafnamebuisjes
- Schroefdoppen voor sampleafnamebuisjes
- Wegwerp-reagensvaatjes
- DuraSeal™ tube sealer film (DuraSeal™-film voor het afsluiten van buisjes)
- Microbuisjes voor hybridisatie§
- Rek voor microbuisjes§
- Plate sealers§ (Afsluitstrips voor microtiterplaten)

Algemene laboratoriumapparatuur en -materialen

- Waterbad $65 \pm 2^\circ\text{C}$ dat voldoende groot is voor een samplerek (21 cm breed x 32 cm diep x 18 cm hoog)
- Microcentrifuge
- Vortexer met cupbevestiging
- Eenkanaalspipet; variabele instelling voor volumes van 20-200 μl en 200-1000 μl
- Positieve-displacement-repeteerpipet, zoals de Eppendorf® Repeater®-pipet
- 8-kanaalspipet; variabele instelling voor volumes van 25-200 μl
- Timer
- Natriumhypochlorietoplossing, 0,5% v/v
- Parafilm® of gelijkwaardig
- Wegwerp-pipettips met aerosolfilter voor eenkanaalspipet (20-200 μl en 200-1000 μl)

* Benodigd voor RCS-geautomatiseerd testen


† Vereist voor prestatietesten met samples die zijn bereid met de QIAsymphony DSP AXpH DNA kit.


‡ Vereist voor RCS-geautomatiseerd testen van samples die zijn verwerkt met de QIAsymphony DSP HPV Media kit.


§ Vereist voor de uitvoering van hybridisatie met microbuisjes en waterbad.

-
- Wegwerptips voor positive-displacement-repeteerpipet (12,5, 5, 2,5, en 1,25 ml)
 - Wegwerptips voor 8-kanaalspipet (25-200 µl)
 - Kimtowels®-doekjes of gelijkwaardige pluisarme papieren doekjes
 - Wegwerp-werkbankbekleding
 - Poedervrije wegwerphandschoenen
 - Polypropyleenbuisjes van 5 ml en/of 15 ml met ronde bodem en klikdop
 - Buisjesrek voor 10 ml of 15 ml buisjes
 - Conische polypropyleenbuisjes van 50 ml


Extra apparatuur en materialen voor de bereiding van PreservCyt-samples

 Raadpleeg de Gebruiksaanwijzing voor de QIASymphony DSP HPV Media kit (Handleiding) (*QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)*) voor de geautomatiseerde samplebereiding met behulp van de QIASymphony DSP HPV Media kit.

 Raadpleeg de Gebruiksaanwijzing voor de QIASymphony DSP AXpH DNA kit (*QIASymphony DSP AXpH DNA Kit Handbook*) voor de geautomatiseerde samplebereiding met behulp van de QIASymphony DSP AXpH DNA kit.

 Raadpleeg de gebruiksaanwijzing van de *digene* HC2 Sample Conversion kit voor de handmatige samplebereiding

Extra apparatuur en materialen voor de bereiding van SurePath-samples

 Raadpleeg de Gebruiksaanwijzing voor de QIASymphony DSP HPV Media kit (Handleiding) (*QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)*) voor de geautomatiseerde samplebereiding met behulp van de QIASymphony DSP HPV Media kit.

Voor de handmatige bereiding van SurePath-samples zijn de volgende apparatuur en materialen vereist:

- Centrifuge met uitzwaairotor die een snelheid van $800 \pm 15 \times g$ kan bereiken en waarin conische polypropyleen centrifugebuisjes van 15 ml passen
- *digene* HC2 Sample Conversion Tubes (*digene* HC2 sampleconversiebuisjes) of polypropyleen 15 ml-buisjes van VWR® of Corning®
Belangrijk: De *digene* HC2 sampleconversiebuisjes die door QIAGEN worden geleverd, moeten worden gebruikt met de MST Vortexer 2 of het RCS
- Transferpipetten van 7 ml met standaard tips of gelijkwaardig
- *digene* Specimen Transport Medium

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Voor in-vitrodiagnostiek.

Lees alle instructies zorgvuldig door voordat u de test gebruikt.

Waarschuwingen

Draag wanneer u met chemicaliën werkt altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen. Deze zijn online beschikbaar in handig en compact pdf-formaat via www.qiagen.com/safety. Hier vindt u de veiligheidsinformatiebladen van alle kits en kitcomponenten van QIAGEN, die u kunt bekijken en afdrukken.

Samples

LET OP



Risico van besmettelijke middelen

Samples kunnen infectieuze agentia bevatten en moeten dienovereenkomstig worden behandeld. Beschouw alle samples als potentieel infectieus.

Er is geen testmethode bekend die volledige zekerheid kan bieden dat samples geen infectie kunnen overbrengen. Het wordt raadzaam om humane samples in overeenstemming met de toepasselijke landelijke en plaatselijke praktijken met betrekking tot biologische veiligheid te behandelen. Deze praktijken voor biologische veiligheid moeten worden toegepast bij materialen die vermoedelijk of zeker infectieuze agentia bevatten.

Deze voorzorgen omvatten, maar beperken zich niet tot de volgende maatregelen:

- Niet met de mond pipetteren.
- Niet roken, eten of drinken in ruimtes waar met reagentia of samples wordt gewerkt.
- Draag poedervrije wegwerphandschoenen bij het werken met reagentia of samples. Was uw handen grondig na het uitvoeren van de test.
- Reinig en desinfecteer alle plaatsen waar sample is gemorst met een tuberculocide desinfectiemiddel zoals 0,5% v/v natriumhypochloriet of een ander geschikt desinfectiemiddel (32, 33).

- Ontsmet en vernietig alle samples, reagentia en andere potentieel verontreinigde materialen volgens nationale en plaatselijke voorschriften.

Na denaturatie en incubatie worden de samples niet langer als infectieus beschouwd (34); laboratoriumpersoneel dient echter toch nog de landelijk en plaatselijk geldende voorzorgen in acht te nemen.

Natriumazide

Sommige reagentia bevatten natriumazide. Van natriumazide is gemeld dat het lood- of koperazide kan vormen in afvoerleidingen van laboratoria. Deze aziden kunnen als gevolg van schokken, bijvoorbeeld gehamer, exploderen. Om de vorming van lood- of koperazide te voorkomen, moeten afvoerleidingen na het weggooien van oplossingen die natriumazide bevatten goed worden doorgespoeld met water. Het Amerikaanse Bureau voor veiligheid en gezondheid op het werk (OSHA) geeft de volgende aanbevelingen voor het verwijderen van contaminaties uit oude leidingen waarin men ophoping van aziden vermoedt:

1. De vloeistof uit de sifon overhevelen met behulp van een rubber of plastic slang
2. Vullen met 10% v/v natriumhydroxideoplossing.
3. Gedurende 16 uur laten staan.
1. 4. Goed met water schoonspoelen.

Buffer N2

LET OP



Risico van sterk reactieve verbindingen

Voeg nooit direct bleekwater of een zure oplossing toe aan een oplossing of afvalvloeistof die Buffer N2 bevat.

Buffer N2 bevat guanidinehydrochloride, dat wanneer het wordt samengevoegd met bleekwater sterk reactieve verbindingen kan vormen.

Als u een vloeistof hebt gemorst die deze buffers bevat, moet die worden opgenomen met een geschikt laboratoriumdetergens en water. Als de gemorste vloeistof potentieel besmettelijke middelen bevat, reinig de verontreinigde plaats dan eerst met laboratoriumdetergens en water, en daarna met 1% (v/v) natriumhypochloriet.

RCS-geautomatiseerd testen

Raadpleeg de Gebruikershandleiding voor het Rapid Capture System (*Rapid Capture System User Manual*) voor meer waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen specifiek voor het gebruik van dat systeem voor het testen met een hoog sampledoorvoervolume.

Veiligheids- en risicozinnen voor componenten

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

Wash Buffer Concentrate (Wasbufferconcentraat)



Bevat: Natrium azide. Waarschuwing! Schadelijk bij inslikken. Schadelijk voor in het water levende organismen, met langdurige gevolgen. Voorkom lozing in het milieu. Inhoud/ verpakking afvoeren naar een erkend afvalverwerkingsbedrijf.

Denaturation Reagent (Denaturatiereagens)



Bevat: natrium hydroxide. Gevaar! Veroorzaakt ernstige brandwonden en oogletsel. Kan bijtend zijn voor metalen. Inhoud/ verpakking afvoeren naar een erkend afvalverwerkingsbedrijf. BIJ CONTACT MET DE OGEN: voorzichtig afspoelen met water gedurende een aantal minuten; contactlenzen verwijderen, indien mogelijk; blijven spoelen. BIJ CONTACT MET DE HUID (of het haar): verontreinigde kleding onmiddellijk uittrekken - huid met water afspoelen/afdouchen. Onmiddellijk een ANTIGIFCENTRUM of een arts raadplegen. Achter slot bewaren. Beschermende handschoenen/ beschermende kleding/ oogbescherming/ gelaatsbescherming dragen.

Probe Diluent (Probe-verdunningsmiddel)



Bevat: acetic acid; Polyacrylic acid. Gevaar! Veroorzaakt ernstige brandwonden en oogletsel. Inhoud/ verpakking afvoeren naar een erkend afvalverwerkingsbedrijf. BIJ CONTACT MET DE OGEN: voorzichtig afspoelen met water gedurende een aantal minuten; contactlenzen verwijderen, indien

mogelijk; blijven spoelen. BIJ CONTACT MET DE HUID (of het haar): verontreinigde kleding onmiddellijk uittrekken - huid met water afspoelen/ afdouchen. Onmiddellijk een ANTIGIFCENTRUM of een arts raadplegen. Achter slot bewaren. Beschermende handschoenen/ beschermende kleding/ oogbescherming/ gelaatsbescherming dragen.

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

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

High-Risk HPV Quality Control (Kwaliteitscontrole voor hoog-risico HPV)

Advarsel! Forårsaker mild hudirritasjon. Ved hudirritasjon: Søk legehjelp.

Low-Risk HPV Quality Control (Kwaliteitscontrole voor laagrisico-HPV)


Advarsel! Forårsaker mild hudirritasjon. Ved hudirritasjon: Søk legehjelp.

Negative Calibrator (Negatieve kalibrator)

Advarsel! Forårsaker mild hudirritasjon. Ved hudirritasjon: Søk legehjelp..

Voorzorgsmaatregelen

De gebruiker moet bij het uitvoeren van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test altijd de volgende voorzorgsmaatregelen in acht nemen:

- Gebruik de reagentia niet na de houdbaarheidsdatum die naast het symbool  op de verpakking staat vermeld of na de houdbaarheidsdatum van de bereide reagentia.
- Wanneer u de test buiten de aangegeven tijd- en temperatuurbereiken uitvoert, kan dit ongeldige testresultaten opleveren. Tests die niet binnen de vastgestelde tijd- en temperatuurbereiken vallen, zijn ongeldig en moeten worden herhaald.

- Om betrouwbare testresultaten te krijgen, moeten de procedure, assaykalibratie, kwaliteitscontrole en interpretatie van de resultaten van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test nauwgezet worden gevolgd.
- Het is belangrijk om exact het aangegeven volume reagens te pipetteren en om na elke toevoeging van reagens goed te mengen. Doet u dit niet, dan kan dit leiden tot onjuiste testresultaten. Als de aangegeven kleurveranderingen hebben plaatsgevonden, betekent dit dat aan deze voorwaarden is voldaan.
- Met uitzondering van het wasbufferconcentraat zijn alle componenten van de kit als één geheel getest. Wissel geen componenten uit met componenten die afkomstig zijn uit andere bronnen of uit andere batches. Het is echter wel aanvaardbaar om componenten uit kits met hetzelfde batchnummer te combineren om zo de benodigde reagensvolumes te verkrijgen om meerdere microtiterplaten in één enkele RCS-run te testen.
- Nucleïnezuren zijn zeer gevoelig voor afbraak door in de omgeving aanwezige nucleases. Nucleases zijn aanwezig op de huid van mensen en op oppervlakken en materialen die door mensen zijn aangeraakt. Reinig en dek werkoppervlakken af met een wegwerp-werkbankbekleding, en draag bij het uitvoeren van alle stappen van de test poedervrije wegwerphandschoenen.
- Zorg dat de capturing-microtiterplaat en het Detection Reagent 2 (DR2, detectiereagens 2) tijdens het uitvoeren van de test niet gecontamineerd raken met exogene alkalische fosfatase. Stoffen die alkalische fosfatase kunnen bevatten zijn o.a. Detection Reagent 1 (DR1, detectiereagens 1), bacteriën, speeksel, haren en oliën uit de huid. Het is vooral belangrijk dat u de capturing-microtiterplaten na de wasstap en tijdens de incubatie met DR2 afdekt, omdat exogene alkalische fosfatase met DR2 kan reageren, waardoor fout-positieve resultaten worden verkregen.
- Bescherm DR2 tegen langdurige blootstelling aan direct licht. Gebruik DR2 onmiddellijk na het invullen van aliquots en vermijd direct zonlicht.
- Ontlucht de positive-displacement-repeterpipet eerst, voordat u reagens bij de samples pipetteert en controleer van tijd tot tijd op aanwezigheid van grote luchtbellen. Overmatige hoeveelheden grote luchtbellen in de tip van de repeterpipet kunnen afgifte van onnauwkeurige volumes veroorzaken. Dit kan worden vermeden door de pipet te vullen, alle vloeistof weg te pipetteren en de pipet opnieuw te vullen. Raadpleeg de gebruikershandleiding van de pipet voor specifieke gebruiksaanwijzingen.
- Gebruik voor de meerkanaalspipet omgekeerde pipetteertechniek (zie voor het pipetteren van DR1 en DR2 "Hybriden-detectie", blz. 57). Controleer of elke pipettip op de meerkanaalspipet goed bevestigd is en goed gevuld wordt.
- Zorg ervoor dat elke well van de capturing-microtiterplaat goed gewassen wordt (zie "Wassen", blz. 59). Als de wells niet goed worden gewassen, geeft dit een verhoogd achtergrondsignaal. Dit kan fout-positieve resultaten opleveren. Wanneer er wasbuffer in de

wells van de capturing-microtiterplaat achterblijft, kan dit leiden tot een verlaagd signaal of slechte reproduceerbaarheid.

Bewaren en hanteren van reagentia

Componenten van de kit

Bewaar de kit, na ontvangst, bij een temperatuur van 2-8°C. Het wasbufferconcentraat, het denaturatiereagens en de indicatorkleurstof mogen desgewenst bij een temperatuur van 2-30°C worden bewaard. Alle reagentia worden gebruiksklaar geleverd, met uitzondering van Denaturation Reagent (DNR, denaturatiereagens), de Probe Mix (probemix) en de Wash Buffer (wasbuffer).

Bereide reagentia

Na bereiding blijft DNR 3 maanden stabiel bij 2-8°C.

Na bereiding, blijft de wasbuffer gedurende 3 maanden stabiel bij een temperatuur van 2-30°C.

Bij het testen van PreservCyt-samples die zijn verwerkt met de QIASymphony DSP HPV Media kit of de QIASymphony DSP AXpH DNA kit, blijven de geopende, niet-gedenatureerde kalibrators en kwaliteitscontroles gedurende 3 maanden stabiel bij een temperatuur van 2-8°C.

Bij het testen van samples die zijn verwerkt met de QIASymphony DSP AXpH DNA kit, blijft het bereide Denaturation Reagent 2 (DNR2, denaturatiereagens 2) gedurende 8 uur stabiel bij een temperatuur van 15-30°C.

Afname en bereiding van samples

Cervicale en vaginale samples die met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test worden getest, moeten met behulp van een van de volgende sampleafnamehulpmiddelen worden afgenomen en vervoerd:

- *digene* HC2 DNA Collection Device (bestaande uit een cervixborstel en STM)
- Biopten die na afname worden opgenomen in *digene* STM
- Een cervixborstel of een borstel-/spatelcombinatie, geplaatst in PreservCyt-oplossing of in SurePath-conserveervloeistof

Samples die met andere sampleafnamehulpmiddelen zijn afgenomen of in andere transportmedia zijn vervoerd, zijn niet gevalideerd voor gebruik met deze test. De werkingseigenschappen van deze test zijn alleen met de aangegeven sampleafname kits vastgesteld.

De *digene* HC2 DNA Collection Device mag niet worden gebruikt bij zwangere vrouwen. Als een colposcopie-onderzoek wordt uitgevoerd, moeten cervicale samples worden afgenomen voordat azijnzuur of jodium wordt aangebracht. Raadpleeg de gebruiksaanwijzing van de *digene* HC2 DNA Collection Device voor aanvullende procedures voor sampleafname en -behandeling.

Cervicale en vaginale samples die na afname in STM zijn gebracht, hoeven niet verder te worden geconverteerd voordat ze met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test worden getest. Cervicale samples die na afname in PreservCyt- of SurePath-oplossing zijn gebracht, moeten wel worden geconverteerd voordat ze met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test worden getest.

Cervicale en vaginale samples in STM

Belangrijk: Neem geen cervicaal of vaginaal STM-sample af als er hoge concentraties antischimmelcrème, zaaddodende gel of vaginale spray aanwezig zijn.

STM-samples kunnen maximaal 2 weken bij kamertemperatuur worden bewaard en zonder koeling naar het onderzoekslaboratorium worden verzonden. De samples moeten worden verzonden in een geïsoleerde houder, waarbij gebruik moet worden gemaakt van een pakketdienst die binnen één of 2 dagen bezorgt.

In het onderzoekslaboratorium moeten samples bij een temperatuur van 2-8°C worden bewaard als de assay binnen 1 week wordt uitgevoerd. Als de assay pas na langer dan 1 week zal worden uitgevoerd, dek de doppen van de samplebuisjes dan af met Parafilm en bewaar de samples bij een temperatuur van -20°C gedurende maximaal 3 maanden. Vervang de doppen direct door schroefdoppen voor afnamebuisjes als de samples voor tests uit de vriezer worden gehaald.

Er is een conserveermiddel aan STM toegevoegd om bacteriële groei te remmen en de integriteit van het DNA te behouden. Het is niet bedoeld om de levensvatbaarheid van organismen of cellen in stand te houden.

Cervixbiopten

Vers afgenomen cervixbiopten met een diameter van 2-5 mm kunnen met de digene HC2 High-Risk HPV DNA test worden getest. Gebruik geen biopten waarvan de diameter kleiner is dan 2 mm. Plaats het biopt onmiddellijk in 1,0 ml STM, dek de dop van het buisje af met Parafilm om te voorkomen dat de doppen van de buisjes losschieten en bewaar de buisjes in de vriezer bij -20°C. Verzend de biopten bij 2-30°C voor levering 's nachts aan het onderzoekslaboratorium.

Bewaar de samples bij het onderzoekslaboratorium bij -20°C totdat ze worden verwerkt. Als u de samples uit de vriezer haalt om ze te testen, vervang dan de doppen onmiddellijk door schroefdoppen voor de sampleafnamebuisjes.

Cervicale samples in PreservCyt-oplossing

Belangrijk: Neem geen SurePath-cervixsample af voor samplebereiding met de QIASymphony DSP HPV Media kit als hoge concentraties antischimmelcrème, vaginale gel of bloed aanwezig zijn.

Belangrijk: Neem geen PreservCyt-cervixsample af voor samplebereiding met de QIASymphony DSP HPV Media kit als zaaddodende gel aanwezig is.

De eisen aan het samplevolume zijn gebaseerd op de samplebereidingsmethode en wel als volgt:

Voordat de PreservCyt-samples worden bereid voor de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-test kunnen ze na afname maximaal 3 maanden bij 2-30°C worden bewaard. PreservCyt-samples mogen niet worden ingevroren.

De volgende methoden kunnen worden toegepast voor samplebereiding:

- Geautomatiseerde samplebereiding met behulp van de QIASymphony SP en de QIASymphony DSP HPV Media Kit

Het resultaat is een sample-extract (met magnetische deeltjes, STM en DNR) dat klaar is om te worden bewerkt in de denaturatiestap van de test.

- Geautomatiseerde samplebereiding met behulp van de QIASymphony SP en de QIASymphony DSP AXpH DNA Kit

Het resultaat is een DNA-eluaat dat direct in de denaturatiestap van de test kan worden gebruikt.

Handmatige samplebereiding met de *digene* HC2 Sample Conversion kit. Het resultaat van de handmatige samplebereiding is een gedenatureerd sample dat direct in de hybridisatiestap van de test kan worden gebruikt.

De eisen aan het samplevolume zijn gebaseerd op de samplebereidingsmethode en wel als volgt:

- Voor de geautomatiseerde samplebereiding met de QIASymphony DSP HPV Media kit is 3 ml sample vereist.
- Voor de geautomatiseerde samplebereiding met de QIASymphony DSP AXpH DNA kit is 4 ml sample vereist.
- Voor de handmatige samplebereiding met de *digene* HC2 Sample Conversion kit is ten minste 4 ml sample vereist.

Samples waarvan na bereiding van de Pap-test minder dan het vereiste samplevolume over is, bevatten onvoldoende materiaal om te testen en kunnen in de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-test een fout-negatief resultaat geven.

Cervicale samples in SurePath-conserveervloeistof

Belangrijk: Neem geen SurePath cervixsample voor samplebereiding met de QIASymphony DSP HPV Media Kit als er zaaddodende gel, antischimmelcrème of ontstekingsremmende crème aanwezig zijn.

Neem samples in SurePath-conserveervloeistof af volgens de van toepassing zijnde gebruiksaanwijzing.

De samplebereiding van SurePath-samples kan plaatsvinden ofwel voor aanvang van de cytologieverwerking ofwel nadat de cytologieverwerking is voltooid.

Doet u het voor aanvang van de cytologieverwerking, gebruik dan een sample van de oorspronkelijke SurePath-sample, die nog niet met een andere diagnostische procedure is verwerkt, inclusief het BD PrepMate® System en de BD PrepStain® Slide Processor. Om verwarring te voorkomen wordt in deze gebruiksaanwijzing naar deze samples verwezen als "SurePath-samples".

Doet u het na afloop van de cytologieverwerking, gebruik dan een sample van de resterende postgradiënt-celpellet nadat een SurePath-sample is bereid volgens de juiste instructies voor het BD PrepMate® System en de BD PrepStain® Slide Processor. Om verwarring te voorkomen wordt in deze gebruiksaanwijzing naar deze samples verwezen als "SurePath postgradiënt-celpelletsamples".

De volgende methoden kunnen worden toegepast voor samplebereiding:

- Geautomatiseerde samplebereiding van SurePath-samples met behulp van de QIASymphony SP en de QIASymphony DSP HPV Media Kit.

Het resultaat is een gedenuceerd sample-extract (met magnetische deeltjes, STM en DNR) dat klaar is om te worden bewerkt in de denaturatiestap van de test.

- Geautomatiseerde samplebereiding van Sure Path postgradiënt-celpeletsamples met behulp van de QIASymphony SP en de QIASymphony DSP HPV Media Kit.

Het resultaat is een gedenuceerd sample-extract (met magnetische deeltjes, STM en DNR) dat klaar is om te worden bewerkt in de hybridisatiestap van de test.

- Handmatige samplebereiding van SurePath postgradiënt-celpeletsamples.

Handmatige samplebereiding levert als resultaat een gedenuceerde sample die klaar is om te worden bewerkt in de hybridisatiestap van de test.

De eisen voor samplevolumes zijn gebaseerd op de volgende samplebereidingsmethode:

- Voor de geautomatiseerde samplebereiding met behulp van de QIASymphony DSP HPV Media Kit is 950 µl nodig
- Voor de handmatige samplebereiding is 2,8 ml SurePath postgradiënt-celpeletsample nodig

Gebruik van minder dan het benodigde volume kan leiden tot een fout-negatief resultaat in de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-test.

Geautomatiseerde samplebereiding van SurePath-samples

Voordat de SurePath-samples met behulp van de QIASymphony SP en de QIASymphony DSP HPV Media Kit worden bereid, kunnen ze na afname maximaal 4 weken bij 5-25°C worden bewaard. De gebruikte SurePath-sample mag niet zijn verwerkt met een andere diagnostische procedure, inclusief de BD PrepMate en BD PrepStain Slide Processor. Voor de geautomatiseerde samplebereiding is 950 µl SurePath-sample nodig.

Geautomatiseerde samplebereiding van SurePath postgradiënt-celpeletsamples

Belangrijk: Pipetteer direct na bereiding van de SurePath Pap-test-objectglasjes 2,0 ml SurePath-conserveervloeistof in het centrifugebuisje met de postgradiënt-celpelet. Daardoor blijft de integriteit van de postgradiënt-celpelet behouden voor de uitvoering van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-test.

De postgradiënt-celpelet met SurePath-conserveervloeistof kan gedurende maximaal 4 weken worden bewaard bij 5-25°C, voordat de samples voor de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-test worden bereid. Voor de geautomatiseerde samplebereiding is 950 µl SurePath postgradiënt-celpelet nodig.

Handmatige samplebereiding van SurePath postgradiënt-celpletsamples

Belangrijk: Pipetteer direct na bereiding van de SurePath Pap-test-objectglasjes 2,0 ml SurePath-conserveervloeistof in het centrifugebuisje met de resterende celplet. Daardoor blijft de integriteit van de postgradiënt-celplet behouden voor de uitvoering van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-test.

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

Postgradiënt-celplets van SurePath-samples worden bereid zoals in deze gebruiksaanwijzing staat beschreven. Het resultaat van de handmatige samplebereiding is een gedenatureerd sample dat direct in de hybridisatiestap van de test kan worden gebruikt.

Procedure

Wat u moet doen voordat u begint

- Wacht ten minste 60 minuten totdat de Microplate Heater I vanuit een koude start een temperatuur van $65^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ heeft bereikt. Als u niet de tijd neemt voor deze opwarmperiode, kan dit ertoe leiden dat de hybridisatie-microtiterplaat smelt. Raadpleeg de Gebruikershandleiding voor de Microplate Heater I (*Microplate Heater I User Manual*) voor meer instructies.
- Als u tijdens de denaturatie- en hybridisatiestappen een waterbad gebruikt, moet u controleren of het waterbad een temperatuur van 65°C heeft en dat het waterniveau voldoende hoog is om het hele samplevolume in het buisje onder te dompelen.

Bereiding van reagentia

- Neem voordat u met de test begint de samples en alle benodigde reagentia uit de koelkast. Laat ze gedurende 15-30 minuten op $20-25^{\circ}\text{C}$ komen. Bereid de PreservCyt- en SurePath-samples voordat u eerder gedenatureerde samples en reagentia op kamertemperatuur brengt.
- Als u gebruiksklare reagentia samenvoegt voor een RCS-run met meerdere platen, meng dan eerst de afzonderlijke flessen goed en voeg vervolgens het passende volume reagens samen in een schone, conische wegwerpbuis van polypropyleen..
- Bij handmatig testen worden de wasbuffer en de probemix tijdens bepaalde stappen van de testprocedure bereid. Bij RCS-geautomatiseerd testen worden alle reagentia bereid en op het RCS-platform geplaatst voordat de RCS-run wordt gestart.
- Bereid DNR en DNR2, indien van toepassing, voordat u de andere reagentia bereidt.
- Gooi na afloop van de test alle bereide reagentia (tenzij anders beschreven) en aliquots reagens weg.
- Gebruik de onderstaande tabellen 1-5 om het benodigde volume van elk reagens te bepalen, op basis van het aantal tests/microtiterplaten en de gebruikte testmethode. Bij de volumes voor RCS-geautomatiseerd testen is het dode reagensvolume dat nodig is voor het instrument meegerekend.

Tabel 1. Benodigde volumes van bereide en gebruiksklare reagentia voor het handmatig testen van STM-samples en handmatig bereide PreservCyt en SurePath postgradiënt-celpletsamples

Aantal tests/strips	Probemix	Wasbuffer	DR1	DR2
24/3	1.04 ml	>1 liter	3 ml	3 ml
48/6	2.08 ml	>1 liter	5 ml	5 ml
72/9	3.12 ml	>1 liter	7 ml	7 ml
96/12	4.16 ml	>1 liter	12 ml	12 ml

Tabel 2. Benodigde volumes van bereide en gebruiksklare reagentia voor RCS-geautomatiseerd testen van STM-samples, handmatig bereide PreservCyt en SurePath postgradiënt-celpletsamples, en SurePath en SurePath postgradiënt-celpletsamples die bereid zijn met behulp van de QIA Symphony DSP HPV Media Kit

Aantal microtiterplaten	Probemix	Wasbuffer	DR1	DR2
≤1	5.20 ml	3 liters	10 ml	10 ml
≤1.5	6.24 ml	3 liters	14 ml	14 ml
≤2	8.32 ml	3 liters	18 ml	18 ml
≤2.5	9.36 ml	6 liters	22 ml	22 ml
≤3	10.40 ml	6 liters	26 ml	26 ml
≤3.5	12.48 ml	6 liters	30 ml	30 ml
≤4	13.52 ml	6 liters	34 ml	34 ml

Tabel 3. Benodigde volumes bereide en gebruiksklare reagentia voor RCS-geautomatiseerd testen van PreservCyt-samples die met de QIA Symphony DSP HPV Media kit zijn verwerkt

Aantal microtiterplaten	DNR	Probemix	Wasbuffer	DR1	DR2
≤1	2.2 ml	5.20 ml	3 liters	10 ml	10 ml
≤1.5	2.2 ml	6.24 ml	3 liters	14 ml	14 ml
≤2	2.4 ml	8.32 ml	3 liters	18 ml	18 ml
≤2.5	2.4 ml	9.36 ml	6 liters	22 ml	22 ml
≤3	2.6 ml	10.40 ml	6 liters	26 ml	26 ml
≤3.5	2.6 ml	12.48 ml	6 liters	30 ml	30 ml
≤4	2.8 ml	13.52 ml	6 liters	34 ml	34 ml

Tabel 4. Benodigde volumes bereide en gebruiksklare reagentia voor handmatig testen van PreservCyt-samples die met de QIASymphony DSP AXpH DNA kit zijn verwerkt

Aantal tests/strips	DNR	DNR2	Probemix	Wasbuffer	DR1	DR2
24/3	0.6 ml	1.0 ml	1.04 ml	>1 liter	3 ml	3 ml
48/6	0.6 ml	2.0 ml	2.08 ml	>1 liter	5 ml	5 ml
72/9	0.6 ml	2.5 ml	3.12 ml	>1 liter	7 ml	7 ml
96/12	0.6 ml	5.0 ml	4.16 ml	>1 liter	12 ml	12 ml

Tabel 5. Benodigde volumes bereide en gebruiksklare reagentia voor RCS-geautomatiseerd testen van PreservCyt-samples die met de QIASymphony DSP AXpH DNA kit zijn verwerkt

Aantal microtiterplaten	DNR	DNR2	Probemix	Wasbuffer	DR1	DR2
≤1	2.2 ml	5.0 ml	5.20 ml	3 liters	10 ml	10 ml
≤1.5	2.2 ml	5.5 ml	6.24 ml	3 liters	14 ml	14 ml
≤2	2.4 ml	6.5 ml	8.32 ml	3 liters	18 ml	18 ml
≤2.5	2.4 ml	7.7 ml	9.36 ml	6 liters	22 ml	22 ml
≤3	2.6 ml	8.8 ml	10.40 ml	6 liters	26 ml	26 ml
≤3.5	2.6 ml	10.0 ml	12.48 ml	6 liters	30 ml	30 ml
≤4	2.8 ml	11.0 ml	13.52 ml	6 liters	34 ml	34 ml

Denaturation Reagent (Denaturatiereagens)

De 1-plaats kit wordt geleverd met 50 ml denaturatiereagens en de 4-plaats kit met 2 x 100 ml denaturatiereagens. Zorg dat u het DNR bereidt volgens het volume dat met de toepasselijke kit wordt geleverd.

Opmerkingen:

- Na bereiding blijft de DNR 3 maanden stabiel bij 2-8°C.
- Voeg als de kleur vervaagt nog 3 druppels indicatorkleurstof toe en meng grondig vóór gebruik.

50 ml-fles

1. Voeg 5 druppels indicatorkleurstof toe aan de 50 ml-fles denaturatiereagens.
2. Meng grondig.

Het DNR moet een uniforme, donkerpaarse kleur hebben.

3. Noteer de nieuwe uiterste houdbaarheidsdatum op de fles DNR.

100 ml-fles

1. Voeg 10 druppels indicatorkleurstof toe aan de 100 ml-fles denaturatiereagens.
2. Meng grondig.

Het DNR moet een uniforme, donkerpaarse kleur hebben.

3. Noteer de nieuwe uiterste houdbaarheidsdatum op de fles DNR.

Denaturatiereagens 2

NB: DNR2 is alleen vereist voor het testen van PrservCyt-samples die met de QIASymphony DSP AXpH DNA kit zijn bereid.

1. Noteer "DNR2" op een schoon, conisch wegwerpbuisje van polypropyleen.
2. Voeg het benodigde volume Buffer N2 (zie tabel 6 hieronder) toe aan het gelabelde buisje.

Tabel 6. Bereiding van DNR2

Benodigd volume DNR2	Volume Buffer N2	Volume Buffer D2	Indicatorkleurstof
1.0 ml	0.4 ml	0.6 ml	1-2 druppels
2.0 ml	0.8 ml	1.2 ml	1-2 druppels
2.5 ml	1.0 ml	1.5 ml	1-2 druppels
5.0 ml	2.0 ml	3.0 ml	1-2 druppels
5.5 ml	2.2 ml	3.3 ml	1-2 druppels
6.5 ml	2.6 ml	3.9 ml	1-2 druppels
7.7 ml	3.1 ml	4.6 ml	1-2 druppels
8.8 ml	3.5 ml	5.3 ml	1-2 druppels
10.0 ml	4.0 ml	6.0 ml	1-2 druppels
11.0 ml	4.4 ml	6.6 ml	1-2 druppels

3. Voeg het benodigde volume Buffer D2 (zie tabel 6 hierboven) toe aan het gelabelde buisje.
4. Voeg het benodigde volume indicatorvloeistof (zie tabel 6 hierboven) toe aan het gelabelde buisje.

NB: Gebruik de indicatorkleurstof uit de digene HC2 High-Risk HPV DNA Test kit.

5. Meng het minimaal 10 seconden in de vortexmixer.

NB: Na bereiding blijft DNR2 gedurende 8 uur stabiel bij 15-30°C.

Probemix

- Bereid bij handmatig testen de probemix tijdens de denaturatie-incubatie van het sample (wat van toepassing is, zie "Denaturatie van kalibrators, kwaliteitscontroles en STM-samples", blz. 50 of "Denaturatie van kalibrators, kwaliteitscontroles en DNA-eluat en voor handmatig testen", blz. 47).
- Wees uiterst voorzichtig om contaminatie met RNase te voorkomen. Gebruik voor het pipetteren van de probe pipettips met een aerosolfilter.
- Het probe-verdunningsmiddel is viskeus. Controleer of een zichtbare werveling ontstaat bij de bereiding van de probemix; onvolledig mengen kan leiden tot een verlaagd signaal.
- Als u meerdere buisjes met probe samenvoegt voor RCS-geautomatiseerd testen, moet u het benodigde volume probe samen in één buisje combineren en de inhoud door pipetteren mengen.

1. Centrifugeer elk buisje met probe kort om alle vloeistof op de bodem van het buisje te brengen; zo voorkomt u dat er probe in het deksel van het buisje blijft zitten.

2. Tik zachtjes tegen het buisje om te mengen.

3. Bepaal hoeveel probemix u nodig hebt:

Advies: Maak wat extra probemix ter compensatie van het volume dat verloren kan gaan in de pipettips of tegen de wand van de buisjes. Bij de volumes die in tabel 1-5 hierboven staan vermeld, is dit geadviseerde extra volume al meegerekend.

Handmatig testen: Bepaal de volumes die nodig zijn voor een verdunning van 1:25 in probe-verdunningsmiddel, om de probemix te bereiden (25 µl/test). De volumes worden aangegeven in Tabel 1, blz. **Error! Bookmark not defined.** en Tabel 4, blz. **Error! Bookmark not defined.**, waar van toepassing.

RCS-geautomatiseerd testen: Gebruik de volumes die worden aangegeven in Tabel 2, page 36, Tabel 3, blz. **Error! Bookmark not defined.**, of Tabel 5, blz. **Error! Bookmark not defined.**, waar van toepassing.

4. Noteer "High-Risk HPV-probemix" op een nieuw wegwerpbuisje.

Afhankelijk van het aantal tests adviseren wij om een 5 ml of 15 ml polypropyleenbuisje met ronde bodem en klikdop te gebruiken.

5. Voeg het benodigde volume probe-verdunningsmiddel (zie tabel 7 hieronder) toe aan het gelabelde buisje.
6. Pipetteer de benodigde hoeveelheid van de High-Risk HPV-probe in het probe-verdunningsmiddel (zie tabel 7 hieronder) door de pipettip tegen de binnenwand van het buisje te plaatsen, vlak boven de meniscus, en de inhoud eruit te pipetteren.

Belangrijk: Dompel de pipettip niet in het Probe-verdunningsmiddel onder.

Tabel 7. Bereiding van de probemix

Benodigd volume van de probemix	Volume probe-verdunningsmiddel	Volume High-Risk HPV-probe
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. Minimaal 5 seconden met maximale snelheid in de vortexmixer mengen om een grondig mengsel te krijgen.

Er moet een zichtbare werveling ontstaan.

Wasbuffer

- Bereid bij handmatig testen de wasbuffer tijdens de hybriden-capturingstap (zie "Hybriden-capturing", blz. 56).
- Voeg bij de bereiding water toe aan het wasbufferconcentraat, om blootstelling tot een minimum te beperken.
- Bereid voor de handmatige wasmethode voor microtiterplaten 3 liter wasbuffer in het Wash Apparaat (wasapparaat).

Advies: Reinig het wasapparaat en de slangen om de 3 maanden met 0,5% natriumhypochlorietoplossing en spoel grondig na met gedestilleerd of gedemineraliseerd water, om eventuele contaminatie met alkalische fosfatase uit bacteriën en schimmels te voorkomen.

- Bereid de wasbuffer voor de Automated Plate Washer en bewaar deze in een afgesloten bak, of bereid 1 liter en giet die in het wasreservoir van de Automated Plate Washer.

- Bereid voor RCS-geautomatiseerd testen het aangegeven volume (waar van toepassing, zie Tabel 2, blz. 36, Tabel 3, blz. **Error! Bookmark not defined.**, of Tabel 5, blz. **Error! Bookmark not defined.**) in the RCS-wasfles.
1. Meng het wasbufferconcentraat goed en voeg het benodigde volume wasbufferconcentraat (zie tabel 8 hieronder) toe aan de aangegeven bak.
 2. Voeg het benodigde volume gedestilleerd of gedemineraliseerd water (zie tabel 8 hieronder) toe aan de aangegeven bak.

Tabel 8. Bereiding van wasbuffer

Benodigd volume wasbuffer	Volume wasbufferconcentraat	Volume gedistilleerd of gedemineraliseerd water
1 liter	33.3 ml	966.7 ml
2 liters	66.6 ml	1933.4 ml
3 liters	100.0 ml	2900.0 ml
6 liters	200.0 ml	5800.0 ml

3. Leg een schoon, pluisarm papieren doekje over alle openingen van de bak en meng goed.
4. Sluit de bak af om contaminatie of verdamping te voorkomen, of plaats de bak op het betreffende instrument, wat van toepassing is.
5. Noteer de nieuwe uiterste houdbaarheidsdatum op het vat wasbuffer.

Opmerking: Na bereiding, blijft de wasbuffer gedurende 3 maanden stabiel bij een temperatuur van 2-30°C.

De plaatindeling maken

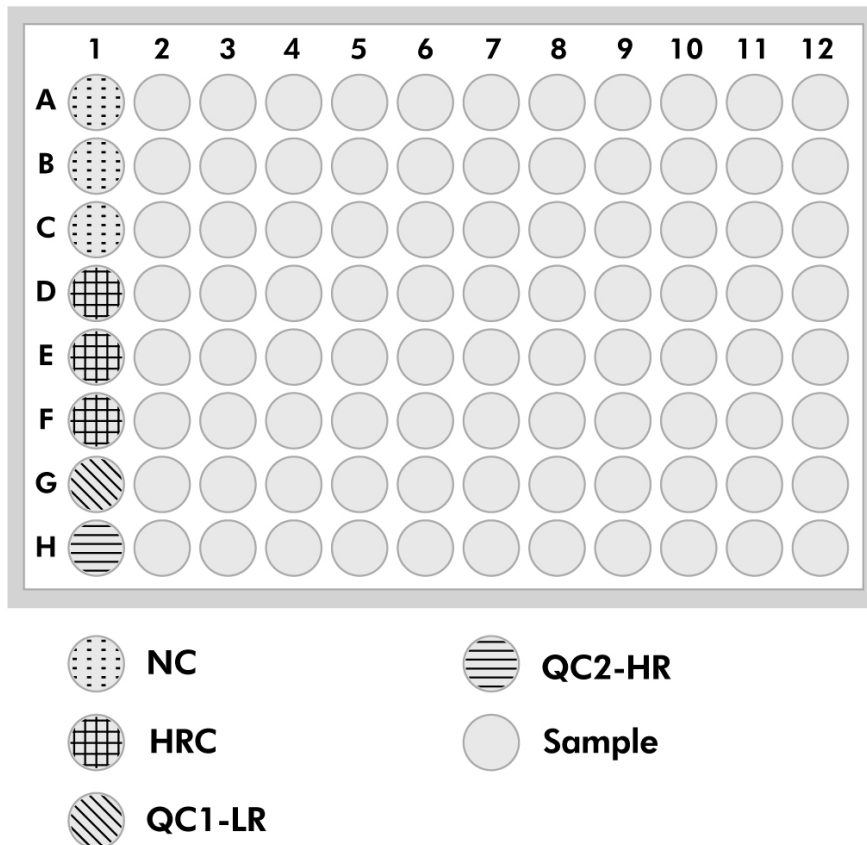
1. Maak de plaatindeling met behulp van de *digene* assay-analysesoftware en de *digene* assayprotocollen voor HPV.

Raadpleeg voor instructies over het maken van een plaatindeling, met de juiste posities voor de kalibrators, kwaliteitscontroles en samples, de desbetreffende gebruiksaanwijzing bij de software.

Opmerkingen:

- De kalibrators, kwaliteitscontroles en samples worden getest in een configuratie van 8 wells per kolom.
- De kalibrators en kwaliteitscontroles moeten op de volgende posities van de microtiterplaat worden getest (zie Afbeelding 1, blz. 42):

- Negatieve kalibrator (NC): replica's in wells A1, B1, C1
- Hoogrisico HPV-kalibrator (HRC): replica's in wells D1, E1, F1
- Laagrisico HPV-kwaliteitscontrole (QC1-LR): in well G1
 - Hoogrisico HPV-kwaliteitscontrole (QC2-HR): in well H1
 - High-Risk HPV Quality Control (QC2-HR) in microplate well H1



Afbeelding 1: Posities van kalibrators, kwaliteitscontroles en samples op de microtiterplaat.

Belangrijk: Gebruik bij RCS-geautomatiseerd testen RCS-specifieke assayprotocollen om de plaatindeling te maken en resultaten te genereren. De gedefinieerde parameters van de RCS-specifieke assayprotocollen zijn anders dan die van de assayprotocollen voor handmatig testen (zie "Berekening van de grenswaarde", blz. 66).

- Plaats de te testen kalibrators, kwaliteitscontroles en samples in de volgorde waarin ze worden getest in een rek voor sampleafnamebuisjes of een samplerek.

Belangrijk: Bij RCS-geautomatiseerd testen is het essentieel dat de plaatindeling overeenkomt met de juiste samples die worden getest, om te voorkomen dat er onjuiste resultaten voor de samples worden gerapporteerd. Controleer voor elk gebruikt samplerek met deksel dat de

serienummers overeenkomen en nummer, indien van toepassing, elk samplerek en deksel in de volgorde waarin ze in het RCS worden getest. Gebruik een markerpen en etiket die blijven zitten en leesbaar blijven in het waterbad van 65°C.


Samplebereiding

PreservCyt- of SurePath-samples moeten verder worden bereid voordat ze met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test worden getest. Afhankelijk van het uitgevoerde type samplebereiding zijn de bereide samples klaar voor verdere bewerking in de verschillende stappen van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test.

De beschikbare samplebereidingsmethoden zijn als volgt:

- Geautomatiseerde samplebereiding van PreservCyt-samples met de QIASymphony DSP HPV Media kit
- Geautomatiseerde samplebereiding van SurePath-samples en postgradiënt-celpellets met behulp van de QIASymphony DSP HPV Media Kit
- Geautomatiseerde samplebereiding van PreservCyt-samples met de QIASymphony DSP AXpH DNA kit
- Handmatige samplebereiding van PreservCyt-samples
- Handmatige samplebereiding van SurePath postgradiënt-celpellets


Geautomatiseerde samplebereiding van PreservCyt-samples met de QIASymphony DSP HPV Media kit

 Refer to *QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)* for instructions to prepare PreservCyt samples using the QIASymphony DSP HPV Media Kit.


Important: The sample extracts produced as a result of sample preparation of PreservCyt
Belangrijk: De sampleextracten die het resultaat zijn van de samplebereiding van PreservCyt-samples met behulp van de QIASymphony DSP HPV Media kit mogen alleen met het RCS worden getest. De handmatige uitvoering van de test met sampleextracten is niet gevalideerd.

Het resultaat van de samplebereiding van PreservCyt-samples met de QIASymphony DSP HPV Media kit is sampleextracten in een hybridisatie-microtiterplaat, waarbij de eerste kolom leeg is. De sampleextracten bevatten magnetische deeltjes, STM en DNR en kunnen direct voor RCS-geautomatiseerd testen in de denaturatiestap worden gebruikt. De kalibrators, kwaliteitscontroles

en sampleextracten worden tegelijkertijd gedenatureerd in de hybridisatie-microtiterplaat tijdens RCS-geautomatiseerd testen (zie “Denaturatie en hybridisatie van samples die met de QIASymphony SP zijn verwerkt,” blz. 47)


 Raadpleeg bij het RCS-geautomatiseerd testen van samples die met de QIASymphony SP zijn verwerkt, de Gebruikershandleiding voor het Rapid Capture System – Uitvoeren van *digene* HC2 DNA tests met behulp van met QIASymphony SP verwerkte samples (*Rapid Capture System User Manual and Rapid Capture System User Manual – Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*) voor instructies over het uitvoeren van de test.

Samplebereiding van SurePath-samples en SurePath postgradiënt-celpellets met behulp van de QIASymphony DSP HPV Media Kit

 Raadpleeg de *QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)* (Gebruiksaanwijzing (Handboek) QIASymphony DSP HPV Media Kit) voor instructies voor het bereiden van SurePath-samples en SurePath postgradiënt-celpelletsamples met behulp van de QIASymphony DSP HPV Media Kit.

Belangrijk: De sampleextracten die het resultaat zijn van de samplebereiding van SurePath-samples met behulp van de QIASymphony DSP HPV Media kit mogen alleen met het RCS worden getest. De handmatige uitvoering van de test met sampleextracten is niet gevalideerd.

De samplebereiding van SurePath-samples en SurePath postgradiënt-celpelletsamples met behulp van de QIASymphony DSP HPV Media Kit levert als resultaat kalibrators, kwaliteitscontroles en sample-extracten in een hybridisatie-microtiterplaat op die klaar zijn voor RCS-geautomatiseerd testen in de hybridisatiestap van de test.

 Raadpleeg bij het RCS-geautomatiseerd testen van samples die met de QIASymphony SP zijn verwerkt, de Gebruikershandleiding voor het Rapid Capture System – Uitvoeren van *digene* HC2 DNA tests met behulp van met QIASymphony SP verwerkte samples (*Rapid Capture System User Manual – Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*) voor instructies over het uitvoeren van de test.


Samplebereiding van PreservCyt-samples met de QIASymphony DSP AXpH DNA kit

 Raadpleeg voor instructies over de samplebereiding van PreservCyt-samples de Handleiding voor de QIASymphony DSP AXpH DNA kit (QIASymphony DSP AXpH DNA Kit Handbook).

Het resultaat van de samplebereiding van PreservCyt-samples met de QIASymphony DSP AXpH DNA kit is DNA-eluat in een hybridisatie-microtiterplaat, waarbij de eerste kolom leeg is. De

DNA-eluatens zijn klaar om te worden bewerkt in de denaturatiestap van de test. De kalibrators, kwaliteitscontroles en DNA-eluatens worden tegelijkertijd in de hybridisatie-microtiterplaat gedenuceerd (zie "Denaturatie en hybridisatie van samples die met de QIASymphony SP zijn verwerkt.", blz. 47).

Handmatige samplebereiding van PreservCyt-samples

 Raadpleeg de gebruiksaanwijzing van de *digene* HC2 Sample Conversion kit voor de handmatige bereiding van PreservCyt-samples

Het resultaat van de handmatige bereiding van PreservCyt-samples met de *digene* HC2 Sample Conversion Kit is samples die direct in de hybridisatiestap van de test kunnen worden gebruikt. Bereid de kalibrators en kwaliteitscontroles afzonderlijk (zie "Denaturatie van kalibrators, kwaliteitscontroles en STM-samples", blz. 50).

Handmatige samplebereiding van SurePath postgradiënt-celpellets

Handmatige samplebereiding van SurePath postgradiënt-celpellets levert samples die klaar zijn voor bewerking in de hybridisatiestap van de test. Bereid de kalibrators en kwaliteitscontroles afzonderlijk (zie "Denaturation of calibrators, quality controls and STM specimens," blz. **Error! Bookmark not defined.**).

Belangrijk: Als de postgradiënt-celpellet van de SurePath-sample minder dan 1 ml blijkt te bevatten, is de postgradiënt-celpellet niet geschikt om te testen met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-test, omdat na cytologie geen SurePath-conserveervloeistof is toegevoegd.

1. Laat de SurePath postgradiënt-celpellets op kamertemperatuur komen en controleer of het waargenomen vloeistofvolume ongeveer 2,8 ml is.
2. Centrifugeer de SurePath postgradiënt-celpellets in een centrifuge met uitzwaairotor gedurende 10 ± 1 minuten bij $800 \pm 15 \times g$.
3. Haal de buisjes uit de centrifuge.
4. Decanteer het supernatant direct na het centrifugeren voorzichtig en dep elk buisje ongeveer 3 maal op Kimtowels-doekjes of gelijkwaardige pluisarme papieren doekjes om overtollige vloeistof te verwijderen. Bekijk de pellet in elk buisje.
Belangrijk: Zorg dat de celpellets tijdens het deppen niet langs het buisje naar beneden glijden.
5. Plaats de buisjes in het rek.
6. Voeg aan elke pellet 200 μ l STM toe met een repetiteerpipet of een eenkanaalspipet.

7. Resuspendeer elke pellet door de buisjes één voor één gedurende 15 seconden bij hoge snelheid in de vortexmixer te mengen.

Als de pellet moeilijk te resuspendieren is, meng deze dan nogmaals 5-30 seconden in de vortexmixer, of totdat de pellet loskomt van de bodem van het buisje en zwevend in de oplossing uit elkaar lijkt te vallen.

NB: Buisjes kunnen zonder dop worden gemengd.

8. Pipetteer met een repeteerpipet of een eenkanaalspipet 100 µl DNR bij elk SurePath-sample.

Belangrijk: Zorg dat u de zijkanten van de buisjes niet aanraakt, omdat anders kruiscontaminatie van samples kan optreden.

9. Meng elk buisje grondig door de buisjes één voor één gedurende 5 seconden bij hoge snelheid in de vortexmixer te mengen.

NB: Buisjes kunnen zonder dop worden gemengd.

10. Schrijf op de *digene* HC2-sampleconversiebuisjes of op conische 15 ml-buisjes de juiste sampleidentificatie en het type sample (bijv. "SP" voor een SurePath-sample) en plaats de buisjes in een buisjesrek.

NB: Bij RCS-geautomatiseerd testen moeten *digene* HC2-sampleconversiebuisjes worden gebruikt.

11. Breng het hele samplevolume over in het juiste conische 15 ml-buisje. Gebruik hiervoor een wegwerp-transferpipet van 7 ml met standaardtip of een andere, gelijkwaardige pipet.

12. Plaats de doppen op de conische buisjes en plaats de buisjes in een buisjesrek.

13. Incubeer de buisjes gedurende 90 ± 5 minuten in een waterbad van $65 \pm 2^\circ\text{C}$.

NB: Deze incubatietijd is langer dan de tijd die nodig is voor andere goedgekeurde sampletypen.

Als de tests op dezelfde dag worden voltooid, denatureer dan de kalibrators en kwaliteitscontroles (zie "Denaturatie van kalibrators, kwaliteitscontroles en STM-samples", blz. 50).

14. Neem het buisjesrek na de incubatie uit het waterbad.

Als u een samplerek gebruikt, laat het dan niet afkoelen voordat u de deksel van het rek neemt. Ga direct door met testen of verwijder de deksel van het rek en de DuraSeal-film..

NB: Als het samplerek afkoelt, kunnen de buisjes aan het deksel van het rek vastplakken, waardoor materiaal gemorst kan worden.

De bereide SurePath-samples kunnen:

- Direct getest (ga door met "Hybridization of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples," blz. 52)

- Bewaard (zie "Optional stop point of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples," blz. 52)


Denaturatie en hybridisatie van samples die met de QIASymphony SP zijn verwerkt.

Het resultaat van de samplebereiding met de QIASymphony SP is een hybridisatie-microtiterplaat met, minimaal, de bereide samples.

Als PreservCyt-samples werden bereid met de QIASymphony SP, is de eerste kolom van de hybridisatie-microtiterplaat leeg. De inhoud van de microtiterplaat kan direct in de denaturatiestap van de test worden gebruikt. De kalibrators en kwaliteitscontroles worden handmatig of tijdens RCS-geautomatiseerd testen aan de hybridisatie-microtiterplaat toegevoegd, waarna de denaturatiestap wordt uitgevoerd.

Als de SurePath-samples of SurePath postgradiënt-cel-pelletsamples zijn bereid met behulp van de QIASymphony SP, dan bevat de plaat de bereide samples met de gedatureerde kalibrators en kwaliteitscontroles gepipetteerd in de eerste kolom van de hybridisatie-microtiterplaat. De inhoud van de microtiterplaat kan direct voor RCS-geautomatiseerd testen in de hybridisatiestap van de test worden gebruikt.

Belangrijk: De sample-extracten die verkregen zijn uit samplebereiding met behulp van de QIASymphony DSP HPV Media Kit kunnen alleen met behulp van het RCS worden getest. Handmatig uitvoeren van de test met sample-extracten is niet gevalideerd.

 Raadpleeg bij het RCS-geautomatiseerd testen van samples die met de QIASymphony SP zijn verwerkt, de Gebruikershandleiding voor het Rapid Capture System – Uitvoeren van *digene* HC2 DNA tests met behulp van met QIASymphony SP verwerkte samples (*Rapid Capture System User Manual – Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*) voor instructies over het uitvoeren van de test.

Denaturatie van kalibrators, kwaliteitscontroles en DNA-eluatens voor handmatig testen

- Deze procedure is bedoeld voor het handmatig testen van PreservCyt-samples die met de QIASymphony DSP AXpH DNA kit zijn bereid. Raadpleeg bij RCS-geautomatiseerd testen de Gebruikershandleiding voor het Rapid Capture System – Uitvoeren van *digene* HC2 DNA tests met behulp van met QIASymphony SP verwerkte samples (*Rapid Capture System User Manual – Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*) voor instructies over het uitvoeren van de test.

- De kalibrators en kwaliteitscontroles worden gedenatureerd met DNR, terwijl de DNA-eluat worden gedenatureerd met DNR2.

1. Meng elke kalibrator en kwaliteitscontrole 10 seconden in de vortexmixer op de maximale stand.
2. Draai elk buisje om, om materiaal uit de dop van het buisje in de vloeistof op te nemen.
3. Verwijder de dopjes van de kalibrator- en kwaliteitscontrolebuisjes en gooi ze weg.
4. Pipetteer met een eenkanaalspipet 50 µl van de toepasselijke kalibrator of kwaliteitscontrole op de bodem van een lege well van een eluaat-microtiterplaat, volgens de gemaakte plaatindeling.

Indien de kalibrator en kwaliteitscontroles voor verdere tests worden gebruikt, moet u nieuwe schroefdoppen voor sampleafnamebuisjes op de buisjes draaien, een nieuwe uiterste houdbaarheidsdatum noteren en ze bij 2-8°C bewaren.

NB: De geopende, niet-gedenatureerde kalibrators en kwaliteitscontroles blijven 3 maanden stabiel bij een temperatuur van 2-8°C.

5. Meng de bereide DNR en DNR2 grondig in de vortexmixer en breng ze over in een op de juiste wijze gelabeld wegwerp-reagensbuisje.

Belangrijk: Controleer of u het juiste reagens aan de juiste kolom van de eluaat-microtiterplaat toevoegt.

6. Voeg met een 8-kanaalspipet 25 µl DNR toe aan de eerste kolom van de hybridisatie-microtiterplaat, die de kalibrators en kwaliteitscontroles bevat.
7. Voeg met een 8-kanaalspipet 25 µl DNR2 toe aan elke well van de hybridisatie-microtiterplaat die een DNA-eluaat bevat.
8. Dek de hybridisatie-microtiterplaat af met een microtiterplaatdeksel en laat hem gedurende 30 seconden schudden op the Rotary Shaker I met 1.100 ± 100 tpm.
9. Plaats de microtiterplaat in de Microplate Heater I die op $65 \pm 2^\circ\text{C}$ is gebracht, en zorg ervoor dat u daarbij geen spatten veroorzaakt. Incubeer de hybridisatie-microtiterplaat gedurende 45 ± 5 minuten.

Bereid tijdens deze incubatie de probemix (zie "Probemix", blz. 39).

10. Neem de hybridisatie-microtiterplaat uit de Microplate Heater I.

De gedenatureerde kalibrators, kwaliteitscontroles en DNA-eluat kunnen:

- worden bewaard (zie "Optioneel stoppunt voor DNA-eluat", blz. 48)
- onmiddellijk worden getest (ga door met "Hybridisatie van DNA-eluat", blz. 49)

Optioneel stoppunt voor DNA-eluat

Gedenatureerde DNA-eluat, inclusief kalibrators en kwaliteitscontroles, kunnen in de microtiterplaat met deksel gedurende 2 weken worden bewaard bij 2-8°C.

Hybridisatie van DNA-eluat

1. Als de hybridisatie-microtiterplaat met de gedenatureerde kalibrators, kwaliteitscontroles en DNA-eluat werd bewaard, verwijdert u het deksel van de microtiterplaat en laat u de hybridisatie-microtiterplaat op 20-25°C komen.
2. Meng de probemix goed in de vortexmixer en breng hem over in een wegwerp-reagensbuisje.
3. Pipetteer zorgvuldig met een 8-kanaalspipet 25 µl probemix in elke well van de hybridisatie-microtiterplaat. Gebruik daarbij voor elke toevoeging van probemix nieuwe tips.
Zorg dat er geen vloeistof terugspat en dat u de wanden van de wells van de hybridisatie-microtiterplaat niet aanraakt.
4. Dek de hybridisatie-microtiterplaat af met een microtiterplaatdeksel en laat hem gedurende 3 ± 2 minuten schudden op the Rotary Shaker I met 1.100 ± 100 tpm.
Na het schudden moeten de kalibrators, kwaliteitscontroles en DNA-eluat geel worden.
Samples die paars blijven, hebben mogelijk niet de juiste hoeveelheid probemix gekregen. Voeg nogmaals 25 µl probemix toe aan de samples die paars zijn gebleven en schud opnieuw. Als een sample na het volgen van deze procedure nog paars blijft, moet het opnieuw worden getest.
5. Plaats de microtiterplaat in de Microplate Heater I die op $65 \pm 2^\circ\text{C}$ is gebracht, en zorg ervoor dat u daarbij geen spatten veroorzaakt. Incubeer de hybridisatie-microtiterplaat gedurende 60 ± 5 minuten.
6. Ga door naar "Hybriden-capturing", blz. 56 om verder te gaan met de test.

Denaturatie en hybridisatie van STM-samples en handmatig bereide PreservCyt en SurePath postgradiënt-celletsamples

- Als u handmatig bereide PreservCyt en SurePath postgradiënt-celletsamples test, hoeven de samples niet gedenatureerd te worden. De voor de test benodigde kalibrators en kwaliteitscontroles moeten echter volgens onderstaande instructies worden gedenatureerd.
- Sommige STM-samples kunnen bloed of ander biologisch materiaal bevatten. Dit materiaal kan de kleurverandering na toevoeging van DNR maskeren. Samples die vóór de toevoeging van DNR donkerrood gekleurd zijn, ondergaan bij deze stap mogelijk niet de juiste

kleurverandering. In deze gevallen heeft het niet optreden van de juiste kleurverandering geen invloed op de testresultaten. U kunt controleren of de samples goed gemengd zijn door de kleurverandering van de kalibrators en kwaliteitscontroles te bekijken.

Denaturatie van kalibrators, kwaliteitscontroles en STM-samples

- Verwijder nooit het sampleafnamehulpmiddel uit het sampleafnamebuisje.
- Om fout-positieve resultaten te vermijden is het essentieel dat al het samplemateriaal in aanraking komt met het DNR. Het mengen na de toevoeging van DNR is een kritische stap.
- STM-samples die zijn gedeneureerd volgens de MST Vortexer 2-methode moeten worden bewerkt met de methode "Hybridisatie met gebruik van een microtiterplaat en Microplate Heater I" op blz. **Error! Bookmark not defined.**. De methode "Hybridisatie met microbuisjes en een waterbad" (blz. **Error! Bookmark not defined.**) is niet gevalideerd met STM-samples die zijn gedeneureerd met gebruik van de MST Vortexer 2.

1. Verwijder de doppen van de buisjes en gooi ze weg.

Belangrijk: Doppen die van STM-samplebuisjes worden verwijderd, moeten als potentieel infectieus worden beschouwd (zie voor aanvullende informatie "Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen", blz. 22).

2. Pipetteer het aangegeven volume DNR (zie tabel 9 hieronder) met een repeteerpipet of instelbare pipet in de buisjes.

Zorg ervoor dat u de zijkanten van de buisjes niet aanraakt, omdat anders kruiscontaminatie van samples kan optreden.

Belangrijk: De kit met 1 plaat en de kit met 4 platen hebben verschillende volumes voor de hoogrisico HPV-kalibrator. Zorg dat u het juiste volume DNR toevoegt.

NB: Het volume DNR dat wordt toegevoegd, is gelijk aan de helft van het vloeistofvolume in het buisje.

Tabel 9. Toevoeging van DNR

Kalibrator, kwaliteitscontrole of STM-sample	Benodigd volume DNR
Negatieve kalibrator, 2 ml	1000 µl
7. Hoogrisico HPV-kalibrator, 1 ml	500 µl
Hoogrisico HPV-kalibrator, 2 ml	1000 µl
9. Laagrisico HPV- of hoogrisico HPV-kwaliteitscontrole, 1 ml	500 µl
STM-sample, 1 ml	500 µl

3. Meng de buizen ofwel met behulp van de MST Vortexer 2-methode ofwel met de handmatige methode voor het vortexen van afzonderlijke buizen

MST Vortexer 2-methode

- a. Dek de buisjes af met DuraSeal-film voor het afsluiten van buisjes, door de film over de buisjes in het samplerek te trekken.
- b. Plaats het deksel van het rek over de met film afgedekte buisjes en vergrendel hem met de 2-zijdige clips. Snijd de film met het snijtoestel af.
- c. Zet de rode hendel in de "UP"-positie, zodat hij horizontaal staat.
- d. Plaats het samplerek stevig in de geleiders op de MST Vortexer 2, met de hoek met de grootste uitsparing van het rek rechtsvooraan. Zet het samplerek vast door de rode hendel naar de "DOWN"-positie te draaien, zodat hij verticaal staat.
- e. Controleer of de snelheid is ingesteld op 100 (maximale snelheid), en zet de MST Vortexer 2 aan ("ON").
- f. Meng de buisjes 10 seconden in de vortexmixer.
- g. Zet de MST Vortexer 2 UIT.
- h. Neem het samplerek uit de MST Vortexer 2 door de rode hendel in de positie "UP" te zetten.

Handmatige methode voor het mengen van afzonderlijke buisjes in de vortexmixer

- a. Sluit de buisjes af met nieuwe schroefdoppen voor sampleafnamebuisjes.
 - b. Meng elk buisje grondig door de buisjes één voor één gedurende 5 seconden bij hoge snelheid in de vortexmixer te mengen.
Belangrijk: Tijdens het mengen moet een zichtbare werveling ontstaan, waarbij de vloeistof het hele binnenoppervlak van het buisje schoon spoelt.
 - c. Draai elk buisje één keer ondersteboven om de binnenkant van het buisje, de dop en de rand te spoelen.
 - d. Zet het buisje terug in het rek.
4. Incubeer de buisjes gedurende 45 ± 5 minuten in een rek in een waterbad van $65 \pm 2^\circ\text{C}$. Bereid bij handmatig testen tijdens deze incubatie de probemix (zie "Probemix", blz. 39).
5. Neem de buisjes na de incubatie uit het waterbad.

Als u een samplerek gebruikt, laat het dan niet afkoelen voordat u de deksel van het rek neemt. Ga direct door met testen of verwijder het deksel van het rek en de DuraSeal-film.

NB: Als het samplerek afkoelt, kunnen de buisjes aan het deksel van het rek vastplakken, waardoor materiaal gemorst kan worden.

De gedenatureerde kalibrators, kwaliteitscontroles en STM-samples kunnen:

- Bewaard (zie "Optional stop point of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples," blz. 52)
- Direct getest (ga door met "Hybridization of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples," blz. 52)

Optioneel stoppunt voor bereide STM-samples en handmatig bereide PreservCyt en SurePath postgradiënt-celpeletsamples


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

Alle bereide samples, inclusief kalibrators en kwaliteitscontroles, kunnen overnacht bij 2-8°C of gedurende maximaal 3 maanden bij -20°C worden bewaard. Er mogen maximaal 3 vries-/doicycli worden uitgevoerd, waarbij de samples tijdens elke dooicyclus maximaal 2 uur op kamertemperatuur mogen worden gehouden.

Als de samples overnacht bij 2-8°C in het samplerek worden bewaard, dek ze dan af met Duraseal-film voor het afsluiten van buisjes en plaats het deksel van het rek er weer op.

Als de samples bij -20°C in het samplerek worden bewaard, verwijder dan het deksel en de Duraseal-film en plaats een geschikte dop op de buisjes.

Hybridisatie van bereide STM-samples en handmatig bereide PreservCyt en SurePath postgradiënt-celpeletsamples

 Raadpleeg bij het RCS-geautomatiseerd testen van STM-samples of handmatig bereide PreservCyt en SurePath postgradiënt-celpeletsamples de *Rapid Capture System User Manual* (Rapid Capture System gebruiksaanwijzing) voor instructies hoe de test moet worden uitgevoerd.

Laat de gedenatureerde kalibrators, kwaliteitscontroles of samples, als deze bewaard zijn, op een temperatuur van 20-25°C komen. Als ze in een samplerek zijn bewaard, neem dan de doppen van de buizen en gooi ze weg.

- Er zijn twee hybridisatiemethoden beschikbaar voor STM-samples en handmatig bereide PreservCyt en SurePath postgradiënt-celpeletsamples: "Hybridisatie met gebruik van een microtiterplaat en Microplate Heater I" en "Hybridisatie met microbuisjes en een waterbad".
- STM-samples die zijn gedenatureerd volgens de MST Vortexer 2-methode moeten worden bewerkt met "Hybridisatie met gebruik van een microtiterplaat en Microplate Heater I" op blz. **Error! Bookmark not defined..** "Hybridisatie met microbuisjes en een waterbad" (blz. **Error!**

Bookmark not defined.) is niet gevalideerd met STM-samples die zijn gedenatureerd met gebruik van de MST Vortexer 2.

- Probemix is viskeus. Zorg ervoor dat de probemix goed wordt gemengd en dat de volledige benodigde hoeveelheid in elke well van de hybridisatie-microtiterplaat of in elk hybridisatie-microbuisje wordt gepipetteerd.
- Zorg dat u bij het overbrengen van het sample naar de hybridisatie-microtiterplaat of het hybridisatie-microbuisje de zijwanden van de wells van de hybridisatie-microtiterplaat, of de zijwanden van het hybridisatie-microbuisje, niet aanraakt, omdat er fout-positieve resultaten kunnen ontstaan als samples niet zorgvuldig worden overgebracht. Beperk de vorming van luchtbelllen. Gebruik voor elke overbrenging een schone, extra lange pipettip, om kruiscontaminatie te voorkomen.

Hybridisatie met gebruik van een microtiterplaat en Microplate Heater I

1. Neem een hybridisatie-microtiterplaat en noteer er een identificatie op.
2. Vortex volgens een van de volgende methoden:

Kalibrators, kwaliteitscontroles of STM-samples met de MST Vortexer 2

- a. Dek de buisjes, indien van toepassing, af met DuraSeal-film voor het afsluiten van buisjes en maak het deksel van het rek goed vast op het samplerek.
- b. Meng het samplerek in de vortexmixer gedurende minimaal 5 seconden op maximale snelheid.
- c. Plaats het samplerek direct op de labtafel en open de vergrendelingen. Til het deksel van het rek ongeveer 1 cm op en beweeg hem voorzichtig heen en weer om buisjes die eventueel aan de DuraSeal-film vastzitten, los te maken. Verwijder het deksel van het rek door hem recht omhoog te tillen totdat het samplerek vrijkomt.
- d. Trek voorzichtig de DuraSeal-film van het deksel van het rek en gooi het weg

PreservCyt of SurePath postgradiënt-celpelletsamples met de MST Vortexer 2

- a. Dek de buisjes, indien van toepassing, af met DuraSeal-film voor het afsluiten van buisjes en maak het deksel van het rek goed vast op het samplerek.
- b. Meng het samplerek in de vortexmixer gedurende minimaal 10 seconden op maximale snelheid.
- c. Plaats het samplerek direct op de labtafel en open de vergrendelingen. Til het deksel van het rek ongeveer 1 cm op en beweeg hem voorzichtig heen en weer om buisjes die eventueel aan de DuraSeal-film vastzitten, los te maken. Verwijder het deksel van het rek door hem recht omhoog te tillen totdat het samplerek vrijkomt.
- d. Trek voorzichtig de DuraSeal-film van het deksel van het rek en gooi het weg.

Alle sampletypen met vortexmixer

a. Vortex de buizen één voor één gedurende minimaal 5 seconden.

3. Breng met een EXPAND-4-pipet of een eenkanaalspipet met extra lange pipettip 75 µl van elk(e) kalibrator, kwaliteitscontrole of sample op de bodem van een lege well van de hybridisatie-microtiterplaat, volgens de gemaakte plaatindeling.

Als de samples worden bewaard, plaats dan nieuwe schroefdoppen voor sampleafnamebuizen op de gedenatureerde kalibrators, kwaliteitscontroles en STM-samples, en plaats de originele dop van elke sample op de PreservCyt en SurePath postgradiënt-cel pelletsamples.

Opmerking: Bewaar de samples binnen de limieten die in "Optional stop point of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples", blz. 52 staan vermeld.

4. Nadat het laatste sample is overgebracht, sluit u de hybridisatie-microtiterplaat met een microtiterplaatdeksel en incubeer u de plaat 10 minuten bij 20-25°C.
5. Meng de probemix goed in de vortexmixer en breng hem over in een wegwerp-reagensbuisje.
6. Pipetteer zorgvuldig met een 8-kanaalspipet 25 µl probemix in elke well van de hybridisatie-microtiterplaat. Gebruik daarbij voor elke toevoeging van probemix nieuwe tips.
Zorg dat er geen vloeistof terugspat en dat u de wanden van de wells van de hybridisatie-microtiterplaat niet aanraakt.
7. Dek de hybridisatie-microtiterplaat af met een microtiterplaatdeksel en laat hem gedurende 3 ± 2 minuten schudden op the Rotary Shaker I, op 1.100 ± 100 rpm.
Na het schudden moeten de kalibrators, kwaliteitscontroles, STM-samples en SurePath-samples geel worden en de PreservCyt-samples roze.
Samples die paars blijven, hebben mogelijk niet de juiste hoeveelheid probemix gekregen. Voeg nogmaals 25 µl probemix toe aan de samples die paars zijn gebleven en schud opnieuw. Als een sample na het volgen van deze procedure nog paars blijft, moet het opnieuw worden getest.
8. Plaats de microtiterplaat in de Microplate Heater I die op $65 \pm 2^\circ\text{C}$ is gebracht, en zorg ervoor dat u daarbij geen spatten veroorzaakt. Incubeer de hybridisatie-microtiterplaat gedurende 60 ± 5 minuten.
9. Ga door naar "Hybriden-capturing", blz. 56 om verder te gaan met de test.

Hybridisatie met microbuisjes en een waterbad

1. Noteer een identificatie op het benodigde aantal schone hybridisatie-microbuisjes en plaats de buisjes in het passende buizenrek.
2. Vortex elk buisje met kalibrator, kwaliteitscontrole of sample afzonderlijk gedurende minimaal 5 seconden voordat u er sample uitneemt.
3. Breng met een eenkanaalspipet met extra lange pipettip 75 µl van elke kalibrator, kwaliteitscontrole of sample op de bodem van het juiste hybridisatie-microbuisje, volgens de gemaakte plaatindeling.

Als de samples worden bewaard, plaats dan nieuwe schroefdoppen voor sampleafnamebuisen op de gedenatureerde kalibrators, kwaliteitscontroles en STM-samples, en plaats de originele dop van elke sample op de PreservCyt en SurePath postgradiënt-celletsamples.

Opmerking: Bewaar de samples binnen de limieten die in "Optional stop point of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples", blz. 52 staan vermeld.

4. Incubeer de hybridisatie-microbuisjes, nadat het laatste sample is overgebracht, gedurende 10 minuten bij 20-25°C.
5. Meng de probemix goed in de vortexmixer en breng hem over in een wegwerp-reagensbuisje.
6. Pipetteer zorgvuldig met een 8-kanaalspipet 25 µl probemix in elk hybridisatie-microbuisje. Gebruik daarbij voor elke rij nieuwe tips.
Zorg dat er geen vloeistof terugspat en dat u de wanden van de hybridisatie-microbuisjes niet aanraakt.

Bekijk het rek aan de onderkant om te controleren of aan alle hybridisatie-microbuisjes de juiste hoeveelheid probemix is toegevoegd.

7. Dek de hybridisatie-microbuisjes af met een afsluitstrip. Plaats het deksel op het rek. Schud het rek met microbuisjes gedurende 3 ± 2 minuten op de Rotary Shaker I met 1.100 ± 100 tpm.
Na het schudden moeten de kalibrators, kwaliteitscontroles, STM-samples en SurePath postgradiënt-celletsamples geel worden en de PreservCyt-samples roze
Na het schudden moeten de kalibrators, kwaliteitscontroles, STM-samples en SurePath-samples geel worden en de PreservCyt-samples roze.

Samples die paars blijven, hebben mogelijk niet de juiste hoeveelheid probemix gekregen. Voeg nogmaals 25 µl probemix toe aan de samples die paars zijn gebleven en schud opnieuw. Als een sample na het volgen van deze procedure nog paars blijft, moet het opnieuw worden getest.

8. Incubeer het rek met microbuisjes gedurende 60 ± 5 minuten in een waterbad van $65 \pm 2^\circ\text{C}$.
Controleer of het waterniveau in het bad voldoende hoog is om het hele vloeistofvolume in het hybridisatie-microbuisje onder te dompelen.
NB: Het rek met microbuisjes drijft in het water.
9. Ga door naar "Hybriden-capturing", blz. 56 om verder te gaan met de test.

Hybriden-capturing

1. Verwijder, met uitzondering van het vereiste aantal, alle capture-microtiterplaatwells van de voorgesneden plaat.
2. Stop de ongebruikte capturing-microtiterplaatwells in de originele zak en hersluit deze.
3. Gebruik een markeerstift om de kolommen te nummeren en noteer een geschikte identificatie op de capturing-microtiterplaat.

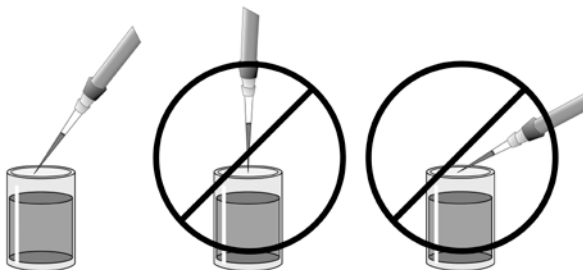
De samples worden volgens de gemaakte plaatindeling aan de wells van de capturing-microtiterplaat toegevoegd.

4. Neem voorzichtig de hybridisatie-microtiterplaat uit de Microplate Heater I of het rek met microbuisjes uit het waterbad, waar van toepassing.

Verwijder onmiddellijk het deksel van de microtiterplaat en plaats hem op een schoon oppervlak, of verwijder het deksel van het rek en trek langzaam de afsluitstrip omhoog en over het rek met microbuisjes los.

5. Breng de hele inhoud (ongeveer 100 μl) van de wells van de hybridisatie-microtiterplaat of van de hybridisatie-microbuisjes met een 8-kanaalspipet over naar de bodem van de bijbehorende wells van de capturing-microtiterplaat.

Gebruik voor elke overbrenging nieuwe pipettips en laat elke pipettip uitdruipen om te verzekeren dat het hele sample wordt overgebracht. Indien gewenst kunt u de pipet stabiel houden door het midden van de pipettips op de bovenrand van de wells van de capturing-microtiterplaat te laten steunen (zie Afbeelding 2 hieronder).



Correct	Niet verticaal pipetteren om terugspatten te voorkomen.	Zorg dat u de tip de zijkant van de well niet aanraakt.
---------	---	---

Afbeelding 2: Juiste pipetteertechniek.

- Dek de capturing-microtiterplaat af met het deksel of met een nieuwe afsluitstrip en schud gedurende 60 ± 5 minuten op de Rotary Shaker I met 1.100 ± 100 tpm, bij $20-25^{\circ}\text{C}$. Bereid tijdens deze incubatie de wasbuffer (zie "Wasbuffer", blz. 40).
- Neem de capturing-microtiterplaat na afloop van de incubatie van de Rotary Shaker I en verwijder voorzichtig het deksel of de afsluitstrip van de microtiterplaat.
- Verwijder de vloeistof uit de wells van de capturing-microtiterplaat door deze in een gootsteen weg te gieten; draai de capturing-microtiterplaat boven de gootsteen helemaal om en schud hard met een neerwaartse beweging.

Belangrijk: Draai de microtiterplaat niet terug.

Zorg dat u geen vloeistof laat terugspatten door de plaat te dicht bij de bodem van de gootsteen af te gieten.

- Verwijder de laatste vloeistof door stevig 2-3 keer met de plaat op een schoon Kimtowelsdoekje of een gelijkwaardig pluïsarmpapieren doekje te kloppen. Controleer of alle vloeistof uit de wells van de capturing-microtiterplaat is verwijderd en dat de bovenkant van de plaat droog is.
- Ga door naar "Hybriden-detectie", blz. 57 om verder te gaan met de test.

Hybriden-detectie

- Voeg de reagentia met een 8-kanaalspipet toe aan de capturing-microtiterplaat en werk daarbij van links naar rechts. Veeg met de tips langs de wand van het wegwerp-reagensbuisje om overtollig reagens te verwijderen voordat u de vloeistof in de microtiterplaat pipetteert.
- Als u geen 8-kanaalspipet gebruikt, kunt u in plaats daarvan een geschikte repeteerpipet gebruiken. Breng het DR1 over in een polypropyleenbuisje dat groot genoeg is voor het benodigde volume.
- Geadviseerd wordt om de omgekeerde pipetteertechniek toe te passen, voor een consistentere afgifte van reagens. De procedure wordt hieronder beschreven.
- Indien gewenst kunt u de pipet stabiel houden door het midden van de pipettips op de bovenrand van de wells van de capturing-microtiterplaat te laten steunen. Raak de zijkanten

van de wells van de capturing-microtiterplaat niet aan, omdat anders kruiscontaminatie tussen samples kan optreden (zie Afbeelding 2, blz. 56).

1. Meng het DR1 goed en breng zorgvuldig het toepasselijke volume (zie Tabel 1, blz. **Error! Bookmark not defined.** of Tabel 4, blz. **Error! Bookmark not defined.**) over in een schoon wegwerp-reagensbuisje.
2. Pipetteer zorgvuldig 75 µl DR1 in elke well van de capturing-microtiterplaat met de omgekeerde pipetteertechniek. Dit doet u als volgt:
 - a. Bevestig tips op een 8-kanaalspipet; controleer of alle tips goed vastzitten.
 - b. Duw de zuiger van de pipet voorbij de eerste stop door tot de tweede stop.
 - c. Breng de tips in het reagens.
 - d. Laat de zuiger langzaam omhoogkomen, waarbij het reagens in de tips stroomt.
 - e. Pipetteer het reagens in de wells van de microtiterplaat door de zuiger tot de eerste stop in te drukken. Laat de zuiger pas los wanneer de pipettips weer in het reagens zijn gebracht.
 - f. Vul de tips telkens opnieuw en ga zo door met pipetteren totdat alle wells van de microtiterplaat gevuld zijn.
3. Dek de capturing-microtiterplaat af met een deksel, schone Parafilm of een gelijkwaardige afdekking en incubeer 30-45 minuten bij 20-25°C.
4. Ga door naar "Wassen", blz. 59 om verder te gaan met de test.0.

Wassen

Was de capturing-microtiterplaat volgens een van de onderstaande methoden.

Methode met Automated Plate Washer (automatische plaatwasser)

Laat de Automated Plate Washer altijd aan staan. Controleer of het spoelreservoir gevuld is en het afvalreservoir leeg. De Automated Plate Washer zal het systeem regelmatig spoelen om het te reinigen. Raadpleeg de Gebruikershandleiding voor de Automated Plate Washer (*Automated Plate Washer User Manual*) voor meer instructies.

- Verzeker u ervan dat het wasreservoir ten minste tot de 1 liter-markering gevuld is met wasbuffer. Als dat niet het geval is, bereid dan de wasbuffer (zie "Wasbuffer", blz. 40).
 - Controleer of het spoelreservoir gevuld is met gedemineraliseerd of gedestilleerd water.
 - Controleer of het afvalreservoir leeg is en dat de dop van het reservoir goed vastzit.
 - De Automated Plate Washer wordt vóór elke wasstap automatisch ontlucht en na elke wasstap automatisch gespoeld.
 - Als u slechts een deel van een strip met wells van een capturing-microtiterplaat gebruikt, vult u de strip vóór het wassen aan door de lege wells in capturing-microtiterplaat te plaatsen.
1. Neem de deksel van de microtiterplaat en plaats de capturing-microtiterplaat op het platform van de Automated Plate Washer.
 2. Controleer of de Automated Plate Washer aan staat en of er **Digene Wash Ready** (Digene-wasstap voltooid) of **P1** op het scherm staat.
 3. Kies het aantal te wassen strips door op de toets **Rows** (Rijen) te drukken en daarna op **+** of **-** om het juiste aantal in te stellen.
 4. Druk nogmaals op de toets **Rows** om terug te keren naar **Digene Wash Ready** of **P1**.
 5. Druk op de toets **Start/Stop** om te beginnen.

De Automated Plate Washer verricht 6 vul- en aspiratiecycli die circa 10 minuten in beslag nemen. Tijdens het programma is een korte pauze ingelast; dus zorg ervoor dat u de microtiterplaat niet te vroeg verwijdert.

Wanneer de Automated Plate Washer klaar is met wassen, geeft hij "**Digene Wash Ready**" of "**P1**" aan.
 6. Neem als het programma voltooid is de capturing-microtiterplaat van het platform van de automatische plaatwasser.

De capturing-microtiterplaat moet er wit uitzien en er mag geen roze restantvloeistof in de microtiterplaatwells achterblijven.

7. Ga door naar "Signaalamplificatie", blz. 61 om verder te gaan met de test.

Methode met handmatig wassen

1. Verwijder het DR1 uit de wells van de capturing-microtiterplaat door schone Kimtowels-doekjes of gelijkwaardige pluisarme papieren doekjes op de capturing-microtiterplaat te leggen.
2. Verzeker u ervan dat de papieren doekjes over het hele oppervlak in contact zijn met de capturing-microtiterplaat en draai het geheel voorzichtig om.
3. Laat de capturing-microtiterplaat 1-2 minuten uitdruipen.
4. Dep de plaat goed door ermee op schone Kimtowels-doekjes of gelijkwaardige pluisarme papieren doekjes te kloppen.

Verwijder de gebruikte papieren doekjes voorzichtig, om contaminatie met alkalische fosfatase te voorkomen.

5. Was de capturing-microtiterplaat handmatig, 6 maal, met behulp van het wasapparaat.
Laat de wells van de capturing-microtiterplaat, om ze goed te wassen, overlopen met wasbuffer. Hierdoor wordt de DR1 ook van de bovenkant van de wells verwijderd. Het wassen begint bij well A1 van de capturing-microtiterplaat en gaat als een slang verder naar rechts en naar beneden. Giet nadat alle wells van de capturing-microtiterplaat gevuld zijn de vloeistof af in de gootsteen. Doe dit met een krachtige neerwaartse beweging. De tweede wascyclus begint bij well H12 van de capturing-microtiterplaat en gaat als een slang verder naar links en naar boven. Deze serie van 2 wascycli wordt nog 2 maal herhaald, zodat de capturing-microtiterplaat in totaal 6 maal wordt gewassen.
6. Dep de capturing-microtiterplaat na het wassen door de plaat op schone Kimtowels-doekjes of gelijkwaardige pluisarme papieren doekjes om te keren en er 3-4 maal stevig mee op de doekjes te kloppen. Vervang de papieren doekjes en herhaal het deppen.
7. Laat de capturing-microtiterplaat omgekeerd liggen en laat hem 5 minuten uitdruipen. Dep de capturing-microtiterplaat nog één keer.
De capturing-microtiterplaat moet er nu wit uitzien en er mag geen roze vloeistof in de wells zijn achtergebleven.
8. Ga door naar "Signaalamplificatie", blz. 61 om verder te gaan met de test.

Signaalamplificatie

- Gebruik een nieuw paar handschoenen voor het hanteren van DR2.
 - Voeg de reagentia met een 8-kanaalspipet toe aan de capturing-microtiterplaat en werk daarbij van links naar rechts.
 - Als u geen 8-kanaalspipet gebruikt, kunt u in plaats daarvan een geschikte repeteerpipet gebruiken. Breng het DR2 over in een polypropyleenbuisje dat groot genoeg is voor het benodigde volume.
 - Voeg het DR2 zonder onderbreking toe. De incubatietijd moet voor alle wells van de capturing-microtiterplaat zo gelijk mogelijk zijn.
 - Zorg ervoor dat u de wanden van de wells van de capturing-microtiterplaat niet aanraakt en dat u geen reagens op de pipettips laat spatten, omdat daardoor kruiscontaminatie van samples kan optreden (zie Afbeelding 2, blz. 56).
1. Meng het DR1 goed en breng zorgvuldig het toepasselijke volume (zie Tabel 1, blz. **Error! Bookmark not defined.** of Tabel 4, blz. **Error! Bookmark not defined.**) over in een schoon wegwerp-reagensbuisje.
 2. Pipetteer zorgvuldig 75 µl DR2 in elke well van de capturing-microtiterplaat en gebruik daarbij de eerder beschreven omgekeerde pipetteertechniek (zie "Hybriden-detectie", blz. 57).

Verzekert u ervan dat alle wells van de capturing-microtiterplaat goed gevuld zijn door de intensiteit van de gele kleur te bekijken; de gele kleur moet in alle wells van de capturing-microtiterplaat ongeveer even intens zijn.
 3. Dek de capturing-microtiterplaat af met een deksel en incubeer 15 minuten (en niet langer dan 30 minuten) bij 20-25°C.

Belangrijk: Vermijd direct zonlicht.
 4. Ga door naar "Meten van de capturing-microtiterplaten en genereren van resultaten", blz. 61 om verder te gaan met de test.

Meten van de capturing-microtiterplaten en genereren van resultaten

1. Meet de capturing-microtiterplaat met een DML-instrument.

Raadpleeg de betreffende gebruiksaanwijzing bij de software voor details over het meten van een capturing-microtiterplaat en het genereren van rapporten met testresultaten. Met de *digene* assay-analysesoftware kunt u relevante testinformatie invoeren.

-
2. Als een capturing-microtiterplaat niet volledig is gebruikt, verwijder dan de gebruikte wells van de capturing-microtiterplaat uit de voorgesmonteerde plaat, spoel de voorgesmonteerde plaat grondig met gedestilleerd of gedemineraliseerd water, droog het en bewaar het voor de volgende test.
 3. Gooi alle aliquots reagens en bereide reagentia weg, tenzij is beschreven dat dit niet moet. Verdun het overgebleven DNR in de fles voordat u het weggooit volgens de landelijke en plaatselijke laboratoriumprocedures.

Interpretatie van de resultaten

De assay-CO van 1 pg/ml van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-test is gelijk aan 100.000 HPV-kopieën/ml of 5.000 HPV-kopieën per assay.

Resultaten van metingen van STM-samples

STM-samples met een RLE/CO-waarde $\geq 1,0$ worden als "positive" (positief) beschouwd voor 1 of meer van de HPV-typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 en 68.

STM-samples met een RLE/CO-waarde $< 1,0$ worden als "negative" (negatief) of "no HPV DNA detected" (geen HPV-DNA gedetecteerd) beschouwd voor de 13 geteste HPV-typen. DNA-sequenties van hoogrisico HPV zijn afwezig of aanwezig in concentraties die onder de detectielimiet van de assay liggen.

Resultaten van metingen van SurePath-samples

SurePath-samples met een RLE/CO-waarde $\geq 1,0$ worden als "positive" (positief) beschouwd voor 1 of meer van de HPV-typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 en 68.

SurePath-samples met een RLE/CO-waarde $< 1,0$ worden als "negative" (negatief) of "no HPV DNA detected" (geen HPV-DNA gedetecteerd) beschouwd voor de 13 geteste HPV-typen. HPV-DNA-sequenties zijn ofwel afwezig, ofwel aanwezig in concentraties die onder de detectielimiet van de assay liggen.

Resultaten van metingen van PreservCyt-samples

PreservCyt-samples met een RLE/CO-waarde $\geq 1,0$ worden als "positive" (positief) beschouwd voor 1 of meer van de HPV-typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 en 68.

PreservCyt-samples met een RLE/CO-waarde $< 1,0$ worden als "negative" (negatief) of "no HPV DNA detected" (geen HPV-DNA gedetecteerd) beschouwd voor de 13 geteste HPV-typen. HPV-DNA-sequenties zijn ofwel afwezig, ofwel aanwezig in concentraties die onder de detectielimiet van de assay liggen.

Voor PreservCyt-samples met een RLE/CO-waarde $\geq 1,0$ en $< 2,5$ raadt QIAGEN aan het sample als volgt opnieuw te testen:

- Als bij de eerste herhaling van de test de RLE/CO $\geq 1,0$ is, rapporteer het sample dan als "positive" (positief). Verder testen is dan niet nodig.
- Als bij de eerste herhaling van de test de RLE/CO $< 1,0$ is, moet de test een tweede keer worden herhaald (derde testresultaat). Het tweede resultaat is het uiteindelijke resultaat ($< 1,0$ is negatief, $\geq 1,0$ is positief), dit resultaat wordt gerapporteerd.

RLE/CO-waarden dicht bij 1,0

Als de RLE/CO-waarde van een sample dicht bij, maar wel lager is dan 1,0, en er bestaat een vermoeden van infectie met hoogrisico HPV, dan moet worden overwogen om andere testmethoden te gebruiken en/of de test te herhalen met een nieuw sample.

Andere HPV-typen

Aangezien met deze test alleen de hoogrisico HPV-typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 en 68 worden gedetecteerd, moet u zich realiseren dat er andere, laag-risico HPV-typen in het sample aanwezig kunnen zijn. Als u specifiek op aanwezigheid van seksueel overdraagbare laag-risico HPV test, gebruik dan de *digene* HC2 HPV DNA test, waarmee u DNA van zowel laag-risico als hoogrisico HPV-DNA-typen kunt detecteren.

Verificatie van de assaykalibratie

De assaykalibratie wordt geverifieerd door te controleren of de reagentia, kalibrators en kwaliteitscontroles goed werken, waardoor de grenswaarde van de assay correct kan worden bepaald. Bij de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test moet bij elke test een assaykalibratie worden uitgevoerd; daarom is het noodzakelijk om elke assay te verifiëren. Deze verificatieprocedure is niet bedoeld ter vervanging van interne kwaliteitscontroles. Aanvaardbare bereiken voor assaykalibratie en kwaliteitscontroles zijn alleen vastgesteld voor DML-instrumenten die zijn goedgekeurd door QIAGEN.

Assaykalibratie wordt automatisch uitgevoerd door de *digene* assay-analysesoftware en afgedrukt in het data-analyserapport. Gebruikers van *digene* Qualitative Software versie 1.03 of ouder moeten de verificatie van de assaykalibratie echter handmatig uitvoeren voordat patiëntresultaten kunnen worden gerapporteerd. Neem voor meer informatie contact op met de technische diensten (Technical Services) van QIAGEN.

De test moet voldoen aan de opgegeven criteria voor assaykalibratie. Als één of meer van de volgende criteria ongeldig zijn, worden de resultaten van de samples niet door de software geïnterpreteerd.

Negatieve kalibrator (NC)

De NC moet bij elke test in triplo worden getest. Het gemiddelde van de NC-waarden moet ≥ 10 en ≤ 250 RLE zijn, en de variatiecoëfficiënt (VC) moet $\leq 25\%$ zijn. Als de VC $> 25\%$ is, verwijdert de software de RLE-waarde die het verst van het gemiddelde afwijkt als een outliner, en berekent vervolgens het gemiddelde en de VC met de overgebleven waarden.

Als de VC dan nog steeds $> 25\%$ is, is de assaykalibratie ongeldig en moet de test voor alle patiëntsamples worden herhaald. De resultaten van deze patiëntsamples mogen dan ook niet worden gerapporteerd.

Positieve kalibrator

De HRC moet bij elke test in triplo getest worden. De VC van de HRC-waarden moet $\leq 15\%$ zijn. Als de VC $> 15\%$ is, verwijdert de software de RLE-waarde die het verst van het gemiddelde afwijkt als een outliner, en berekent vervolgens het gemiddelde en de VC met de overgebleven waarden.

Als de VC dan nog steeds $> 15\%$ is, is de assaykalibratie ongeldig en moet de test voor alle patiëntsamples worden herhaald. De resultaten van deze patiëntsamples mogen dan ook niet worden gerapporteerd.

Gemiddelde van de positieve kalibrator /gemiddelde van de negatieve kalibrator

De software gebruikt de $HRC\bar{X}$ en de $NC\bar{X}$ om de waarde van $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$ te berekenen. Een geldige $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$ is gedefinieerd als $2,0 \leq HRC\bar{X}/NC\bar{X} \leq 15$.

Als de $HRC\bar{X}/NC\bar{X} < 2,0$ of > 15 is, is de assaykalibratie ongeldig en moet de test voor alle patiëntsamples worden herhaald. De resultaten van deze patiëntsamples mogen dan ook niet worden gerapporteerd.

Berekening van de grenswaarde

De *digene* assay-analysesoftware berekent en rapporteert voor alle samples de RLE/CO en positieve/negatieve resultaten. De grenswaarde voor het bepalen van positieve samples is de $HRC\bar{X}$. De *digene* assay-analysesoftware gebruikt de RLE-waarden van de samples om de resultaten uit te drukken in de RLE/CO-waarden van de samples.

Bij RCS-geautomatiseerd testen past het RCS-HPV-assayprotocol een kalibratie-aanpassingsfactor (CAF, calibration adjustment factor) van 0,8 toe op de geldige $HRC\bar{X}$. Deze CAF is noodzakelijk om de werkingseigenschappen van RCS-geautomatiseerd testen gelijkwaardig te houden aan die van handmatig testen. De CAF wordt alleen toegepast op resultaten van RCS-geautomatiseerd testen; daarom is het voor het genereren van nauwkeurige testresultaten essentieel om het juiste assayprotocol te selecteren.

Kwaliteitscontroles

Samples voor kwaliteitscontrole worden bij de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test geleverd en moeten voor interne kwaliteitscontroles worden gebruikt. De geleverde kwaliteitscontroles zijn gekloonde fragmenten HPV-DNA en zijn niet afkomstig van wildtype-HPV. Dit is hetzelfde type materiaal als wordt gebruikt voor de geleverde kalibrators. Aanvullende kwaliteitscontroles kunnen worden getest volgens de richtlijnen of vereisten van landelijke of plaatselijke regelgeving of keuringsinstellingen. De geleverde kwaliteitscontroles werken niet als geschikte kwaliteitscontrole voor het verwerken van PreservCyt-oplossing of SurePath-conserveervloeistof.

Raadpleeg de desbetreffende gebruiksaanwijzing bij de *digene* assay-analysesoftware voor instructies over het invoeren van de lotnummers en uiterste houdbaarheidsdatums van de kwaliteitscontroles. Voor een geldige assay moet de ratio RLE/CO van elke kwaliteitscontrole binnen de gedefinieerde criteria vallen die hieronder in tabel 10 zijn weergegeven.

Als de waarden van de kwaliteitscontroles niet binnen deze bereiken vallen, is de assay ongeldig en moet de test worden herhaald. De resultaten van deze patiënten mogen dan ook niet worden gerapporteerd

Tabel 10. Assay-validiteitscriteria voor de kwaliteitscontrole

Kwaliteitscontrole	Minimum (RLE/CO)	Maximum (RLE/CO)	VC (%)
QC1-LR	0.001	0.999	≤25
QC2-HR	2	8	≤25

Beperkingen

- De *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test voor HPV-typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 en 68 wordt niet aanbevolen voor evaluatie bij verdenking van seksueel misbruik.
- Prevalentie van HPV-infecties in een populatie kan de werking beïnvloeden. Positieve voorspellende waarden dalen bij het testen van populaties met een lage prevalentie of personen zonder risico op infectie.
- Een negatieve uitslag sluit de mogelijkheid van een HPV-infectie niet uit, omdat zeer lage virusgehalten of fouten bij de sampleafname een fout-negatief testresultaat kunnen veroorzaken. Bovendien detecteert deze test geen DNA van laag-risico HPV-typen (6, 11, 42, 43 en 44).
- Infectie met HPV is geen definitieve indicator van de aanwezigheid van een hooggradige cervixziekte en impliceert ook niet in alle gevallen dat zich een hooggradige cervixziekte of kanker zal ontwikkelen.
- Er bestaat een geringe mate van kruishybridisatie tussen de High-Risk HPV-probe en HPV-typen 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 en MM9. Patiënten met samples die hoge concentraties van deze HPV-typen bevatten, kunnen ten onrechte voor een colposcopie worden doorverwezen (15, 35).
- De *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test is bestemd voor het detecteren van hoogrisico HPV-typen, waaronder 39, 58, 59 en 68. Uit analytische onderzoeken verricht door QIAGEN, waarbij gekloond HPV-plasmide-DNA werd gebruikt, blijkt dat de assay deze typen detecteert in concentraties variërend van 0,62 pg/ml tot 1,39 pg/ml. Dit komt overeen met de detectiekenmerken van de andere HPV-typen waarvoor de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test bestemd is. QIAGEN heeft de detectie van deze HPV-typen slechts in een beperkt aantal klinische samples kunnen valideren. Vanwege de lage prevalentie van deze typen in de algemene populatie (28) zijn de werkingseigenschappen van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test niet statistisch bevestigd voor de detectie van HPV-typen 39, 58, 59 en 68.
- Indien er tijdens de afname van een STM-sample voor de test hoge concentraties antischimmelcrème, zaaddodende gel of vaginale spray aanwezig zijn, bestaat de mogelijkheid van een fout-negatief resultaat als deze samples zodanige concentraties HPV-DNA bevatten dat de RLE/CO-waarden dicht bij de grenswaarde van de assay liggen.
- Indien hoge concentraties antischimmelcrème, vaginale gel of bloed aanwezig zijn bij de afname van een PreservCyt-cervixsample voor samplebereiding met de QIASymphony DSP HPV Media kit, bestaat de mogelijkheid van een fout-negatief resultaat als deze samples zodanige HPV-DNA-concentraties bevatten dat de RLE/CO-waarden dicht bij de grenswaarde van de assay liggen.

- Als er zaaddodende gel aanwezig is op het moment dat een PreservCyt-cervixsample wordt afgenomen voor samplebereiding met de QIASymphony DSP AXpH DNA kit , kan een fout-negatief testresultaat worden verkregen.
- Als er zaaddodende gel, antischimmelcrème of ontstekingsremmende crème aanwezig is op het moment dat een SurePath-cervixsample wordt genomen voor samplebereiding met de QIASymphony DSP HPV Media Kit, kan een fout-negatief testresultaat worden verkregen.
- Kruisreactiviteit tussen de High-Risk HPV-probe en het plasmid-pBR322 kan voorkomen. De aanwezigheid van sequenties die homologoog zijn aan pBR322 is gerapporteerd bij humane genitale samples en er kunnen fout-positieve resultaten worden verkregen in aanwezigheid van hoge concentraties bacterie-plasmide.
- Bij RCS-geautomatiseerd testen kunnen fout-negatieve resultaten worden verkregen wanneer de hybridisatie-microtiterplaat niet visueel wordt gecontroleerd om te verzekeren dat de samples goed zijn overgebracht, en wanneer het eventueel niet goed overbrengen van samples niet wordt gecorrigeerd.

Werkingseigenschappen

Klinische werking bij het screenen van patiënten met een normale uitslag van een cervixuitstrijkje, als hulpmiddel bij de risicobeoordeling voor de behandeling van patiënten.

De resultaten van 8 onafhankelijke klinische studies, die zijn uitgevoerd door vooraanstaande medische en academische instituten en overheidsinstellingen, in centra in en buiten de Verenigde Staten, worden hieronder beschreven. In de studies werden geaccepteerde pap-methoden toegepast, die in gebruik waren in de landen waar de studie werd uitgevoerd. In alle gevallen op 2 na werd het Bethesda-graderingssysteem gebruikt om de pap-resultaten te interpreteren. Raadpleeg voor terminologie die overeenkomt met baarmoederhalskankerscreening in de Europese Gemeenschap de "European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening" (36). Daarnaast is hooggradige cervixziekte voor elk onderzoek gediagnosticeerd met onder colposcopie afgenomen biopten. In deze studies is de klinische bruikbaarheid van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test beoordeeld in vergelijking met het cervixuitstrijkje, voor oudere vrouwen (over het algemeen ouder dan 30 jaar). In alle studies op één na is ook prospectief HPV getest met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test.

De studies bestonden uit screeningsonderzoeken van een dwarsdoorsnede van de algemene populatie waarbij de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test werd gebruikt, tenzij hieronder anders

staat vermeld. Twee studies zijn in de Verenigde Staten uitgevoerd, 2 in Europa, 2 in Latijns-Amerika, één in Afrika en één in Azië.

De prestaties van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test, zoals die in 6 dwarsdoorsnedestudies is waargenomen, is samengevat (zie tabel 11 en 12 hieronder) voor vrouwen van 30 jaar en ouder met een histologisch bevestigde diagnose van hooggradige cervicale neoplasie, gedefinieerd als cervicale intra-epitheliale neoplasie (CIN)-3 of ernstiger.

Tabel 11. Schattingen van de prestaties — sensitiviteit en specificiteit

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

* Gegevens van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test voorzover beschikbaar, anders HCS-gegevens gebruikt; gegevens gecombineerd.

Tabel 12. Schattingen van de prestaties — positieve en negatieve voorspellende waarde

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

* Gegevens van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test voorzover beschikbaar, anders HCS-gegevens gebruikt; gegevens gecombineerd.

Over alle studies samen is er een uniforme, en vaak sterk significante, verbetering in de sensitiviteit voor de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test ten opzichte van alleen pap. Net als de sensitiviteit is ook de negatieve voorspellende waarde van HPV in alle gevallen beter dan die van alleen pap, en deze nadert de 100%. Deze negatieve voorspellende waarde geeft de hoge waarschijnlijkheid aan van de afwezigheid van cervixziekte met hoge graad of kanker bij vrouwen met een normale cytologie die vrij zijn van HPV-infectie.

Hoewel de specificiteit van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test lager is dan die voor alleen pap, heeft likelihood-ratio-analyse aangetoond dat de waargenomen daling van de specificiteit niet voldoende significant is om afbreuk te doen aan de klinische bruikbaarheid van de test voor het identificeren van vrouwen die weinig of geen kans hebben om cervixziekte te hebben of te ontwikkelen. Desalniettemin is het belangrijk dat de beslissing om een patiënt door te verwijzen voor colposcopie wordt gebaseerd op alle klinische en risicogerelateerde informatie en de anamnese van de patiënt, die de arts ter beschikking heeft. Belangrijke variabelen zijn een voorgeschiedenis van HPV-infectie en/of afwijkend cervixuitstrijkje, leeftijd bij eerste

geslachtsgemeenschap, aantal sekspartners en gelijktijdig aanwezige seksueel overdraagbare aandoeningen (37, 38).

Hoewel de prevalentie van ziekte met hoge graad niet significant varieert tussen de studies op basis waarvan de prestaties zijn bepaald, kan de prevalentie van HPV-infectie in een populatie de prestaties beïnvloeden, en deze prevalentie varieert doorgaans tussen patiëntenpopulaties. Bovendien is aangetoond dat de prevalentie van HPV-infectie zeer sterk afneemt bij stijgende leeftijd (17, 24-29, 38-40). Positieve voorspellende waarden dalen wanneer populaties met een lage prevalentie of personen met een laag risico van infectie worden getest.

Longitudinale analyse is uitgevoerd door de resultaten van 2 studies te gebruiken; één daarvan is uitgevoerd in de VS door het National Cancer Institute (NCI, nationaal kankerinstituut) in Portland, Oregon, en de andere in Frankrijk, in het Laboratoire Pol Bouin C.H.U. (Laboratorium Pol Bouin C.H.U.) in Reims. Deze longitudinale analyses zijn uitgevoerd om aan te tonen dat pap-negatieve/HPV-negatieve patiënten een kleinere kans hebben om cervixziekte te hebben dan vrouwen die volgens de traditionele definitie in de laagrisicogroep vallen en van wie de HPV-status onbekend is, en dan pap-negatieve/HPV-positieve patiënten (zie tabel 13 en 14 hieronder).

Tabel 13. Longitudinale analyse — relatief risico van ziekte met hoge graad

Onderzoeksgroep	Leeftijd	Laagrisico-indeling	n	Gevallen van CIN-3+	Percentage (per 100 patiëntjaren)	Relatief risico 95% BI
NCI	30 jaar en ouder	Pap normaal, HPV negatief	12,054	28	0.043	0.897 (0.596–1.348)
		Opeenvolgende normale paps*	9429	19	0.048	1.000
	Alle	Pap normaal, HPV negatief	17,594	48	0.056	0.678 (0.514–0.894)
		Opeenvolgende normale paps*	13,392	44	0.082	1.000
Frankrijk	30 jaar en ouder	Pap normaal, HPV negatief	1690	3	0.084	0.849 (0.307–2.35)
		Opeenvolgende normale paps†	2026	4	0.099	1.000
	Alle	Pap normaal, HPV negatief	2180	3	0.066	0.491 (0.221–1.09)
		Opeenvolgende normale paps†	2650	7	0.136	1.000

* Drie normale paps over ongeveer 2 jaar.

† Twee normale paps over ongeveer 2 jaar.

Tabel 14. Longitudinale analyse — ziektepercentages, bij aanvang gestratificeerd op basis van HPV-status

Onderzoeksgroep	Leeftijd	Status bij aanvang	n	Gevallen van CIN-3+	Percentage (per 100 patiëntjaren)	Relatief risico 95% BI
NCI	30 jaar en ouder	Pap normaal, HPV positief	1078	24	0.451	10.50 (6.13–18.0)
		Pap normaal, HPV negatief	12,054	28	0.043	1.00
	Alle	Pap normaal, HPV positief	2561	63	0.096	10.64 (7.33–15.5)
		Pap normaal, HPV negatief	17,594	48	0.056	1.00
Frankrijk	30 jaar en ouder	Pap normaal, HPV positief	419	14	2.346	27.3 (8.41–88.3)
		Pap normaal, HPV negatief	1696	3	0.084	1.00
	Alle	Pap normaal, HPV positief	619	22	2.520	37.0 (11.8–116)
		Pap normaal, HPV negatief	2180	3	0.066	1.00

aangetoond door het verhoogde risico van cervixziekte bij HPV-positieve vrouwen ten opzichte van dat bij HPV-negatieve vrouwen.

Klinische prestaties bij het screenen van patiënten met een ASCUS-pap-uitslag ter bepaling van de noodzaak van een verwijzing voor een colposcopie.

In Amerika is in 1996 onder leiding van het Kaiser Foundation Research Institute (onderzoeksinstituut van de Kaiser Foundation) en de Kaiser Permanente Medical Group (Amerikaanse zorgonderneming die zowel verzekeraar als zorgaanbieder is) een onderzoek verricht getiteld “Utility of HPV DNA Testing for Triage of Women with Borderline Pap Smears” (Bruikbaarheid van HPV-DNA-tests voor het selecteren van vrouwen met paptests met dubieus resultaat). Bij vrouwen die gebruik maakten van verschillende faciliteiten van de Kaiser-klinieken, werden cervicale samples afgenomen voor een standaard cervixuitstrijkje en voor de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test. De initiële cervixuitstrijkjes werden geëvalueerd volgens de Bethesda-classificatie. Raadpleeg voor terminologie die overeenkomt met baarmoederhalskankerscreening in de Europese Gemeenschap de “European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening” (42). Vrouwen (15 jaar of ouder) met de Pap-uitslag ASCUS (atypische cellen waarvan de significantie niet is vastgesteld) kwamen terug voor een colposcopie en biopsie.

Histologische samples genomen via colposcopie werden door pathologen onderzocht en er werd een initiële diagnose gesteld. Elk histologisch sample werd tevens beoordeeld door een onafhankelijke patholoog en een derde patholoog oordeelde over eventuele discrepanties tussen de eerste beoordeling en de onafhankelijke beoordeling.

Het eerste sample werd getest met een prototype van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test die probes tegen 11 van de 13 HPV-typen bevatte (zonder HPV-typen 59 en 68). Er werd niet verwacht dat dit verschil een significant verschillend prestatieprofiel voor de test zou geven.

Hoogrisico HPV DNA-testresultaten en histologische diagnoses waren beschikbaar van 885 vrouwen met ASC-US papuitstrijkjes. De tests werden bij de meerderheid van de patiënten uitgevoerd met samples die in zowel STM als PreservCyt-oplossing werden afgenomen. Vanwege de overeenkomsten in de werkingseigenschappen van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-test bij gebruik van STM en PreservCyt-oplossing, zijn alleen de prestaties van de assay met PreservCyt-oplossing vermeld.

Onder de patiënten met een ASCUS-paptestuitslag met doorverwijzing bedraagt de negatieve voorspellende waarde van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test voor het hebben van HSIL lesies of ernstiger ziekte bij colposcopie 99% (zie tabel 15 hieronder).

Tabel 15. Vergelijking van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test met consensus-histologie; groep met ASCUS-paptestuitslag met doorverwijzing; Kaiser-studie, PreservCyt-samples

		HSIL lesies of ernstiger op het moment van colposcopie		Totaal
		+	-	
<i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA Test result	+	66	317	383
	-	5	497	502
Totaal		71	814	885

Sensitiviteit [TP/(TP+FN)] = 93,0% (66/71)
 95% BI = 84,3-97,7
 Specificiteit [TN/(TN+FP)] = 61,1% (497/814)
 95% BI = 57,7-64,4
 Ziekteprevalentie = 8,0% (71/885)
 Positieve voorspellende waarde van de assay = 17,2% (66/383)
 Negatieve voorspellende waarde van de assay = 99,0% (497/502)

De theoretische positieve en negatieve voorspellende waarden werden vastgesteld op basis van verscheidene prevalenties van een eerste ASCUS-paptestuitslag waarbij op basis van de resultaten van de hoogrisico HPV-test werd gevonden dat er sprake was van HSIL lesies of ernstiger (zie tabel 16 hieronder).

Tabel 16. Theoretische positieve en negatieve voorspellende waarde van hoogrisico-HPV-testen van ASCUS-paptestuitslagen

Theoretische prevalentie voor HSIL lesies	Eerste ASCUS-paptestuitslag	
	Positieve voorspellende waarde van de assay	Negatieve voorspellende waarde van de assay
5	11.2	99.4
10	21.0	98.7
15	29.7	98.0
20	37.4	97.2
25	44.3	96.3
30	50.6	95.3

De variatie tussen de verschillende leeftijdsgroepen die in deze studie voorkomen, is bepaald (zie tabel 17 hieronder).

Tabel 17. Kaiser-onderzoeksgegevens: Prestaties van de digene HC2 High-Risk HPV DNA test versus resultaten van consensus-histologie (HSIL) – leeftijdspecifieke eigenschappen

	Leeftijd < 30 jaar	Leeftijd 30–39 jaar	Leeftijd > 39 jaar
n	287	233	365
Ziekteprevalentie (%)	12.2	11.2	2.7
Sensitiviteit (%)	100	88.46	80.0
(n/N)	(35/35)	(23/26)	(8/10)
95% BI	90.0–100.0	69.9–97.6	44.4–97.5
Specificiteit (%)	31.4	66.2	79.15
(n/N)	(79/252)	(132/207)	(281/355)
95% BI	25.7–37.5	59.3–72.6	74.6–83.3
Negatieve voorspellende waarde (%)	100.0	97.86	99.29
(n/N)	(79/79)	(137/140)	(281/283)
Positieve voorspellende waarde (%)	16.83	24.73	9.76
(n/N)	(35/208)	(23/93)	(8/82)

Klinische sensitiviteit en specificiteit voor de bepaling van het risico van hooggradige pathologie bij vrouwen met paptestuitslagen met LSIL- of HSIL pap-uitstrijkjes

Een multicenter klinisch onderzoek met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test werd verricht met samples die verzameld waren in poliklinieken voor colposcopie van enkele grote ziekenhuizen en

medische centra (3 locaties) in het westen en zuiden van de Verenigde Staten met een hoge prevalentie aan ernstige cervixpathologie en HPV. De HPV-tests werden uitgevoerd op 3 onderzoekslocaties die geen connecties hadden met de poliklinieken waar de samples waren afgenomen. De populatie in dit klinische onderzoek bestond uit vrouwen bij wie ofwel LSIL ofwel HSIL was geconstateerd op basis van een recent cervixuitstrijkje en die verwezen waren voor een vervolgcoscopie. Van 702 deelnemende patiënten hadden er 327 Pap-uitslagen hoger dan ASCUS en was adequate informatie beschikbaar; van deze patiënten hadden 96 een uiteindelijke ziektestatus van HSIL of hoger.

Uitgestreken cervicale celsamples werden ofwel met behulp van het *digene* HC2 DNA Collection Device verkregen en vervolgens in STM gebracht, ofwel met behulp van een cervixborstel verkregen en met PreservCyt-oplossing gespoeld. De samples werden afgenomen bij de colposcopie. De samples werden getest met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test, en de resultaten werden vergeleken met de voor elke patiënt vastgestelde ziektestatus. De ziektestatus was gebaseerd op de resultaten van de histologische evaluatie. Wanneer de histologie echter negatief was, of bij het ontbreken van een histologische uitslag, werd de ziektestatus bepaald aan de hand van de cytologie bij het colposcopisch onderzoek (zie tabel 18 hieronder).

De *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test werd uitgevoerd in 3 grote, hoofdstedelijke medische centra die geen connecties hadden met de centra waar de samples bij de colposcopie waren afgenomen. De cytologie werd in een pathologisch referentielaboratorium verricht en de histologie in de instellingen die de colposcopie verrichtten. De testresultaten werden vergeleken met de ziektestatus ter beoordeling van de sensitiviteit, specificiteit en negatieve en positieve voorspellende waarden van de test voor het aantonen van hooggradige cervicale neoplasie. Vanwege de overeenkomsten in de werkingseigenschappen van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test bij gebruik van STM en PreservCyt-oplossing, zijn alleen de prestaties van de assay met PreservCyt-oplossing vermeld. Er werden bij de resultaten van de hoogrisico HPV-tests geen verschillen waargenomen tussen de STM-samples en de PreservCyt-samples.

Tabel 18. Algoritme van de ziektestatus van de patiënt

Cytologie-resultaat	Histologie-resultaat	Ziektestatus
Negatief	Negatief of niet uitgevoerd*	Negatief
LSIL	Negatief	LSIL
HSIL	Negatief	HSIL
Kanker	Negatief	HSIL +
Negatief	LSIL	LSIL
LSIL	Niet uitgevoerd*	LSIL
LSIL	LSIL	LSIL
HSIL	LSIL	LSIL
Kanker	LSIL	LSIL
Negatief	HSIL	HSIL
LSIL	HSIL	HSIL
HSIL	HSIL	HSIL
HSIL	Niet uitgevoerd*	HSIL
Kanker	HSIL	HSIL
Negatief	Kanker	HSIL +
LSIL	Kanker	HSIL +
HSIL	Kanker	HSIL +
Kanker	Niet uitgevoerd*	HSIL +
Kanker	Kanker	HSIL +

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

De prestaties van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test werden bepaald met 327 PreservCyt-samples, waarvan er 96 waren afgenomen bij vrouwen met een diagnose van cervixziekte met hoge graad (zie tabel 19 en 20 hieronder). De vergelijkingen werden uitgevoerd met alle onderzochtpatiënten met afwijkende paptestresultaten en doorverwijzing.

Tabel 19. Resultaten van hoogrisico HPV-tests

		Uiteinde- lijke ziektestatus HSIL		Uiteinde- lijke ziektestatus LSIL		Uiteinde- lijke ziektestatus negatief		Totaal
		+	-	+	-	+	-	
Paptest-resultaat met doorver- wijzing	LSIL	44	4	78	33	28	37	224
	HSIL	45	3	29	14	5	7	103
	Totaal	89	7	107	47	33	44	327
	Totaal	96		154		77		327

De *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test vertoonde een overall sensitiviteit van ongeveer 93% voor het identificeren van vrouwen met hooggradige neoplasie in een groep die was doorverwezen voor colposcopie op basis van een diagnose van LSIL, HSIL lesies of gelijkwaardig in een paptest (zie tabel 20 hieronder). De test toonde ook een negatieve voorspellende waarde van bijna 95% aan in deze populatie.

Tabel 20. Werkingseigenschappen van hoogrisico DNA-tests onder patiënten met een paptest met doorverwijzing met LSIL lesies of hoger en een uiteindelijke ziektestatus van HSIL lesies

		Uiteindelijke ziektestatus		Totaal
		HSIL	LSIL of negatief	
Resultaat hoogrisico HPV- DNA-test	+	89	140	229
	-	7	91	98
	Totaal	96	231	327

Sensitiviteit $[TP/(TP+FN)] = 92,7\%$ (89/96)
 95% BI = 85,6 97,0
 Specificiteit $[TN/(TN+FP)] = 39,4\%$ (91/231)
 95% BI = 33,1 46,0
 Ziekteprevalentie voor LSIL met verwijzing tot uiteindelijk HSIL = 21,4%
 Ziekteprevalentie voor HSIL met verwijzing tot uiteindelijk HSIL = 46,6%
 Algehele positieve voorspellende waarde = 38,9% (89/229)
 Algehele negatieve voorspellende waarde = 92,8% (91/98)

De specificiteit van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test bleek wat aan de lage kant te zijn, maar een strikte correlatie tussen afwezigheid van neoplasie en een negatief HPV-resultaat is niet te verwachten. Er kan HPV-DNA aanwezig zijn bij vrouwen bij wie geen progressie naar ziekte met een hogere graad heeft plaatsgevonden. Wanneer HPV werd getest met PCR (Polymerase Chain Reaction, een assay die alleen voor onderzoeksdoeleinden mag worden gebruikt), in

samples met een positief resultaat bij de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test en een corresponderende ziektestatus die minder ernstig was dan neoplasie met lage graad, was in feite bijna 75% positief.

De theoretische positieve en negatieve voorspellende waarden van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test zijn bepaald voor aanvankelijke paptestresultaten van LSIL, HSIL lesies die uiteindelijk bij colposcopie CIN-3 lesies of ernstiger ziekte bleken (zie tabel 21 hieronder).

Tabel 21. Theoretische positieve en negatieve voorspellende waarden van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test bij paptestresultaten van LSIL, HSIL lesies.

Theoretische prevalentie voor HSIL	Aanvankelijk paptestresultaat LSIL, HSIL	
	Positieve voorspellende waarde van de assay	Negatieve voorspellende waarde van de assay
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

Werkings eigenschappen bij vaginaal door een arts of zelf afnemen

In de geciteerde literatuur voor de prestaties van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-test bij zelfgenomen vaginale samples deden meer dan 141.000 vrouwen in de leeftijd tussen 16–54 mee aan de studie. Tot de studiegroepen behoorden vrouwen uit China (41, 42), Mexico (43, 44) en het Verenigd Koninkrijk (45). Er was een lichte variatie in de opzet van de diverse studies, maar over het algemeen kregen vrouwen met een positief testresultaat verder onderzoek aangeboden in de vorm van colposcopie, en de resultaten werden gerapporteerd in termen van gevoeligheid en specificiteit ten opzichte van de vergelijkende methode.

In twee studies, waar gegevens beschikbaar waren om zelfgenomen samples te vergelijken met door een arts afgenomen samples, laten de resultaten een hoge mate van gevoeligheid zien voor CIN2+ voor beide methoden (42, 45), 81–85% voor zelfgenomen samples tegenover 96–100% voor door een arts afgenomen samples. De specificiteitsresultaten waren vergelijkbaar voor

CIN2+ voor beide methoden (42, 45), 81-82% voor zelfgenomen samples tegenover 83-85% voor door een arts afgenomen samples. In andere studies waarbij alleen zelfgenomen prestatiegegevens beschikbaar waren, was de prestatie van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-test voor wat betreft gevoeligheid voor CIN2+ 3,4 keer groter dan cytologie (43) en 98% gevoeligheid voor verificatie bias-aanpassing (44).

Analytische sensitiviteit

Een niet-klinisch panel van gekloond HPV-plasmide-DNA werd getest om te bepalen of alle 13 HPV-typen aantoonbaar zijn met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test en om de analytische sensitiviteit van de assay te bepalen voor elk van de HPV-typen. Elke HPV-targetconcentratie (100 pg/ml, 10 pg/ml, 2,5 pg/ml, 1,0 pg/ml, 0,5 pg/ml en 0,2 pg/ml) van elk van de 13 HPV-DNA-typen (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 en 68) werd in triplo getest. De gemiddelde RLE-waarde werd voor elke concentratie van elk HPV-type berekend en vergeleken met de positieve kalibrator.

De detectielimiet van elk HPV-type in STM werd bepaald (zie tabel 22 hieronder). De detectielimieten varieerden van 0,62 pg/ml tot 1,39 pg/ml, afhankelijk van het geteste HPV-type. De gemiddelde detectielimiet van alle 13 HPV-DNA-typen was 1,08 pg/ml, met een standaarddeviatie van 0,05 pg/ml.

Tabel 22. Samenvatting van de gevoeligheids-detectielimieten voor elk HPV-DNA-type in STM

HPV-DNA-type	Detecteerbare HPV-DNA concentratie (pg/ml)	Standaard-deviatie	95% BI
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
Gemiddelde (alle typen)	1.08	0.05	0.95–1.25

Gelijkwaardigheid van sampletypen

Gelijkwaardigheid van STM- en PreservCyt-samples

Er is onderzocht of STM- en PreservCyt-samples gelijkwaardig zijn wat betreft een gelijke opbrengst van HPV 18-DNA. Er werden ongeveer 10^6 positieve HeLa-cellen die geïntegreerde HPV 18-genomen bevatten, toegevoegd aan STM en aan een negatieve celpool in PreservCyt-oplossing. Elk type sample werd verwerkt volgens de respectieve procedures voor samplebereiding en denaturatie die in de betreffende gebruiksaanwijzingen beschreven worden, en getest met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test. Uit de resultaten bleek dat de opbrengst aan HPV 18-DNA uit humane carcinoomcellen voor de twee media gelijk is, en dat de samplebereiding met PreservCyt-oplossing niet van invloed is op de analytische sensitiviteit van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test.

Gelijkwaardigheid van handmatige samplebereiding van PreservCyt-samples en samplebereiding van PreservCyt-samples met de QIASymphony DSP HPV Media kit

Er zijn onderzoeken uitgevoerd met PreservCyt-samples die waren afgenomen bij een subpopulatie vrouwen met normale cytologie ($n=1276$) en bij een subpopulatie vrouwen met ASCUS-cytologie of hogere ASCUS ($n=402$). Handmatige samplebereiding en samplebereiding met de QIASymphony DSP HPV Media kit werden uitgevoerd bij elk sample gevolgd door RCS-geautomatiseerd testen met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test (zie tabel 23 hieronder).

Tabel 23. Overeenkomsten van de resultaten verkregen met PreservCyt-samples tussen handmatige samplebereiding en samplebereiding met de QIASymphony DSP HPV Media kit ($n=1678$)

Positieve overeenkomst (%) (n/N) 95% BI		Negatieve overeenkomst (%) (n/N) 95% BI	
Alle positieven	Sterk-positief gebied (RLE/CO $\geq 2,5$)	Alle negatieven	Sterk-negatief gebied (RLE/CO $< 0,8$)
96.0 (409/426)	97.6 (372/381)	96.2 (1204/1252)	99.1 (1173/1184)
93.7–97.5	95.6–98.8	95.0–97.1	98.3–99.5

De relatieve sensitiviteit en specificiteit van de assay voor PreservCyt-samples die zijn bereid met de QIASymphony DSP HPV Media kit vertonen een sterke correlatie met de resultaten die worden verkregen met de handmatige samplebereidingsmethode. Dit wordt aangetoond door de ondergrens van het 95% BI voor zowel positieve als negatieve overeenkomsten.

Equivalentie tussen de handmatige samplebereiding van PreservCyt-samples en samplebereiding van PreservCyt-samples met de QIASymphony DSP AXpH DNA kit

Er zijn onderzoeken uitgevoerd met PreservCyt-samples die waren afgenomen bij een subpopulatie vrouwen in de leeftijd van 30 jaar en ouder met normale cytologie (n=1901) en bij een subpopulatie vrouwen met ASCUS-cytologie (n=398). Handmatige samplebereiding en samplebereiding met de QIASymphony DSP AXpH DNA kit werden uitgevoerd bij elk sample gevolgd door RCS-geautomatiseerd testen met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test (zie tabel 24 hieronder).

Tabel 24. Overeenkomsten van de resultaten verkregen met PreservCyt-samples tussen handmatige samplebereiding en samplebereiding met de QIASymphony DSP AXpH DNA kit (n=2299)

Positieve overeenkomst (%) (n/N) 95% BI		Negatieve overeenkomst (%) (n/N) 95% BI	
Alle positieven	Sterk-positief gebied (RLE/CO \geq 2,5)	Alle negatieven	Sterk-negatief gebied (RLE/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

De relatieve sensitiviteit en specificiteit van de assay voor PreservCyt-samples die zijn bereid met de QIASymphony DSP AXpH DNA kit vertonen een sterke correlatie met de resultaten die worden verkregen met de handmatige samplebereidingsmethode. Dit wordt aangetoond door de ondergrens van het 95% BI voor zowel positieve als negatieve overeenkomsten.

elijkwaardigheid tussen STM en handmatige samplebereiding van SurePath postgradiënt-celpelletsamples

Er is een klinische tweefasen-evaluatie uitgevoerd bij 6 afdelingscentra en 3 testinstellingen in de VS. Patiënten die een STD-kliniek, kliniek voor obstetrie/gynaecologie, colposcopiekliniek, ziekenhuis of centrum voor gezinsplanning bezochten, konden in aanmerking komen voor opname in de studie, op basis van vooraf bepaalde inclusie- en exclusiecriteria. Voor de haalbaarheidsfase, die was bedoeld om een passende CO-waarde vast te stellen voor de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-test voor gebruik met SurePath postgradiënt-celpelletsamples, werden ongeveer 400 patiënten in de studie opgenomen. In de klinische-valideringsfase, die was bedoeld om de gekozen CO-waarde te valideren, werden ongeveer 1.500 patiënten

opgenomen. Deze fase werd gestart nadat in een tussentijdse analyse van de haalbaarheidsfase was aangetoond dat een CO-waarde van 1,0 RLE/CO bij gebruik van SurePath postgradiënt-celpletsamples een aanvaardbare overeenkomst met STM-samples gaf.

In beide evaluatiefasen werden gepaarde SurePath- en STM-cervicale samples afgenomen bij elke deelnemer die daarin had toegestemd. De SurePath-sample werd vervolgens voor de bereiding van objectglasjes naar een cytologielaboratorium gestuurd. Na de cytologische bereiding werden de overgebleven SurePath postgradiënt-celpletsamples en de corresponderende STM-sample getest met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-test, waarbij een CO-waarde van 1,0 RLE/CO werd gebruikt (zie tabel 25 hieronder).

Tabel 25. Overeenkomsten van de resultaten verkregen met SurePath postgradiënt-celpletsamples en de resultaten verkregen met STM-samples (alle leeftijden en cytologische classificaties) (n=1.490)

Positieve overeenkomst (%) (n/N) 95% BI		Negatieve overeenkomst (%) (n/N) 95% BI	
Alle positieven	Sterk-positief gebied (RLE/CO \geq 2,5)	Alle negatieven	Sterk-negatief gebied (RLE/CO < 0,80)
93.5 (401/429)	96.4 (378/392)	95.3 (1011/1061)	96.0 (1002/1044)
90.7–95.6	94.1–98.0	93.8–96.5	94.6–97.1

De relatieve gevoeligheid en specificiteit van de assay voor het testen van SurePath postgradiënt-celpletsamples vertonen een sterke correlatie met de resultaten die werden verkregen bij het testen van STM-samples. Dit wordt aangetoond door de onderlimiet van het 95% BI voor zowel positieve als negatieve overeenkomsten.

Gelijkwaardigheid tussen handmatige samplebereiding van Sure Path postgradiënt-celpletsamples en samplebereiding van SurePath-samples met behulp van de QIASymphony DSP HPV Media Kit

Er werden onderzoeken uitgevoerd met SurePath-samples die werden verkregen van de volgende subpopulaties:

- Vrouwen met normale cytologie (n=1189)
- Vrouwen met een cytologie van ASCUS of groter dan ASCUS (n=199)

Voor elke SurePath-sample vond samplebereiding van de SurePath-sample met behulp van de QIASymphony DSP HPV Media Kit en handmatige samplebereiding van de postgradiënt-celpelletsample plaats. Voor elke van de bereide samples werd RCS-geautomatiseerd testen met de digene HC2 High-Risk HPV DNA-test uitgevoerd (zie tabel 26 hieronder).

Tabel 26. Resultaat overeenkomst tussen handmatige samplebereiding van Sure Path-samples en samplebereiding van SurePath-samples met behulp van de QIASymphony DSP HPV Media Kit (n=1388)

Positieve overeenkomst (%) (n/N) 95% BI		Negatieve overeenkomst (%) (n/N) 95% BI	
Alle positieven	Sterk-positief gebied (RLE/CO \geq 2,5)	Alle negatieven	Sterk-negatief gebied (RLE/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

De relatieve sensitiviteit en specificiteit van de assay voor SurePath-samples die zijn bereid met de QIASymphony DSP HPV Media kit vertonen een sterke correlatie met de resultaten die worden verkregen met de handmatige samplebereidingsmethode. Dit wordt aangetoond door de ondergrens van het 95% BI voor zowel positieve als negatieve overeenkomsten.

Gelijkwaardigheid tussen handmatige samplebereiding van Sure Path postgradiënt-celpelletsamples en samplebereiding van SurePath postgradiënt-celpelletsamples met behulp van de QIASymphony DSP HPV Media Kit

Er werden onderzoeken uitgevoerd met SurePath-samples die werden verkregen van de volgende subpopulaties:

- Vrouwen met normale cytologie (n=1200)
- Vrouwen met een cytologie van ASC-US of meer dan ASC-US (n=183)

Voor elke SurePath postgradiënt-celpelletsample vond zowel handmatige samplebereiding als samplebereiding met behulp van de QIASymphony DSP HPV Media Kit plaats, gevolgd door RCS-geautomatiseerd testen met de digene HC2 High-Risk HPV DNA-test (zie tabel 27 hieronder).

Tabel 27. SurePath postgradiënt-celpletsample resultaat overeenkomst tussen handmatige samplebereiding en samplebereiding met behulp van de QIASymphony DSP HPV Media Kit (n=1383)

Positieve overeenkomst (%) (n/N) 95% BI		Negatieve overeenkomst (%) (n/N) 95% BI	
Alle positieven	Sterk positief gebied RLE/CO \geq 2,5	Alle negatieven	Sterk negatief gebied RLE/CO $<$ 0,8
92.6 (188/203)	97.4 (147/151)	94.4 (1114/1180)	99.3 (1078/1086)
88.2–95.5	93.4–99.0	92.9–95.6	98.6–99.6

De relatieve gevoeligheid en specificiteit van de assay voor SurePath postgradiënt-celpletsamples die zijn bereid met behulp van de QIASymphony DSP HPV Media Kit vertonen een sterke correlatie met de resultaten die worden verkregen met de handmatige samplebereidingsmethode. Dit wordt aangetoond door de onderlimiet van het 95% BI voor zowel positieve als negatieve overeenkomsten.

Overeenkomst tussen testmethoden

Er is een multicenter-studie uitgevoerd (n=2270) om de klinische testresultaten die met RCS worden verkregen te beoordelen in vergelijking met de testresultaten die met de handmatige methode worden verkregen. De tests werden in 3 instellingen uitgevoerd, buiten QIAGEN, met patiëntsamples die in 5 afnamecentra waren afgenomen. De dataset bestond uit 1269 cervicale samples die na afname in PreservCyt-oplossing waren opgenomen en 1001 samples die in STM waren opgenomen.

De statistische overeenkomsten tussen gematchte samples die met RCS en handmatig waren getest, werden voor deze patiëntenpopulatie berekend (zie tabel 28 en 29 hieronder).

Tabel 28. Samenvatting van de overeenkomsten tussen RCS-geautomatiseerd testen en handmatig testen — STM-samples (n=1001)

Cytologische classificatie	HPV-prevalentie (%)	Positieve overeenkomst (%)		Negatieve overeenkomst (%)	
		(n/N) 95% BI		(n/N) 95% BI	
		Alle positieven	Sterk-positief gebied (RLE/CO > 2,5)	Alle negatieven	Sterk-negatief gebied (RLE/CO < 0,8)
BNL* < 30 jaar	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
BNL ≥ 30 jaar	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
ASCUS	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
Overige	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
Alle STM-samples	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

* BNL = binnen normaal-limieten.

Tabel 29. Samenvatting van de overeenkomsten tussen RCS-geautomatiseerd testen en handmatig testen — PreservCyt-samples (n=1.269)

Cytologische classificatie	HPV Prevalentie (%)	Positieve overeenkomst (%)		Negatieve overeenkomst (%)	
		(n/N) 95% BI		(n/N) 95% BI	
		Alle positieven	Sterk-positief gebied (RLE/CO > 2,5)	Alle negatieven	Sterk-negatief gebied (RLE/CO < 0,8)
BNL* ≥ 30 jaar	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
BNL ≥ 30 jaar	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
ASCUS	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
Overige cytologie	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
Alle PreservCyt-samples*	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

* BNL = binnen normaal-limieten.

† Cytologiegegevens van 4 patiënten niet beschikbaar

Er is een aanvullende klinische studie uitgevoerd met opgeslagen, overgebleven PreservCyt-samples die waren afgenomen bij een subpopulatie vrouwen van 30 jaar en ouder met een normale cytologie (zie tabel 30 hieronder), met een HPV-prevalentie van 4,8%.

Tabel 30. Samenvatting van de overeenkomsten tussen RCS-geautomatiseerd testen en handmatig testen — BNL-vrouwen van 30 jaar en ouder (n=2.077)

Positieve overeenkomst (%) (n/N) 95% BI		Negatieve overeenkomst (%) (n/N) 95% BI	
Alle positieven	Sterk-positief gebied (RLE/CO > 2,5)	Alle negatieven	Sterk-negatief gebied (RLE/CO < 0,8)
92.0	91.8	99.3	99.7
(92/100)	(78/85)	(1964/1977)	(1944/1949)
84.84–96.48	83.77–96.62	98.88–99.65	99.40–99.92

In 7 gevallen stemden de resultaten van RCS-geautomatiseerd testen en handmatig testen niet overeen voor het sterk-positieve gebied. De eerste resultaten van handmatig testen lagen voor deze 7 samples buiten het aanbevolen hertest-algoritme voor PreservCyt-samples; omdat de opzet van de studie echter vereiste dat alle samples in triplo werden getest, waren er resultaten van herhaalde tests beschikbaar voor het herstellen van deze discrepanties.

De gegevens van de herhaalde tests van alle 7 afwijkende samples wijzen erop dat al deze samples negatief zijn voor HPV-DNA (zie tabel 31 hieronder). Op basis van de negatieve resultaten die bij de herhaalde tests voor beide replica's werden verkregen, waren al deze, aanvankelijk positieve, resultaten van de handmatige tests waarschijnlijk fout-positief.

Tabel 31. Niet-overeenstemmende testresultaten van PreservCyt-samples voor BNL-vrouwen van 30 jaar en ouder (n=7)

Sample	Instelling	Handmatig testen (RLE/CO)			RCS-geautomatiseerd testen (RLE/CO)		
		Eerste test	Herhaling 1	Herhaling 2	Eerste test	Herhaling 1	Herhaling 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

De resultaten van deze klinische studie wijzen erop dat de resultaten van RCS-geautomatiseerd testen en handmatig testen, van STM-samples of PreservCyt-samples, over het geheel genomen met elkaar overeenstemmen.

Reproduceerbaarheid

Totale reproduceerbaarheid bij handmatig testen

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

De tests werden uitgevoerd door drie externe laboratoria, met *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test kits van dezelfde batch. De tests werden op 3 verschillende dagen uitgevoerd met een identiek reproduceerbaarheidspanel. Het reproduceerbaarheidspanel bestond uit de volgende samples:

- 12 pools van gedenatureerde, klinische STM-samples
- 3 pools van niet-gedenatureerde, klinische PreservCyt-samples
- Negatieve kalibrator
- Positieve hoogrisico HPV-kalibrator in concentraties van 0,5 pg/ml, 1 pg/ml, 2,5 pg/ml, 5 pg/ml en 10 pg/ml.

Alle onderdelen van het panel werden elke dag in triplo getest met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test. De resultaten wijzen erop dat de reproduceerbaarheid van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test met klinische samples zeer goed is (zie tabel 32 hieronder).

Tabel 32. Totale reproduceerbaarheid — multicenter-reproduceerbaarheid (alle runs bij alle instellingen)

Statistische maat	Resultaat
Verwachte positieven met een waargenomen positief resultaat	100.0% (99.0–100.0)
(95% BI)	99.0% (97.49–99.73)
Verwachte negatieven met een waargenomen negatief resultaat	99.5% (98.70–99.86)
(95% BI)	0.990

Reproduceerbaarheid met klinische STM-samples

Handmatig testen.

Er is een studie uitgevoerd om de reproduceerbaarheid te beoordelen van het handmatig testen van klinische STM-samples met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test. Er werd een panel van 20 klinische pools (10 positieve en 10 negatieve) samengesteld door eerder geteste STM-samples samen te voegen. De samples werden met 4 replica's getest, op 5 dagen, zodat er in totaal per sample 20 replica's werden getest. Het testen werd uitgevoerd met een gecombineerde probemix, bestaande uit de hoogrisico HPV-probe en een laagrisico HPV-probe. Het is niet te verwachten dat de reproduceerbaarheid van de test anders zal zijn wanneer alleen de probemix van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test wordt gebruikt. De gemiddelde RLE/CO en het 95% BI van het gemiddelde werden berekend (zie tabel 33 hieronder).

Tabel 33. Reproduceerbaarheid van het testen van STM-samples – handmatig testen (in volgorde van afnemende gemiddelde RLE/CO)

Sample-ID	Gemiddelde RLE/CO	95% BI	Positief testresultaat (%) (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)

Van de 5 samples met een gemiddelde RLE/CO van 20% of meer boven de grenswaarde waren 100 van 100 replica's (100,0%) positief. Van de 5 samples met een gemiddelde RLE/CO binnen 20% boven of onder de grenswaarde waren 60 van 100 replica's (60%, 95% BI = 49,7-69,6) positief en 40 van 100 (40%) negatief. Van de 10 samples met een gemiddelde RLE/CO van 20% of meer onder de grenswaarde waren 200 van 200 replica's (100%) negatief.

De resultaten wijzen erop dat samples met testresultaten die 20% of meer van de CO af liggen, naar verwachting consistente resultaten geven. Samples met een testresultaat dicht bij de CO gaven ongeveer evenveel positieve als negatieve resultaten. Deze gegevens laten zien dat het handmatig testen van STM-samples met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test reproduceerbare resultaten geeft.

RCS-geautomatiseerd testen.

Er is een studie uitgevoerd om de reproduceerbaarheid binnen een run, van dag tot dag, en tussen verschillende laboratoria te beoordelen van het RCS-geautomatiseerd testen van STM-samples met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test. Er werd een panel van 16 pools van klinische samples getest (zie tabel 34 hieronder), met reagentia van een enkele batch, tweemaal daags op 3 verschillende dagen. Elk onderdeel van het panel werd in viervoud getest.

Tabel 34. Reproduceerbaarheid van het testen van STM-samples – RCS-geautomatiseerd testen van een samengesteld panel

Panel-onderdeel	RLE/CO (benadering)	Verwachte testresultaat
1N	<0.4	Negatief
2N	0.4–0.8	Negatief
3P	0.8–1.2	Zwak-negatief/zwak-positief
4P	0.8–1.2	Zwak-negatief/zwak-positief
5P	0.8–1.2	Zwak-negatief/zwak-positief
6P	1.2–2.0	Zwak-positief
7P	1.2–2.0	Zwak-positief
8P	1.2–2.0	Zwak-positief
9P	2.0–5.0	Zwak-positief
10P	5.0–10.0	Middel-positief
11N	<0.4	Negatief
12N	<0.4	Negatief
13N	<0.4	Negatief
14XR	risico HPV DNA-positief klinisch materiaal in de negatieve STM-pool	Zwak-negatief/zwak-positief
15XR	risico HPV DNA-plasmid in de klinische negatieve STM-pool	Zwak-negatief/zwak-positief
16XR	vector-DNA-controle in de klinische negatieve pool	Zwak-negatief/zwak-positief

Er werden twee onderdelen (14XR en 15XR) in het panel opgenomen om het potentieel van kruishybridisatie te bepalen van de probemix van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test met samples die alleen de laagrisico-HPV-DNA-typen 6, 11, 42, 43 en 44 bevatten. Panel-onderdeel 16XR bestond uit pGEM®-DNA in een concentratie van 1,49 ng/ml en diende als een vectorcontrole voor panel-onderdeel 15XR. De resultaten van deze tests wezen niet op het voorkomen van fout-positieve testresultaten als gevolg van de aanwezigheid van laagrisico-HPV-DNA-typen in klinische samples. Deze resultaten zijn consistent met die bij handmatig testen.

De reproduceerbaarheid werd berekend volgens de methode die is beschreven door NCCLS E5-A (zie tabel 35 hieronder). In deze methode moeten de variantiecomponenten worden berekend voor elk van de bronnen van variabiliteit: laboratorium, dag, run en fout (gedefinieerd als inter-assay-variantie en variatie tussen assays).

Tabel 35. Reproduceerbaarheid van het testen van STM-samples – RCS-geautomatiseerd testen; kwantitatieve reproduceerbaarheid

Panel-onderdeel	n	Gemiddelde RLE/CO	Standaarddeviatie				Totale VC (%)	
			Binnen een run	Tussen runs	Tussen dagen	Tussen laboratoria		
1N	72	0.13	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	15.10
2N	72	0.36	0.03	0.01	0.03	0*	0.04	11.69
3P	72	0.96	0.06	0.06	0.04	0*	0.09	9.55
4P	72	1.03	0.06	0.18	0.06	0*	0.19	18.81
5P	72	1.41	0.11	0.14	0.15	0.06	0.24	17.00
6P	72	1.73	0.10	0.27	0*	0.11	0.31	18.10
7P	72	1.74	0.12	0.21	0*	0*	0.24	13.78
8P†	70	1.95	N/A‡	N/A‡	N/A‡	N/A‡	0.47	23.80
9P	72	5.21	0.34	0.44	0.21	0*	0.59	11.36
10P	72	7.67	0.46	0.63	0.71	0*	1.05	13.70
11N	72	0.13	0.01	0.01	0.01	0*	0.02	16.89
12N	72	0.17	0.03	0.06	0.03	0*	0.07	39.14
13N	72	0.15	0.02	0.02	0*	0.01	0.03	17.01

* Negatieve variantiecomponenten zijn gelijk aan nul gesteld.

† Twee ongeldige replica's van panel-onderdeel 8P maakten variantie-componentanalyse onmogelijk, vanwege de ongelijke grootte van de te vergelijken groepen.

‡ n.v.t.: variantie-analyse was niet mogelijk vanwege de aanwezigheid van minder replica's dan bij de andere panel-onderdelen.

Reproduceerbaarheid van het testen van klinische PreservCyt-samples

Handmatig testen

De reproduceerbaarheid van het handmatig testen van PreservCyt-samples met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test is bepaald in een studie met 24 modelsamples met verschillende HPV-DNA-concentraties. De samples bestonden uit PreservCyt-oplossing en witte bloedcellen, met en zonder bacteriën die HPV 16-plasmid bevatten.

De samples werden met 4 replica's getest, op 5 dagen, zodat er in totaal per sample 20 replica's werden getest. Op elk van de 5 dagen van de studie werd van elk sample 8 ml bereid volgens de gebruiksaanwijzing van de *digene* HC2 Sample Conversion kit, en deze samples werden vervolgens getest. Het gemiddelde en het 95% BI werden berekend (zie tabel 36 hieronder).

Tabel 36. Reproduceerbaarheid van het testen van PreservCyt-samples – handmatig testen met handmatige samplebereiding; kwalitatieve reproduceerbaarheid (in volgorde van afnemende gemiddelde RLE/CO)

Sample-ID	Gemiddelde RLE/CO	95% BI	Positief testresultaat (%) (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)

Van de 6 samples met een gemiddelde RLE/CO van 20% of meer boven de grenswaarde waren 114 van 120 replica's (95,0%) positief. Van de 7 samples met een gemiddelde RLE/CO binnen 20% boven of onder de grenswaarde waren 88 van 139 replica's (63,3%, 95% BI = 54,3-70,9) positief en 51 van 139 (36,7%) negatief. Van de 4 samples binnen 10% boven of onder de grenswaarde waren 41 van 79 replica's (51,9%) positief en 38 van de 79 (48,1%) negatief. Van de 11 samples met een gemiddelde RLE/CO van 20% of meer onder de grenswaarde waren 220 van 220 replica's (100%) negatief.

De resultaten wijzen erop dat samples met testresultaten die 20% of meer van de CO af liggen, naar verwachting consistente resultaten geven. Samples met een testresultaat dicht bij de CO gaven ongeveer evenveel positieve als negatieve resultaten. Deze gegevens laten zien dat het handmatig testen van PreservCyt-samples met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test reproduceerbare resultaten geeft.

RCS-geautomatiseerd testen met handmatige samplebereiding

Er is een intern onderzoek met RCS-geautomatiseerd testen uitgevoerd, waarbij klinische PreservCyt-samples werden gebruikt die voornamelijk waren afgenomen bij vrouwen met een ASCUS- of ernstiger cytologieresultaat (HPV-prevalentie 57%). De samples werden in 2 aliquots verdeeld; elke aliquot werd vervolgens afzonderlijk verwerkt met de *digene* HC2 Sample Conversion kit en in duplo getest met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test.

Net als bij andere kwalitatieve IVD-tests, is de variabiliteit van de resultaten die werden verkregen door het testen van klinische samples met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test, voornamelijk geassocieerd met één, of een combinatie, van de volgende factoren: sampleafname, samplebereiding en de testprocedure. Omdat de vergeleken testresultaten werden verkregen van hetzelfde klinische sample, is de variabiliteit als gevolg van verschillen in sampleafname in de opzet van dit onderzoek uitgesloten. De herhaalbaarheid van resultaten die worden verkregen met 2 afzonderlijk bereide aliquots van hetzelfde klinische sample (hieronder "tussen bereide aliquots" genoemd), geeft de variatie als gevolg van de combinatie van samplebereiding en testprocedure weer. De herhaalbaarheid van resultaten die worden verkregen met hetzelfde aliquot van een sample (hieronder "binnen een bereid aliquot" genoemd), geeft de variatie van alleen de testprocedure weer (zie tabel 37 hieronder).

Tabel 37. Reproduceerbaarheid van het testen van PreservCyt-samples – RCS-geautomatiseerd testen met handmatige samplebereiding; kwalitatieve reproduceerbaarheid

Analyse	Positieve overeenkomst (%)	Negatieve overeenkomst (%)	Totaal Overeenstemming (%)	
	(n/N) 95% BI	(n/N) 95% BI	(n/N) 95% BI	
Binnen een bereid aliquot	Alle gegevens	99.62 (261/262) 97.9–100.0	94.7 (160/169) 90.1–97.5	97.7 (421/431) 95.8–98.9
	Sterk-positieve en sterk-negatieve gebieden	100.0 (249/249) 98.5–100.0	98.2 (160/163) 94.7–99.6	99.3 (409/412) 97.9–99.9
	Alle gegevens	99.6 (264/265) 97.9–100.0	98.2 (163/166) 94.8–99.6	99.1 (427/431) 97.6–99.8
Tussen bereide aliquots	Sterk-positieve en sterk-negatieve gebieden	100.0 (249/249) 98.5–100.0	99.4 (161/162) 96.6–100.0	99.8 (410/411) 98.7–100.0

An additional study was performed to evaluate the quantitative reproducibility of results obtained. Er werd een aanvullende studie uitgevoerd om de kwantitatieve reproduceerbaarheid te beoordelen van resultaten die werden verkregen met het RCS-geautomatiseerd testen van gesimuleerde PreservCyt-samples. Er deden drie testinstellingen, waaronder QIAGEN, aan de studie mee.

Elk onderzoekslaboratorium voerde de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test zowel RCS-geautomatiseerd als handmatig uit, tweemaal per dag op 5 verschillende dagen, met een verstrekt 6-delig reproduceerbaarheidspaneel. Elk paneel-onderdeel was samengesteld uit gekweekte cellen die waren toegevoegd aan PreservCyt-oplossing, in een hoeveelheid die ongeveer een bepaalde RLE/CO-waarde moest geven (zie tabel 38 hieronder).

De HPV-DNA-positieve paneel-onderdelen werden bereid door verschillende hoeveelheden HPV-DNA-positieve SiHa-cellen (van een laboratorium-cellijn) toe te voegen. Het negatieve paneel-onderdeel werd samengesteld met HPV-negatieve Jurkat-cellen (van een andere laboratorium-cellijn). De uiteindelijke celconcentratie bedroeg voor alle 6 paneel-onderdelen ongeveer 5×10^4 cellen/ml.

Tabel 38. Reproduceerbaarheid van het testen van PreservCyt-samples – RCS-geautomatiseerd testen met handmatige samplebereiding; kwantitatieve reproduceerbaarheid van panel-onderdelen

Panel-onderdeel	Celtype	RLE/CO (benadering)	Verwachte resultaat
1N	Jurkat	<1.0	Negatief
2N	Jurkat	<1.0	Negatief
3P	SiHa en Jurkat	5.0–8.0	Zwak-positief
4P	SiHa en Jurkat	5.0–8.0	Zwak-positief
5P	SiHa	30.0–50.0	Middel-positief
6P	SiHa	200.0	Sterk-positief

De reproduceerbaarheid werd berekend volgens de methode die is beschreven door NCCLS E5-A (zie tabel 39 hieronder). In deze methode moeten de variantiecomponenten worden berekend voor elk van de bronnen van variabiliteit: laboratorium, dag, run en fout (gedefinieerd als inter-assay-variantie en variantie tussen assays). Elk van de 6 panel-onderdelen werd in viervoud getest in elk van de 10 runs (2 runs per dag, gedurende 5 testdagen), in elk van de 3 testlaboratoria.

Tabel 39. Reproduceerbaarheid van het testen van PreservCyt-samples – RCS-geautomatiseerd testen met handmatige samplebereiding; kwantitatieve reproduceerbaarheid

Panel-onderdeel	n	Gemiddelde RLE/CO	Standaarddeviatie				Totaal	Totale VC (%)
			Binnen een run	Tussen runs	Tussen dagen	Tussen laboratoria		
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

* Negatieve variantiecomponenten zijn gelijk aan nul gesteld.

Als aanvulling op deze eerste reproduceerbaarheidsstudie met gegevens die heel dicht bij de grenswaarde van de assay lagen, is nog een reproduceerbaarheidsstudie uitgevoerd met gebruik van RCS, in een instelling buiten QIAGEN.

Het panel bestond uit 1 negatieve, 2 negatieve of zwak-positieve, en 2 zwak-positieve onderdelen. Elk onderdeel was bereid door zoveel gekweekte Jurkat- en SiHa-cellen toe te

voegen aan PreservCyt-oplossing, dat de beoogde RLE/CO-waarden werden verkregen (zie tabel 40 hieronder).

De externe instelling voerde het RCS-geautomatiseerd testen voor elke testrun uit met reagentia van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test van één batch. De tests werden 2 maal per dag op 3 verschillende dagen uitgevoerd met een verstrekt panel van 5 gesimuleerde PreservCyt-samples. Elk panel-onderdeel werd in 4 samples verdeeld en alle 4 samples werden op dezelfde microtiterplaat getest (zie tabel 41 hieronder).

Tabel 40. Reproduceerbaarheid van het testen van PreservCyt-samples – RCS-geautomatiseerd testen met handmatige samplebereiding; kwantitatieve reproduceerbaarheid van panel-onderdelen dicht bij de CO van de assay

Panel-onderdeel	RLE/CO (benadering)	Verwachte resultaat
1N	0.2	Negatief
2N	0.8–1.2	Zwak-negatief/zwak-positief
3P	0.8–1.2	Zwak-negatief/zwak-positief
4P	1.2–2.0	Zwak-positief
5P	1.2–2.0	Zwak-positief

Tabel 41. Reproduceerbaarheid van het testen van PreservCyt-samples – RCS-geautomatiseerd testen met handmatige samplebereiding; kwantitatieve reproduceerbaarheid dicht bij de CO van de assay

Panel-onderdeel	n	Gemiddelde RLE/CO	Standaarddeviatie				Tootal CV (%)
			Binnen een run	Tussen runs	Tussen dagen	Totaal	
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

* Negatieve variantiecomponenten zijn gelijk aan nul gesteld.

Samplebereiding met de QIASymphony DSP HPV Media kit.

Er is intern onderzoek naar samplebereiding met de QIASymphony DSP HPV Media kit uitgevoerd waarbij klinische PreservCyt-samples werden gebruikt die waren afgenomen van vrouwen met een of twee van de volgende cytologieresultaten:

- ASCUS of ernstiger dan ASCUS
- negatief voor intra-epitheliale laesie of maligniteit (NILM)

Van elk sample werden twee samples genomen. Elk sample werd afzonderlijk bereid met de QIASymphony DSP HPV Media kit en de resultaten werden bepaald door deze RCS-geautomatiseerd te testen met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test.

Net als bij andere kwalitatieve IVD-tests, is de variabiliteit van de resultaten die werden verkregen door het testen van klinische samples met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test, voornamelijk geassocieerd met één, of een combinatie, van de volgende factoren: sampleafname, samplebereiding en de testprocedure. Omdat de vergeleken testresultaten werden verkregen van hetzelfde klinische sample ("tussen samples" genoemd), is de variabiliteit als gevolg van verschillen in sampleafname in de opzet van dit onderzoek uitgesloten. De reproduceerbaarheid van de resultaten (zie tabel 42 hieronder) die werden verkregen met 2 afzonderlijk bereide samples van hetzelfde klinische sample geeft de variatie als gevolg van de samplebereiding en de testprocedure weer.

Tabel 42. Reproduceerbaarheid van PreservCyt-samples — samplebereiding met de QIASymphony DSP HPV Media kit; kwalitatieve reproduceerbaarheid tussen samples

Positieve overeenkomst (%)	Negatieve overeenkomst (%)	Totale overeenkomst (%)
(n/N)	(n/N)	(n/N)
95% BI	95% BI	95% BI
99.0	96.4	97.3
(95/96)	(161/167)	(256/263)
94.3–99.8	92.4–98.3	94.6–98.7

Er werd een aanvullend onderzoek uitgevoerd om de reproduceerbaarheid van de resultaten te beoordelen met behulp van gesimuleerde PreservCyt-samples. Samplebereiding met de QIASymphony DSP HPV Media kit werd gevolgd door RCS-geautomatiseerd testen met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test. De 8 positieve panel-onderdelen werden bereid door HPV DNA-positieve SiHa- of HeLa-cellen toe te voegen aan HPV DNA-negatieve C-33 A-cellen in de PreservCyt-oplossing, terwijl de 2 HPV DNA-negatieve panel-onderdelen alleen HPV DNA-negatieve C-33 A-cellen bevatten.

Drie verschillende gebruikers voerden de test uit op één dag met drie verschillende QIAAsymphony SP-instrumenten en drie verschillende QIAAsymphony DSP HPV Media kitbatches met panel-onderdelen 2N, 3E, 5P, 7P en 9P. Panel-onderdelen 2N, 3E, 5P en 7P werden getest met 18 replica's in 3 verschillende runs, waardoor 54 datapunten voor elk panel-onderdeel werden verkregen. Panel-onderdeel 9P werd getest met 16 replica's in 3 verschillende runs, waardoor 48 datapunten werden verkregen.

Een gebruiker voerde de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test uit op drie verschillende dagen met drie verschillende QIAAsymphony SP-instrumenten en één QIAAsymphony DSP HPV Media kitbatch met panel-onderdelen 1N, 4E, 6P, 8P en 10P. Panel-onderdelen 1N, 4E, 6P en 8P werden getest met 18 replica's in 8 verschillende runs, waardoor 144 datapunten voor elk panel-onderdeel werden verkregen. Panel-onderdeel 10P werd getest met 16 replica's in 8 verschillende runs, waardoor 128 datapunten werden verkregen.

Van de panel-onderdelen met een gemiddelde RLE/CO van 20% of meer boven de CO, waren er 572 van de 572 (100,0%) positief. Van de panel-onderdelen met een gemiddelde RLE/CO binnen 20% boven of onder de CO, waren er 98 van de 198 (49,5%) positief en 100 van de 198 (50,5%) negatief. Van de panel-onderdelen met een gemiddelde RLE/CO van 20% of meer onder de CO, waren er 198 van de 198 (100,0%) negatief (zie tabel 44 hieronder).

Tabel 43. Reproduceerbaarheid van PreservCyt-samples — samplebereiding met de QIAAsymphony DSP HPV Media kit; kwalitatieve reproduceerbaarheid

Panel-onderdeel	Celltype	Gemiddelde RLE/CO	Standaarddeviatie	Positief testresultaat (%) (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 en C-33 A	0.81	0.11	6 (3/54)
4E	SiHa en C-33 A	1.09	0.18	66 (95/144)
5P	HeLa en C-33 A	3.17	0.46	100 (54/54)
6P	SiHa en C-33 A	4.81	0.74	100 (144/144)
7P	HeLa en C-33 A	6.77	0.97	100 (54/54)
8P	SiHa en C-33 A	9.41	1.39	100 (144/144)
9P	HeLa en C-33 A	13.72	2.81	100 (48/48)
10P	SiHa en C-33 A	28.13	5.08	100 (128/128)

De resultaten wijzen erop dat samples met testresultaten die 20% of meer van de CO af liggen, naar verwachting consistente resultaten geven. Samples met een testresultaat dicht bij de CO gaven ongeveer evenveel positieve als negatieve resultaten. Deze gegevens laten zien dat

samplebereiding van PreservCyt-samples met de QIAAsymphony DSP HPV Media kit, gevolgd door testen met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test, reproduceerbare resultaten geeft.

De resultaten van het interne onderzoek zijn ook gebruikt om de kwantitatieve reproduceerbaarheid te beoordelen van resultaten die zijn verkregen met de samplebereiding van PreservCyt-samples met de QIAAsymphony DSP HPV Media kit (zie tabel 44 en 45 hieronder)

Tabel 44. Reproduceerbaarheid van PreservCyt-samples – samplebereiding met de QIAAsymphony DSP HPV Media kit; kwalitatieve reproduceerbaarheid met dezelfde gebruiker

Panel-onderdeel	n	Gemiddelde RLE/CO	Standaarddeviatie			Geschatte totale standaardafwijking	Geschatte totale VC (%)
			Binnen runs	Tussen runs	Tussen combinaties*		
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

* Tussen combinaties van QIAAsymphony SP-instrumenten en verschillende dagen.

Tabel 45. Reproduceerbaarheid van PreservCyt-samples – samplebereiding met de QIAAsymphony DSP HPV Media kit; kwalitatieve reproduceerbaarheid op dezelfde dag

Panel member	n	Mean RLU/CO	Standard deviation		Estimated total standard deviation	Estimated total CV (%)
			Within runs	Between runs [†]		
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

[†] Een run bestaat uit een combinatie van een QIAAsymphony DSP HPV Media kit, een QIAAsymphony SP-instrument en een gebruiker.

De kwantitatieve reproduceerbaarheid is zeer hoog aangezien alle VC-waarden onder 25% blijven. Standaardafwijking tussen runs zijn vergelijkbaar met de bijbehorende waarde binnen runs, wat overeenkomt met consistente resultaten ongeacht het instrument of de kitbatch die werd gebruikt.

Samplebereiding met de QIA Symphony DSP AXpH DNA kit.

Er is intern onderzoek naar samplebereiding met de QIA Symphony DSP AXpH DNA kit uitgevoerd waarbij klinische PreservCyt-samples werden gebruikt die waren afgenomen van vrouwen met een ASCUS- of NILM-cytologie: Van elk sample werden twee samples genomen. Elk sample werd afzonderlijk bereid met de QIA Symphony DSP AXpH DNA kit en de resultaten werden bepaald door deze RCS-geautomatiseerd te testen met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test.

Net als bij andere kwalitatieve IVD-tests, is de variabiliteit van de resultaten die werden verkregen door het testen van klinische samples met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test, voornamelijk geassocieerd met één, of een combinatie, van de volgende factoren: sampleafname, samplebereiding en de testprocedure. Omdat de vergeleken testresultaten werden verkregen van hetzelfde klinische sample ("tussen samples" genoemd), is de variabiliteit als gevolg van verschillen in sampleafname in de opzet van dit onderzoek uitgesloten. De reproduceerbaarheid van de resultaten (zie tabel 46 hieronder) die werden verkregen met 2 afzonderlijk bereide samples van hetzelfde klinische sample geeft de variatie als gevolg van de samplebereiding en de testprocedure weer.

Tabel 46. Reproduceerbaarheid van PreservCyt-samples – samplebereiding met de QIA Symphony DSP AXpH DNA kit; kwalitatieve reproduceerbaarheid tussen samples

Positieve overeenkomst (%)	Negatieve overeenkomst (%)	Totale overeenkomst (%)
(n/N)	(n/N)	(n/N)
95% BI	95% BI	95% BI
95.3	96.7	96.2
(101/106)	(176/182)	(277/288)
89.4–98.0	92.3–98.5	93.3–97.9

Er werd een aanvullend onderzoek uitgevoerd om de reproduceerbaarheid van de resultaten te beoordelen met behulp van gesimuleerde PreservCyt-samples. Samplebereiding met de QIA Symphony DSP AXpH DNA kit werd gevolgd door RCS-geautomatiseerd testen met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test.

Drie verschillende gebruikers voerden de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test uit op verschillende dagen, met verschillende instrumenten en verschillende batches van de reagentia, met een panel dat bestond uit 9 onderdelen. Elk panel-onderdeel werd in duplo getest in 24 verschillende runs, zodat van elk panel-onderdeel 48 datapunten werden verkregen. De 8 positieve panel-onderdelen werden bereid door HPV DNA-positieve SiHa- of HeLa-cellen toe te

voegen aan HPV DNA-negatieve H9-cellen in de PreservCyt-oplossing, terwijl het HPV DNA-negatieve panel-onderdeel alleen HPV DNA-negatieve H9-cellen bevatte.

Van de panel-onderdelen met een gemiddelde RLE/CO van 20% of meer boven de CO, waren er 237 van de 240 (98,8%) positief. Van de panel-onderdelen met een gemiddelde RLE/CO binnen 20% boven of onder de CO, waren er 95 van de 144 (66,0%) positief en 49 van de 144 (34,0%) negatief. Van de panel-onderdelen met een gemiddelde RLE/CO van 20% of meer onder de CO, waren er 48 van de 48 (100,0%) negatief (zie tabel 47 hieronder).

Tabel 47. Reproduceerbaarheid van PreservCyt-samples – samplebereiding met de QIAAsymphony DSP AXpH DNA kit; kwalitatieve reproduceerbaarheid

Panel-onderdeel	Celtype	Gemiddelde RLE/CO	Standaarddeviatie	Positief testresultaat (%) (n/N)
1N	H9	0.17	0.03	0 (0/48)
2E	H9 en HeLa	1.00	0.16	56 (27/48)
3E	H9 en HeLa	1.16	0.57	54 (26/48)
4E	H9 en SiHa	1.18	0.23	88 (42/48)
5P	H9 en SiHa	1.89	0.20	100 (48/48)
6P	H9 en HeLa	2.05	0.43	96 (46/48)
7P	H9 en SiHa	2.97	0.45	100 (48/48)
8P	H9 en HeLa	5.67	0.61	100 (48/48)
9P	H9 en SiHa	9.91	1.63	98 (47/48)

De resultaten wijzen erop dat samples met testresultaten die 20% of meer van de CO af liggen, naar verwachting consistente resultaten geven. Samples met een testresultaat dicht bij de CO gaven ongeveer evenveel positieve als negatieve resultaten. Deze gegevens laten zien dat samplebereiding van PreservCyt-samples met de QIAAsymphony DSP AXpH DNA kit, gevolgd door testen met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test, reproduceerbare resultaten geeft.

De resultaten van het interne onderzoek zijn ook gebruikt om de kwantitatieve reproduceerbaarheid te beoordelen van resultaten die zijn verkregen met de samplebereiding van PreservCyt-samples met de QIAAsymphony DSP AXpH DNA kit (zie tabel 48 hieronder).

Tabel 48. Reproduceerbaarheid van PreservCyt-samples — samplebereiding met de QIAasymphony DSP AXpH DNA kit; kwalitatieve reproduceerbaarheid

Panel- onderdeel	n	Gemiddelde RLE/CO	Standaarddeviatie			Geschatte totale standaardafwijking	Geschatte totale VC (%)
			Binnen runs	Tussen runs	Tussen combinaties*		
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

*Tussen combinaties van *digene* HC2 High-Risk HPV DNA testkits, QIAasymphony DSP AXpH DNA kits, gebruikte RCS, gebruikte QIAasymphony SP en gebruiker.

Reproduceerbaarheid van het testen van klinische SurePath-samples

Handmatig testen

De reproduceerbaarheid van het handmatig testen van SurePath postgradiënt-celpelletsamples met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-test is bepaald in een studie met 3 verschillende laboratoria. De panel-onderdelen werden getest met gebruik van een CO van 1,0 RLE/CO, op verschillende dagen en in verschillende runs, met een identieke set panel-onderdelen met bekende positieve of negatieve HPV-status. Het panel bestond uit 5 positieve, 2 hoog-negatieve/laag-positieve en 5 negatieve samples.

Elk panel-onderdeel werd bereid door unieke klinische samples, die na afname waren opgenomen in SurePath-conserveervloeistof en waarvan de negatieve of positieve HPV-status bekend was, zodanig te combineren dat de gewenste, beoogde RLE/CO-waarden werden verkregen. Elk panel-onderdeel werd in duplo getest, tweemaal per dag gedurende 5 dagen, in elk van de 3 deelnemende laboratoria (zie tabel 49 hieronder).

Tabel 49. Reproduceerbaarheid van het testen van SurePath postgradiënt-celpeletsamples — handmatig testen; kwalitatieve reproduceerbaarheid

Panel-onderdeel	Gemiddelde RLE/CO	Positief testresultaat (%) (n/N)
1	0.20	0.0 (0/60)
2	0.21	0.0 (0/60)
3	0.22	0.0 (0/60)
4	0.28	3.3 (2/60)
5	0.36	3.3 (2/60)
6	0.83	21.7 (13/60)
7	1.17	43.3 (26/60)
8	19.47	100.0 (60/60)
9	25.65	100.0 (60/60)
10	81.52	100.0 (60/60)
11	154.18	100.0 (60/60)
12	765.29	100.0 (60/60)

RCS-geautomatiseerd testen

De reproduceerbaarheid van de resultaten van het RCS-geautomatiseerd testen van SurePath postgradiënt-celpeletsamples werd vergeleken met de resultaten die werden verkregen met handmatig testen. Er werden twee afzonderlijke aliquots van dezelfde verwerkte SurePath postgradiënt-celpeletsample (van dezelfde sample) getest (zie tabel 50 hieronder).

Tabel 50. Reproduceerbaarheid van het testen van SurePath postgradiënt-celpeletsamples — RCS-geautomatiseerd testen; overeenkomsten van resultaten verkregen met RCS-geautomatiseerd testen en met handmatig testen

Positieve overeenkomst (%) (n/N) 95% BI		Negatieve overeenkomst (%) (n/N) 95% BI	
Alle positieven	Sterk-positief gebied (RLE/CO \geq 2,5)	Alle negatieven	Sterk-negatief gebied (RLE/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

Samplebereiding van SurePath-samples met de QIASymphony DSP HPV Media Kit

Er werd een onderzoek uitgevoerd om de reproduceerbaarheid van de resultaten te beoordelen met behulp van gesimuleerde SurePath-samples. Samplebereiding met de QIASymphony DSP HPV

Media kit werd gevolgd door RCS-geautomatiseerd testen met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test. De 4 positieve panel-onderdelen werden bereid door HPV DNA-positieve SiHa-cellen toe te voegen aan HPV DNA-negatieve H9-cellen in de SurePath-conserveervloeistof, terwijl het HPV DNA-negatieve panel-onderdeel alleen HPV DNA-negatieve H9-cellen in de SurePath-conserveervloeistof bevatte.

Drie verschillende gebruikers voerden de tests uit op 6 verschillende dagen met 3 verschillende QIASymphony SP-instrumenten en 3 verschillende QIASymphony DSP HPV Media kitbatches met panel-onderdelen 1N, 2E, 3P, 4P en 5P. Panel-onderdelen 1N, 2E, 3P en 4P werden getest met 18 replica's in 37 verschillende runs, waardoor 666 datapunten werden verkregen voor panel-onderdelen 2E en 3P en 665 datapunten voor panel-onderdelen 1N en 4P. Panel-onderdeel 5P werd getest met 16 replica's in 37 verschillende runs, waardoor 590 datapunten werden verkregen. Vier datapunten werden uitgesloten vanwege onvoldoende volume zoals gedetecteerd door de QIASymphony SP tijdens de samplebereiding.

Van de panel-onderdelen met een gemiddelde RLE/CO van 20% of meer boven de CO, waren er 1921 van de 1921 (100,0%) positief. Van de panel-onderdelen met een gemiddelde RLE/CO binnen 20% boven of onder de CO, waren er 410 van de 666 (61,6%) positief en 256 van de 666 (38,4%) negatief. Van de panel-onderdelen met een gemiddelde RLE/CO van 20% of meer onder de CO, waren er 664 van de 665 (99,8%) negatief (zie tabel 51 hieronder).

Tabel 51. Reproduceerbaarheid van SurePath-samples – samplebereiding met de QIASymphony DSP HPV Media kit; kwalitatieve reproduceerbaarheid

Panel-onderdeel	Celtype	Gemiddelde RLE/CO	Standaarddeviatie	Positief testresultaat (%) (n/N)
1N	H-9	0.38	0.06	0.2 (1/665)
2E	SiHa en H-9	1.06	0.17	61.6 (410/666)
3P	SiHa en H-9	4.51	0.78	100.0 (666/666)
4P	SiHa en H-9	8.34	1.57	100.0 (665/665)
5P	SiHa en H-9	24.69	5.12	100.0 (590/590)

De resultaten wijzen erop dat SurePath-samples met testresultaten die 20% of meer van de CO af liggen, naar verwachting consistente resultaten geven. SurePath-samples met een testresultaat dicht bij de CO gaven ongeveer evenveel positieve als negatieve resultaten.. Deze gegevens laten zien dat samplebereiding van SurePath-samples met de QIASymphony DSP HPV Media kit, gevolgd door testen met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test, reproduceerbare resultaten geeft.

De resultaten van het interne onderzoek zijn ook gebruikt om de kwantitatieve reproduceerbaarheid te beoordelen van resultaten die zijn verkregen met de samplebereiding van SurePath-samples met de QIASymphony DSP HPV Media kit (zie tabel 51 hieronder).

Drie verschillende gebruikers voerden de tests uit op 6 verschillende dagen met 3 verschillende QIASymphony SP-instrumenten en 3 verschillende QIASymphony DSP HPV Media kitbatches met panel-onderdelen 1N, 2E, 3P, 4P en 5P. Panel-onderdelen 1N, 2E, 3P en 4P werden getest met 18 replica's, waardoor 162 datapunten voor elk panel-onderdeel werden verkregen. Panel-onderdeel 5P werd getest met 16 replica's, waardoor 144 datapunten werden verkregen (zie tabel 52 hieronder).

Tabel 52. Reproduceerbaarheid van SurePath-samples – samplebereiding met de QIASymphony DSP HPV Media kit; kwalitatieve reproduceerbaarheid

Panel-onderdeel	n	Gemiddelde RLE/CO	Standaarddeviatie			Geschatte totale standaardafwijking	Geschatte totale VC (%)
			Binnen runs	Tussen dagen	Tussen combinaties*		
1N	162	0.37	0.06	0.02	0.03	0.07	19.18
2E	162	1.05	0.14	0.07	0.10	0.18	17.41
3P	162	4.40	0.62	0.00	0.43	0.75	17.09
4P	162	8.24	1.15	1.01	1.34	1.77	21.42
5P	144	23.89	3.95	4.10	4.67	6.11	25.59

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

De kwantitatieve reproduceerbaarheid is zeer hoog aangezien alle VC-waarden onder 26% blijven. Standaardafwijking tussen runs zijn vergelijkbaar met de bijbehorende waarde binnen runs, wat overeenkomt met consistente resultaten ongeacht het instrument of de kitbatch die werd gebruikt.

Samplebereiding van SurePath postgradiënt-celpelletsamples met de QIASymphony DSP HPV Media Kit

Er werd een studie uitgevoerd om de reproduceerbaarheid te beoordelen van resultaten die werden verkregen met behulp van gesimuleerde SurePath postgradiënt-celpelletsamples. Na de samplebereiding met de QIASymphony DSP HPV Media Kit vond RCS-geautomatiseerd testen plaats met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-test. Voor het nabootsen van SurePath postgradiënt-celpelletsamples werd celweekmateriaal in 70% SurePath-conserveervloeistof gebruikt. De 4 positieve panel-onderdelen waren bereid door HPV-DNA-positieve SiHa-cellen toe te voegen aan HPV-DNA-negatieve H-9-cellen in SurePath-conserveervloeistof, terwijl het HPV-

DNA-negatieve panel-onderdeel uitsluitend HPV-DNA-negatieve H-9-cellen in SurePath-conserveervloeistof bevatte.

Vier verschillende gebruikers deden de tests op 6 verschillende dagen met behulp van 3 verschillende QIASymphony SP-apparaten en 3 verschillende QIASymphony DSP HPV Media Kit-lots met panel-onderdelen 1, 2, 3, 4 en 5. De panel-onderdelen 1, 2, 3 en 4 werden getest met 18 replica's over 37 verschillende runs, wat 666 datapunten voor de panel-onderdelen 1 en 3, en 665 datapunten voor de panel-onderdelen 2 en 4 opleverde. Twee datapunten werden uitgesloten vanwege onvoldoende volume, zoals aangegeven door de QIASymphony SP tijdens het bereiden van de samples. Panel-onderdeel 5 werd getest met 16 replica's over 37 verschillende runs, wat 592 datapunten opleverde.

Van de panel-onderdelen met een gemiddelde RLE/CO van 20% of meer boven de CO, waren er 1923 van de 1923 (100,0%) positief. Van de panel-onderdelen met een gemiddelde RLE/CO binnen 20% boven of onder de CO waren er 416 van de 665 (62,6%) positief en 249 van de 665 (37,4%) negatief. Van de panel-onderdelen met een gemiddelde RLE/CO van 20% of meer onder de CO waren er 666 van de 666 (100%) negatief (zie tabel 53 hieronder).

Tabel 53. Reproduceerbaarheid van SurePath postgradiënt-cel pelletsamples – samplebereiding met behulp van de QIASymphony DSP HPV Media Kit; kwalitatieve reproduceerbaarheid

Panel-onderdeel	Celtype	Gemiddelde RLE/CO	Standaarddeviatie	VC (%)	Positief testresultaat (%) (n/N)
1	H-9	0.12	0.02	18.77	0.0 (0/666)
2	SiHa en H-9	0.96	0.11	11.15	62.6 (416/665)
3	SiHa en H-9	4.72	0.56	11.89	100.0 (666/666)
4	SiHa en H-9	9.34	0.98	10.46	100.0 (665/665)
5	SiHa en H-9	24.9	3.37	13.55	100.0 (592/592)

De resultaten wijzen erop dat SurePath postgradiënt-cel pelletsamples met testresultaten die 20% of meer van de CO af liggen, naar verwachting consistente resultaten geven. SurePath postgradiënt-cel pelletsamples met een testresultaat dicht bij de CO gaven ongeveer evenveel positieve als negatieve resultaten. Deze gegevens laten zien dat samplebereiding van SurePath postgradiënt-cel pelletsamples met behulp van de QIASymphony DSP HPV Media Kit gevolgd door testen met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-test reproduceerbare resultaten oplevert.

De resultaten van de interne studie zijn ook gebruikt om de kwantitatieve reproduceerbaarheid te beoordelen van resultaten die zijn verkregen met samplebereiding van SurePath postgradiënt-cel pelletsamples met behulp van de QIASymphony DSP HPV Media Kit.

Vier verschillende gebruikers deden de tests op 6 verschillende dagen met behulp van 3 verschillende QIASymphony SP-apparaten en 3 verschillende QIASymphony DSP HPV Media Kit-lots met panel-onderdelen 1, 2, 3, 4 en 5. De panel-onderdelen 1, 2, 3 en 4 werden getest met 18 replica's, wat 162 datapunten voor elk panel-onderdeel opleverde. Panel-onderdeel 5 werd getest met 16 replica's, wat 144 datapunten opleverde (zie tabel 54 hieronder).

Tabel 54. Reproduceerbaarheid van SurePath postgradiënt-celpletsamples – samplebereiding met behulp van de QIASymphony DSP HPV Media Kit; kwantitatieve reproduceerbaarheid

Panel-onderdeel	n	Gemiddelde RLE/CO	Standaarddeviatie			Geschatte totale standaardafwijking	Geschatte totale VC (%)
			Binnen runs	Tussen dagen	Tussen combinaties*		
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

* Tussen combinaties van verschillende dagen, gebruikers, QIASymphony DSP HPV Media Kit-lots en QIASymphony SP-apparaten.

De kwantitatieve reproduceerbaarheid is zeer hoog aangezien alle VC-waarden onder 20% blijven. Standaardafwijkingen tussen runs zijn vergelijkbaar met de bijbehorende waarde binnen runs, wat op consistente resultaten wijst, ongeacht het gebruikte apparaat of kit-lot.

Kruisreactiviteit

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

De volgende bacteriën werden getest. Deze waren allemaal negatief in de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test:

- *Acinetobacter anitratus*
- *Acinetobacter lwoffii* (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* (Cowan strain)
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Streptococcus faecalis* (ATCC 14508)
- *Streptococcus pyogenes* (ATCC 27762)
- *Treponema pallidum*
- *Trichomonas vaginalis*
- *Ureaplasma urealyticum*

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

De volgende virus- of plasmid-DNA's en humane sera werden getest. Deze waren allemaal negatief in de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test:

- Adenovirus 2
- Cytomegalovirus
- Epstein-barrvirus
- HBsAg-positief serum
- Herpes simplex I
- Herpes simplex II
- Humaan immunodeficiëntievirus (hiv, RT-DNA)
- HPV-typen 1, 2, 3, 4, 5, 8, 13 en 30
- Simianvirus type 40 (SV40)

Het enige plasmide dat in de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test kruisreactiviteit vertoonde was pBR322. Kruisreactiviteit tussen pBR322 en de probemix is niet onverwacht, omdat het moeilijk is om al het vector-pBR322-DNA te verwijderen bij het isoleren van het HPV-insert. De aanwezigheid van sequenties die homologe zijn aan pBR322 is gerapporteerd bij humane genitale samples en in aanwezigheid van hoge concentraties van het bacterie-plasmide kunnen er fout-positieve resultaten worden verkregen. Uit 298 klinische samples die positief testten met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test bleek echter dat er geen positieve resultaten toe te schrijven waren aan pBR322 bij het testen met een pBR322-probe. De waarschijnlijkheid van een fout-positieve uitslag met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test als gevolg van homologe pBR322-sequenties in klinische samples lijkt derhalve laag te zijn.

Kruishybridisatie

Achttien verschillende HPV-typen (hoogrisico en laagrisico) werden getest met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test, in een concentratie van 4 ng/ml HPV-DNA. Alle geteste hoogrisico-HPV-typen waren positief. Dit onderzoek toonde ook aan dat er een geringe mate van kruishybridisatie optreedt tussen de HPV-typen 6 en 42 en de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test. Patiëntensamples met een hoge concentratie (4 ng/ml of hoger) HPV-type 6 of 42 kunnen fout-positief zijn in de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test. De klinische betekenis hiervan is dat patiënten met HPV-type 6 of 42, in een concentratie van 4 ng/ml of hoger, onnodig voor een colposcopie verwezen kunnen worden.

Daarnaast blijkt de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test kruisreactie te vertonen met HPV-typen 40, 53 en 66. Deze typen zijn zeldzaam en er is onvoldoende bewijs om de precieze correlatie vast te stellen tussen een infectie met deze typen en de ontwikkeling van hooggradige

pathologie (15). In de literatuur is ook beschreven dat soortgelijke als in deze test gebruikte complexe probes fout-positieve resultaten kunnen opleveren als gevolg van kruishybridisatie met de HPV-typen 11, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 of MM9 (35). Hoewel verscheidene van deze HPV-typen zeldzame of nieuwe typen zijn die niet vaak voorkomen bij hooggradige pathologie, kunnen patiënten met samples die hoge concentraties van deze HPV-DNA-typen bevatten onterecht voor een colposcopie worden verwezen.

Effect van bloed en andere stoffen op STM-samples

Het effect van bloed en andere potentieel storende, gedefinieerde of ongedefinieerde stoffen werd in de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test beoordeeld. Vol bloed, vaginale spray, antischimmelcrème en zaaddodende gel (middelen die vaak in cervicale samples kunnen worden aangetroffen) werden aan negatieve en positieve STM-samples (pools van klinische samples en niet-klinische samples) toegevoegd in concentraties die in cervicale samples kunnen voorkomen.

Bij geen van de vier middelen in welke concentratie ook, werden fout-positieve resultaten waargenomen. Bij klinische samples met een HPV-DNA-concentratie dicht bij de grenswaarde van de test (1 pg/ml) kon echter een fout-negatief resultaat gemeld worden indien er hoge concentraties antischimmelcrème of zaaddodende gel aanwezig waren. Het is echter zeer onwaarschijnlijk dat een klinisch sample vrijwel geheel uit een van deze stoffen zal bestaan, aangezien de cervix standaard gereinigd wordt voordat er samples voor een cervixuitstrijkje en voor een HPV-test worden afgenomen.

Effect van bloed en andere stoffen op PreservCyt-samples

Handmatige samplebereiding

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

Samplebereiding met de QIASymphony DSP HPV Media kit

De effecten van bloed en andere mogelijk storende stoffen in PreservCyt-samples werden beoordeeld met de QIASymphony DSP HPV Media kit voor samplebereiding en RCS-geautomatiseerd testen met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test. De effecten van de volgende potentieel storende stoffen werden getest:

- Antischimmelcrème
- Ontstekingsremmende crème
- Bloed
- Zaaddodende gel
- Vaginale spray
- Vrouwelijke deodoriserende zepillen
- Glijmiddel
- Zaaddodend middel

Elke stof werd toegevoegd aan negatieve en positieve klinische pools. Geen fout-positieve of fout-negatieve resultaten werden waargenomen met een van de stoffen in een concentratie die in cervixsamples kan worden aangetroffen. Bij klinische samples met een HPV-DNA-concentratie dicht bij de grenswaarde van de test kon echter een fout-negatief resultaat gemeld worden indien er hoge concentraties antischimmelcrème, vaginale gel of bloed aanwezig waren. Het is echter zeer onwaarschijnlijk dat een klinisch sample vrijwel geheel uit een van deze stoffen zal bestaan, aangezien de cervix standaard gereinigd wordt voordat er samples voor een cervixuitstrijkje en voor een HPV-test worden afgenomen.

Samplebereiding met de QIASymphony DSP AXpH DNA kit

Het effect van vol bloed in PreservCyt-samples werd beoordeeld door de QIASymphony DSP AXpH DNA kit voor samplebereiding en de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test voor testen. Zichtbaar bloederige klinische samples werden geselecteerd en getest met zowel de handmatige samplebereidingsmethode als de geautomatiseerde samplebereidingsmethode AXpH-samplebereidingsmethode met de QIASymphony DSP AXpH DNA kit. Uit een vergelijking van de resultaten van 238 samples bleek een totale overeenkomst van 94,12% en een McNemar's p-waarde van 0,2850, wat aangeeft dat er geen statistisch significant verschil in klinische prestaties is tussen de handmatige samplebereidingsmethode en de geautomatiseerde samplebereidingsmethode met de QIASymphony DSP AxPH DNA kit.

De effecten van de volgende potentieel storende stoffen werden getest:

- Vaginale spray
- Antischimmelcrème
- Zaaddodende gel
- Mononucleaire cellen uit perifere bloed (PBMC)
- Glijmiddel
- Intiem-spray
- Zaaddodend middel
- Magnetische deeltjes
- Top-elutievloeistof

Elke stof werd toegevoegd aan pools van positieve en negatieve cellen in concentraties die in cervicale samples kunnen worden gevonden of tijdens samplebereiding kunnen worden toegevoegd. Er werden bij geen van de stoffen en in geen enkele concentratie fout-positieve resultaten waargenomen. Er werden geen fout-negatieve resultaten gevonden, met uitzondering van zaaddodende gel. Neem geen PreservCyt-cervixsample af voor geautomatiseerde samplebereiding met de QIASymphony DSP AXpH DNA kit als zaaddodende gel aanwezig is.

Effect of blood and other substances on SurePath specimens

Samplebereiding van SurePath-samples met de QIASymphony DSP HPV Media Kit

De effecten van bloed en andere potentieel versturende stoffen in SurePath-samples werden beoordeeld met behulp van de QIASymphony DSP HPV Media Kit voor samplebereiding en RCS-geautomatiseerd testen met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-test.

De effecten van de volgende potentieel storende stoffen werden getest:

- Antischimmelcrème
- Ontstekingsremmende crème
- Bloed
- Zaaddodende gel
- Vaginale spray
- Vrouwelijke deodoriserende zepillen
- Glijmiddel
- Zaaddodend middel

Elke stof werd toegevoegd aan negatieve en positieve klinische pools. Geen fout-positieve resultaten werden waargenomen met een van de stoffen in een concentratie die in cervixsamples kan worden aangetroffen.

Er werden geen fout-negatieve resultaten gevonden, met uitzondering van de volgende stoffen:

- Zaaddodende gel veroorzaakte fout-negatieve resultaten in een zeer lage concentratie.
- Bij een hoge concentratie antischimmelcrème in het sample, kan een fout-negatief resultaat worden gemeld bij klinische samples met een HPV DNA-concentratie dicht bij de grenswaarde van de test. Het is echter zeer onwaarschijnlijk dat een klinisch sample vrijwel geheel uit een van deze stoffen zal bestaan, aangezien de cervix standaard gereinigd wordt voordat er samples voor een cervixuitstrijkje en voor een HPV-test worden afgenomen.

Neem geen SurePath cervixsample voor geautomatiseerde samplebereiding met de QIASymphony DSP HPV Media Kit als er antischimmelcrème of zaaddodende gel aanwezig is.

Samplebereiding van SurePath postgradiënt-celpletsamples met de QIASymphony DSP HPV Media Kit

De effecten van bloed en andere potentieel versturende stoffen in SurePath postgradiënt-celpletsamples werden beoordeeld met behulp van de QIASymphony DSP HPV Media Kit voor samplebereiding en RCS-geautomatiseerd testen met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-test.

De effecten van de volgende potentieel versturende stoffen werden getest:

- Antischimmelcrème
- Ontstekingsremmende crème
- Bloed
- Zaaddodende gel
- Vaginale spray
- Vrouwelijke deodoriserende zetpillen
- Glijmiddel
- Zaaddodend middel

Elke stof werd toegevoegd aan negatieve en positieve klinische pools die vervolgens werden verwerkt via het BD PrepMate System om een SurePath postgradiënt-celpletsample na te bootsen. Voor zowel boed als antischimmelcrème werd één fout-positief resultaat waargenomen; statistische analyse liet echter geen significante verstoring zien. Er werden geen fout-positieve resultaten waargenomen bij de andere stoffen in een concentratie die in cervixsamples aangetroffen kan worden.

Fout-negatieve resultaten werden waargenomen voor antischimmelcrème, ontstekingsremmende crème en zaaddodende gel. Neem geen SurePath cervixsample voor geautomatiseerde samplebereiding met de QIASymphony DSP HPV Media Kit als er antischimmelcrème, ontstekingsremmende crème of zaaddodende gel aanwezig is.

Carry-over

Het RCS is zodanig ontworpen dat contaminatie van samples of carry-over van overgebleven alkalische fosfatase tot een minimum wordt beperkt door het gebruik van wegwerp-pipettips voor het opzuigen van reagentia en samples. Om deze eigenschap van het ontwerp te bevestigen heeft QIAGEN een aantal studies uitgevoerd om te beoordelen of er bij het gebruik van het RCS een grotere kans is op carry-over of kruiscontaminatie van samples dan bij de handmatige bereidingsmethode. Meerdere RCS-instrumenten werden gebruikt om het potentieel voor carry-over van systeem tot systeem te beoordelen.

In één studie werden 2 ng en 20 ng HPV-DNA-plasmiden toegevoegd aan negatief controlemateriaal (NC) om sterk-positieve STM-samples te bereiden. De concentratie van 20 ng/ml geeft RLE-waarden die ongeveer 3-5 maal zo hoog zijn als de waarden die tijdens routinematig klinisch testen voor de hoogste positieve klinische samples worden verwacht. Deze gesimuleerde, sterk-positieve samples werden over wells van de hele microtiterplaat verdeeld in een schaakbordpatroon, en afgewisseld met wells met alleen de negatieve controle (testwells). In deze opzet worden de potentiële additieve effecten van opeenvolgende, sterk-positieve samples bekeken. De microtiterplaten werden vervolgens met zowel de handmatige als de RCS-geautomatiseerde testmethode getest. Na de verwerking werden de aantallen fout-positieve testwells vergeleken. Er werden met deze gesimuleerde STM-samples bij RCS-geautomatiseerd testen niet méér fout-positieve testwells gevonden dan bij handmatig testen, zelfs wanneer er een reeks extreem sterk-positieve samples op de microtiterplaat werd gebracht.

In een tweede beoordeling van carry-over werden HPV-positieve PreservCyt-samples van patiënten samengevoegd om een panel te maken van samples met verschillende chemiluminescentieniveaus, waarmee RLE/CO-waarden werden verkregen die representatief zijn voor het bereik dat tijdens klinisch, routinematig, RCS-geautomatiseerd testen wordt verwacht. De positieve samples hadden een RLE/CO-waarde die varieerde van ongeveer 200-1800. Om het potentieel voor carry-over te bepalen, inclusief de potentiële additieve effecten van opeenvolgende sterk-positieve samples, werden deze positieve panel-onderdelen op microtiterplaten geplaatst, in een schaakbordpatroon, afgewisseld met negatieve-controlewells. Deze platen werden vervolgens getest met de RCS-geautomatiseerde testmethode.

De resultaten van deze carry-over-beoordeling met gebruik van gepoolde patiëntsamples wijzen op een percentage fout-positieven van 0,3% als gevolg van carry-over-effecten, wanneer RCS-geautomatiseerd wordt getest met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test.

De ervaring van QIAGEN met het uitvoeren van tests met gepoolde PreservCyt-samples wijst erop dat het samenvoegen van PreservCyt-samples van patiënten, samples oplevert die niet dezelfde eigenschappen vertonen als de afzonderlijke patiëntsamples. Hoewel de effecten van dit samenvoegen op het potentieel voor carry-over bij RCS-geautomatiseerd testen onbekend zijn, wezen aanvullende preklinische tests met RCS-geautomatiseerd testen niet op een verhoogd potentieel voor fout-positieve resultaten als gevolg van carry-over. Voor deze beoordelingen werden artificiële plasmidensamples gebruikt, met DNA-concentraties die bijna 5 maal zo hoog waren als de concentraties die in de klinische setting worden waargenomen.

In een derde beoordeling van carry-over werden testsamples gemaakt door een fluorescerende kleurstof toe te voegen, in concentraties die representatief waren voor het dynamische RLE-bereik van de assay, aan achtergrondmatrices die de viscositeit van klinische samples benaderden, en de reagentia van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test. Deze testsamples werden vervolgens met 3 afzonderlijke RCS-instrumenten verwerkt, en het potentieel voor carry-over van elk van de volgende belangrijke procedurestappen van het RCS werd beoordeeld:

- Overbrenging van sample
- Overbrenging van plaat naar plaat
- Toevoeging van probe
- Schudden van de microtiterplaat
- Microtiterplaat wassen

De resulterende fluorescentie werd gemeten bij een excitatiegolflengte van 485 nm en een emissiegolflengte van 535 nm. Deze meting was voldoende sensitief om een voorval van carry-over in de orde van grootte van 1:20.000 te detecteren, wat overeen zou komen met een fout-positief resultaat met de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test (d.w.z. 1 pg op 20 ng). De resultaten van deze evaluatie toonden geen enkel voorval van carry-over aan tijdens de belangrijke procedurestappen van het RCS, dat zou leiden tot een fout-positief resultaat van de *digene* HC2 High-Risk HPV DNA test.

Stabiliteit van het reagens in het instrument

QIAGEN heeft de werkingseigenschappen beoordeeld van RCS-geautomatiseerd testen met gebruik van reagentia die gedurende langere perioden op het platform van het systeem bleven.

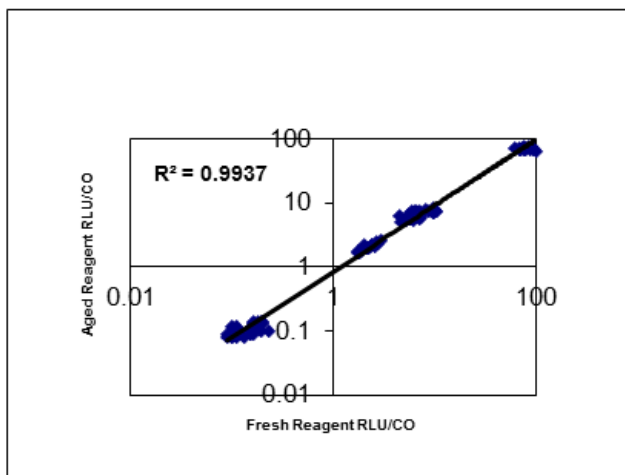
De reagentia die de grootste kans hebben om langere tijd in het systeem te blijven staan, zijn de probemix, DR1, DR2 en de capturing-microfiterplaat.

De prestaties van de test zijn zowel met vers bereide reagentia beoordeeld als met verouderde reagentia, die gedurende 16 uur bij kamertemperatuur in het RCS-instrument hadden gestaan (om 2 ploegendiensten in de laboratoriumsetting te simuleren). Er werden gesimuleerde klinische samples getest met 2 RCS-instrumenten, op 2 testdagen, met een gedefinieerde reagensmatrix (zie tabel 55 hieronder).

Tabel 55. Studie-opzet voor het testen van de stabiliteit van het reagens in het instrument

RCS-apparaat	Dag 1	Dag 2
1	Verouderde reagentia	Verse reagentia
2	Verse reagentia	Verouderde reagentia

Een plot van alle RLE/CO-datapunten wordt hieronder in afbeelding 3 weergegeven. De plot en de regressie-analyse voor verouderde versus verse reagentia geven overeenkomst aan tussen de verouderde en verse reagentia.



Afbeelding 3. Scatter-plot waarin de kalibrator- en controlewaarden van de assay bij gebruik van verouderde reagentia worden vergeleken met die bij gebruik van verse reagentia.

Verder onderzoek van de gevonden overeenkomst laat zien dat er geen kwalitatieve resultaten veranderden bij gebruik van verouderde reagentia (zie tabel 56 hieronder).

Tabel 56. Overeenkomst tussen gebruik van verse en verouderde reagentia

Statistische maat	Resultaat
Totale overeenkomst (%)	100.0% (96/96) 97.97–100.0
(n/N)	100.0% (64/64) 97.97–100.0
95% BI	100.0% (32/32) 97.97–100.0
Positieve overeenkomst (%)	0.9937
(n/N)	0.97
95% BI	0.47
Kappa	1.0

De data-analyse laat zien dat de resultaten voor verse en verouderde reagentia statistisch identiek zijn. Dit geeft aan dat de reagentia voldoende stabiel zijn om gedurende maximaal 16 uur in het instrument te blijven.

Referenties

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

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










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

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

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

Symbolen

De symbolen in de volgende tabel worden in deze gebruiksaanwijzing gebruikt.

Symbol	Betekenis van het symbool
	Inhoud voldoende voor 96 tests
	Inhoud voldoende voor 384 tests
	Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek
	Catalogusnummer
	Fabrikant
	Gemachtigde vertegenwoordiger in de Europese Unie
	Houdbaar tot
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing
	Global Trade Item Number

Oplossen van problemen

Opmerkingen en suggesties

Onjuiste of geen kleurverandering waargenomen tijdens denaturatie.

- | | |
|---|--|
| a) DNR is niet goed bereid | Controleer of het DNR indicatorkleurstof bevat en een donkerpaarse kleur heeft. |
| b) DNR is niet toegevoegd | Controleer of DNR aan het sample is toegevoegd door het samplevolume te meten (verwacht volume is 1,5 ml). Als uit het volume blijkt dat geen DNR is toegevoegd, voeg dan de juiste hoeveelheid toe, meng en ga door met de assay als de juiste kleurverandering vervolgens wordt waargenomen. |
| c) Sample bevat bloed of andere materialen die de kleurverandering maskeren | De exacte kleurverandering die is beschreven, wordt niet verwacht bij deze sampletypes; de testresultaten zouden hierdoor niet negatief mogen worden beïnvloed. |
| d) pH van het sample kan ongewoon laag zijn | Als geen van de andere oorzaken van toepassing is, is het sample waarschijnlijk ongewoon zuur, waardoor de verwachte kleurverandering niet zal optreden. Neem een nieuw sample af vóór het aanbrengen van azijnzuur op de cervix, omdat een onjuiste pH van het sample de testresultaten negatief zal beïnvloeden. |

Kwaliteitscontroles leveren incorrecte resultaten op.

- | | |
|---|--|
| a) Verkeerd assayprotocol gekozen voor de test | Als het assayprotocol incorrect is voor de test die wordt uitgevoerd, moet de microtiterplaat binnen 30 minuten na toevoeging van DR2 opnieuw met het juiste assayprotocol worden gemeten. |
| b) De posities van QC1-LR en QC2-HR zijn verwisseld | Test de samples opnieuw. |
| c) De posities van HRC en QC2-HR zijn verwisseld | Test de samples opnieuw. |

Opmerkingen en suggesties

Onjuiste kleurverandering waargenomen tijdens hybridisatie.

- | | |
|--|---|
| a) Ontoereikende menging van probemix met gedenatureerde kalibrators, kwaliteitscontroles en/of samples; of probemix niet toegevoegd; of incorrect volume reagens toegevoegd | Schud de hybridisatie-microtiterplaat of het rek met microbuisjes nog eens 2 minuten. Voeg indien er nog steeds microbuisjes of wells van de microtiterplaat paars zijn, nog eens 25 µl van de juiste probemix toe en meng goed. Test het sample opnieuw als de juiste kleurverandering niet optreedt na toevoeging van probemix en opnieuw mengen, en het sample geen bloed of andere storende materialen bevatte. |
| b) Sample bevat bloed of andere materialen die de kleurverandering maskeren | De exacte kleurverandering die is beschreven, wordt niet verwacht bij deze sampletypes; de testresultaten zouden hierdoor niet negatief mogen worden beïnvloed. |
| c) Sample bevatte < 1000 µl STM | Controleer het volume van het originele sample. Het volume moet $1425 \mu\text{l} \pm 20 \mu\text{l}$ zijn (na verwijdering van het aliquot van 75 µl voor het testen). Als het volume < 1425 µl is, bevatte het originele sample < 1000 µl STM. Neem een nieuw sample af. |

Analysevalidatie van de test mislukt. Geen signaal gemeten in positieve kalibrators, kwaliteitscontroles of samples.

- | | |
|--|--|
| a) Geen probe toegevoegd aan probe-verdunningsmiddel | Bereid probemix volgens de beschrijving in deze gebruiksaanwijzing. Label de buisjes zorgvuldig. |
| b) Probe verontreinigd met RNase tijdens bereiding | Gebruik pipetpunten met een aerosolfilter om de probe te pipetteren en draag handschoenen. Bereid probemix in een steriele buis. Gebruik alleen schone, nieuwe wegwerp-reagensbuisen. |
| c) Ontoereikende menging van probemix | Meng na toevoeging van probe aan het probe-verdunningsmiddel zeer grondig door bij hoge snelheid gedurende minstens 5 seconden te vortexen. Een zichtbare werveling moet te zien zijn. |
| d) Ontoereikende menging van probemix en | Schud na toevoeging van probemix en sample aan elke hybridisatie-microtiterplaatwell of aan elk hybridisatie-microbuisje gedurende 3 ± 2 minuten |

Opmerkingen en suggesties

gedenatureerd sample	op de Rotary Shaker I bij 1100 ± 100 rpm. Controleer of de kleur in elke well van de microtiterplaat of in elk microbuisje van paars in geel verandert.
e) Onjuiste tijd of temperatuur tijdens hybridisatiefase	Hybridiseer gedurende 60 ± 5 minutes bij $65 \pm 2^\circ\text{C}$. Controleer de temperatuur van de Microplate Heater I of het waterbad. Zorg dat de Microplate Heater I of het waterbad is ingesteld om de samples op de juiste temperatuur te verwarmen en vóór gebruik gedurende 60 minuten is voorverwarmd. Zorg dat het waterniveau voldoende hoog is om de samples op de juiste temperatuur te verwarmen. Waterbaden moeten periodiek worden gekalibreerd.
f) Ontoereikende menging tijdens capturing-fase	Schud gedurende 60 ± 5 minuten bij $20\text{-}25^\circ\text{C}$ op de Rotary Shaker I, volgens de beschrijving in deze gebruiksaanwijzing. Controleer de snelheid van de Rotary Shaker I door te kalibreren. (Raadpleeg de Rotary Shaker I Gebruikershandleiding (<i>Rotary Shaker I User Manual</i>)).
g) Niet de juiste hoeveelheid DR1 toegevoegd of niet gedurende de voorgeschreven tijd geïncubeerd	Pipetteer met een 8-kanaalspipet $75 \mu\text{l}$ DR1 in elke well van de microtiterplaat. Incubeer $30\text{-}45$ minuten bij een temperatuur van $20\text{-}25^\circ\text{C}$.
h) Niet de juiste hoeveelheid DR2 toegevoegd of niet gedurende de voorgeschreven tijd geïncubeerd	Pipetteer met een 8-kanaalspipet $75 \mu\text{l}$ DR2 in elke well van de microtiterplaat. Incubeer $15\text{-}30$ minuten bij een temperatuur van $20\text{-}25^\circ\text{C}$.
i) Storing van DML-instrument of verkeerde programmering	Raadpleeg de gebruikershandleiding en de gebruiksaanwijzing bij de software van het desbetreffende DML-instrument voor verdere instructies of neem contact op met de technische diensten (Technical Services) van QIAGEN.

Opmerkingen en suggesties

Verhoogde RLE-waarden voor kalibrators, kwaliteitscontroles en/of samples (≥ 200 RLE in veel of alle wells van de microtiterplaat/-platen). Analysevalidatie van de test kan mislukt zijn.

- | | |
|---|--|
| a) Geen DNR toegevoegd, of verkeerd volume reagens toegevoegd; of ontoereikende menging van DNR met samples, kalibrators of kwaliteitscontroles | Controleer of de repeteerpipet nauwkeurig het juiste volume afgeeft voordat u DNR toevoegt. Het is essentieel om gekalibreerde pipetten te gebruiken. Voeg een half volume DNR toe aan elk buisje en meng goed. Controleer of de vloeistof de gehele binnenkant van de buis wast om fout-positieve resultaten te voorkomen. Kalibrators, kwaliteitscontroles en samples moeten paars worden na toevoeging van DNR. |
| b) Er lekt licht in het DML-instrument gelekt; deur niet afgedicht, de afdichting rond deur kapot | Controleer het achtergrondsignaal van het DML-instrument ("raw data measurement", ruwe gegevens meten) door een lege microtiterplaat te meten. Een meting hoger dan 50 RLE geeft aan dat sprake is van een lichtlek. Raadpleeg de toepasselijke gebruikershandleiding van het DML-instrument voor verdere instructies of neem contact op met de technische diensten (Technical Services) van QIAGEN. |
| c) Contaminatie van DR2 capturing-microtiterplaatwells met DR1 of exogene alkalische fosfatase | Zie "Controle op contaminatie van DR2", blz. 133. |
| d) Wasbuffer verontreinigd | Zie "Controle op contaminatie van Wash Apparatus en/of waterbron", blz. 134. |
| e) Automated Plate Washer verontreinigd | Zie "Controle op contaminatie van Wash Apparatus en/of waterbron", blz. 134. |
| f) Onvolledige wasbeurt van capturing-microtiterplaatwells na incubatie met DR1 | Was de capturing-microtiterplaatwells 6 keer grondig met wasbuffer, ofwel door de wells te laten overstromen, ofwel met de Automated Plate Washer. Na het wassen mogen er geen restanten roze vloeistof zichtbaar zijn in de microtiterplaatwells. Zie |

Opmerkingen en suggesties

		de <i>Automated Plate Washer Gebruikershandleiding</i> voor instructies over het testen op contaminatie of het vaststellen van storingen.
g)	Contaminatie van microtiterplaatwells met DR1	Zorg dat alle werkoppervlakken schoon en droog zijn. Wees voorzichtig bij gebruik van DR1. Vermijd aerosolvorming.
h)	Afvoeien van hybridisatieoplossing op hetzelfde gebied van Kimtowels-doekjes of gelijkwaardige pluisarme papieren doekjes.	Niet opnieuw afvoeien op reeds gebruikte delen van Kimtowels-doekjes of gelijkwaardige pluisarme papieren doekjes.
i)	Verkeerd vloeipapier gebruikt	Gebruik Kimtowels-doekjes, of gelijkwaardige pluisarme papieren doekjes voor het afvoeien.

Lage PC/NC-ratio's of hoog aantal zwak-positieve samples met een ratio < 2,0 (> 20%). Analysevalidatie van de test kan mislukt zijn.

a)	Onjuiste samplebereiding	Voeg het juiste volume DNR toe en meng het grondig in de vortexmixer. Controleer of de vloeistof de gehele binnenkant van de buis wast om fout-positieve resultaten te voorkomen. Bij PreservCyt-samples moet u zorgen voor een goede menging en moet het resuspenderen van de celpellet voltooid zijn voordat de denaturatie-incubatie plaatsvindt. Er moet een duidelijke kleurverandering van helder tot donkerpaars zichtbaar zijn. Incubeer gedurende 45 ± 5 minuten bij een temperatuur van $65 \pm 2^\circ\text{C}$.
b)	Probemix verkeerd gemengd of onvoldoende probemix toegevoegd	Bereid probemix volgens de beschrijving. Meng grondig door te vortexen en controleer of er een zichtbare werveling ontstaat. Probemix moet met een positive-displacement-pipet of met een meerkanaalspipet aan de buisjes worden toegevoegd voor een nauwkeurige afgifte.
c)	Ontoereikend volume	Controleer of de 8-kanaalspipet nauwkeurig het

Opmerkingen en suggesties

probemix toegevoegd aan elk hybridisatie-microbuisje of aan elke microtiterplaatwell	juiste volume afgeeft voordat u de probemix toevoegt. Voeg 25 µl probemix toe aan elk microbuisje of elke microtiterplaatwell die gedenuceerde kalibrator, kwaliteitscontrole of sample bevat. De kleur moet na toevoeging en grondige menging veranderen van donkerpaars in geel. PreservCyt-samples moeten roze kleuren in plaats van geel.
d) Verlies van activiteit van DR1	Bewaar DR1 bij 2-8°C. Gebruik het vóór de uiterste gebruiksdatum.
e) Onvoldoende capturing	De capturing-fase moet worden uitgevoerd op een Rotary Shaker I bij 1100 ± 100 rpm. Controleer de schudsnelheid van het apparaat door te kalibreren.
f) Wassen onvoldoende	Was de microtiterplaatwells 6 keer grondig met wasbuffer, waarbij u de wells telkens laat overlopen of gebruik daarvoor de Automated Plate Washer.
g) Wasbuffer verontreinigd	Zie "Controle op contaminatie van Wash Apparaat en/of waterbron", blz. 134.

Reeksen positieve samples met ongeveer dezelfde RLE-waarden.

a) Contaminatie van capturing-microtiterplaatwells tijdens bewerkingen van de assay	Dek de capturing-microtiterplaat tijdens alle incubaties af. Vermijd blootstelling van de buisjes aan aerosolcontaminatie tijdens de uitvoering van de assay. Gebruik poedervrije handschoenen tijdens bewerkingen.
b) Contaminatie van DR2	Zorg ervoor dat u het materiaal niet verontreinigt wanneer u DR2 in de capturing-microtiterplaatwells pipetteert. Vermijd contaminatie van DR2 door aerosolen van DR1 of door laboratoriumstof, enz.
c) Storing in de Automated Plate Washer	Raadpleeg "Controle op contaminatie van Wash Apparaat en/of waterbron", blz. 134, of de Automated Plate Washer Gebruikershandleiding (<i>Automated Plate Washer User Manual</i>) voor instructies over het testen op contaminatie of het vaststellen van defecten.

Opmerkingen en suggesties

Brede VC's tussen replica's.

- | | |
|--|---|
| a) Onnauwkeurig pipetteren | Controleer de pipet om u ervan te verzekeren dat er reproduceerbare volumes worden afgegeven. Kalibreer pipetten routinematig. |
| b) Onvoldoende menging | Meng in alle fasen grondig. Vortex vóór en na de denaturatie-incubatie en na toevoeging van probemix. Controleer of er een zichtbare werveling ontstaat. |
| c) Onvoldoende overdracht van vloeistof vanuit de hybridisatie-microbuisjes of de hybridisatie-microtiterplaatwells naar de capturing-microtiterplaatwells | Let op tijdens de overdracht vanuit de hybridisatie-microbuisjes of de hybridisatie-microtiterplaatwells naar de capturing-microtiterplaatwells om er zeker van te zijn dat er reproduceerbare volumes worden overgebracht. |
| d) Verkeerde wasomstandigheden | Was de microtiterplaatwells 6 keer grondig met wasbuffer, waarbij u de wells telkens laat overlopen of gebruik daarvoor de Automated Plate Washer. |
| e) Contaminatie van de microtiterplaatwells met DR1 | Zorg dat alle werkoppervlakken schoon en droog zijn. Wees voorzichtig bij gebruik van DR1. Vermijd aerosolvorming. |

Fout-positieve resultaten verkregen van samples waarvan bekend is dat ze negatief zijn.

- | | |
|--|--|
| a) DR2 verontreinigd | Zorg dat er geen kruisbesmetting van samples kan optreden bij de toevoeging van DR2 aan de samples. Als u alleen een gedeelte van een kit gebruikt, moet u het vereiste volume voor die assay naar een schoon wegwerpreagensvatje overbrengen voordat u de pipet vult. |
| b) Contaminatie van microtiterplaatwells met DR1 | Was de microtiterplaatwells 6 keer grondig met wasbuffer, waarbij u de wells telkens laat overlopen of gebruik daarvoor de Automated Plate Washer. Na het wassen mogen er geen restanten roze vloeistof zichtbaar zijn in de microtiterplaatwells. |
| c) Afvloeien van meerdere | Niet afvloeien op een gebied dat reeds gebruikt is. |

Opmerkingen en suggesties

- rijen op hetzelfde stuk Kimtowels-doekjes of gelijkwaardige pluisarme papieren doekjes.
- d) Onjuiste samplebereiding
- Voeg het juiste volume DNR toe en meng het grondig in de vortexmixer. Controleer of de vloeistof de gehele binnenkant van de buis wast om fout-positieve resultaten te voorkomen.
- Bij de handmatige bereiding van PreservCyt-samples moet u zorgen voor een goede menging en moet het resuspenderen van de celpellet voltooid zijn voordat de denaturatie-incubatie plaatsvindt. Raadpleeg de gebruiksaanwijzing van de *digene* HC2 Sample Conversion Kit.
- Er moet een duidelijke kleurverandering van helder tot donkerpaars zichtbaar zijn. Incubeer 45 ± 5 minuten bij $65 \pm 2^\circ\text{C}$. Bij handmatige bereiding van SurePath-samples moeten de samples gedurende 90 ± 5 minuten bij $65 \pm 2^\circ\text{C}$ worden geïncubeerd..
- e) Verkeerde wasomstandigheden
- Was de microtiterplaatwells 6 keer grondig met wasbuffer, waarbij u de wells telkens laat overlopen of gebruik daarvoor de Automated Plate Washer.
- f) Pipetpunt gecontamineerd met niet-gedenatureerd materiaal bij transfer van gedenatureerd sample naar hybridisatie-microbuisje of hybridisatie-microtiterplaatwell
- De denaturatiestap bij de sampleverwerkingsprocedure dient volgens de instructies in deze gebruikershandleiding uitgevoerd te worden. Onjuist vortexen van een sample, omdraaien van de buis en schudden kunnen leiden tot onvolledige denaturatie van niet-specifieke, endogene RNA-DNA-hybriden in cervicale samples. Met name bij PreservCyt- of SurePath-samples is de kans groot dat dergelijke hybriden op de binnenwanden van de sample-denaturatiebuisen aanwezig zijn. Om carry-over van dit niet-gedenatureerde celmateriaal te voorkomen mag de pipetpunt de wanden van de sample-denaturatiebuisen niet raken tijdens de transfer van het gedenatureerde

Opmerkingen en suggesties

sample naar de hybridisatie-microbuisjes of de hybridisatie-microtiterplaatwells.

Verhoogde RLE-waarden van de negatieve controle (NC) (> 200 RLE). Rest van assay verloopt volgens verwachting.

- | | |
|---|---|
| a) DR2 is bij een hogere temperatuur dan 20-25°C geïncubeerd. | Voer de test opnieuw uit en zorg dat in de capturing- en detectiefasen bij een temperatuur van 20-25°C geïncubeerd wordt. |
| b) DR2 is langer dan 30 minuten geïncubeerd. | Meet de microtiterplaat na 15 minuten incubatie (en niet later dan na 30 minuten incubatie) bij een temperatuur van 20-25°C. |
| c) DR2 of wasbuffer is verontreinigd met alkalische fosfatase of DR1. | Raadpleeg "Controle op contaminatie van DR2", blz. 133 of "Controle op contaminatie van Wash Apparaat en/of waterbron", blz. 134. |

Analysevalidatie van de test mislukt. Verhoogde waarde voor $\overline{PCX}/\overline{NCX}$.

Posities van de HRC en de QC2-HR verwisseld

Test de samples nogmaals. Lees de etiketten van de kalibrator- en kwaliteitscontroleflacons zorgvuldig om te voorkomen dat deze reagentia in verkeerde volgorde worden geplaatst.

Controle op contaminatie van DR2

1. Pipetteer 75 µl uit de uitverdeelde, aangebroken of nieuwe flacon DR2 in een lege capturing-microtiterplaatwell.

NB: Een optimale beoordeling van de werking van DR2 wordt verkregen door de test 3 keer uit te voeren.

2. Incubeer 15 minuten bij 20-25°C. Vermijd direct zonlicht.
3. Meet de microtiterplaat met een DML-instrument.

De DR2-controle moet < 50 RLE zijn.

Als de DR2-waarden < 50 RLE zijn, kan het DR2 worden gebruikt om de test te herhalen.

Neem bij contaminatie (> 50 RLE), een nieuwe kit in gebruik en herhaal de test.

Controle op contaminatie van Wash Apparaat en/of waterbron

1. Nummer wells van 1-4. Pipetteer 75 µl DR2 in de 4 afzonderlijke capturing-microtiterplaatwells.

Well 1 dient als controle voor DR2.

2. Pipetteer 10 µl wasbuffer uit de wasfles in well 2 van de microtiterplaat.
3. Laat wasbuffer door de slang van het wasapparaat stromen. Pipetteer 10 µl wasbuffer uit de slang in well 3 van de microtiterplaat.
4. Neem een sample van het water dat is gebruikt om de wasbuffer te bereiden. Pipetteer 10 µl van het water in well 4 van de microtiterplaat.
5. Incubeer 15 minuten bij 20-25°C. Vermijd direct zonlicht.
6. Meet de microtiterplaat met een DML-instrument.

De controle van DR2 (well 1) moet < 50 RLE zijn.

Vergelijk de RLE-waarden van de wells 2, 3 en 4 met de RLE-waarde van de DR2-controle. De afzonderlijke RLE-waarden van wells 2, 3 en 4 mogen niet meer dan 50 RLE hoger zijn dan de RLE-waarde van de DR2-controle.

Waarden die meer dan 50 RLE hoger zijn dan de DR2-controle geven een contaminatie aan. Zie "Methode met handmatig wassen", blz. 60 voor aanwijzingen voor het reinigen en onderhouden van het Wash Apparaat.

Controle op contaminatie van de Automated Plate Washer

1. Nummer wells van 1-5. Pipetteer 75 µl DR2 in de 5 afzonderlijke capturing-microtiterplaatwells.

Well 1 dient als controle voor DR2.

2. Pipetteer 10 µl wasbuffer uit de wasfles van de Plate Washer in well 2 van de microtiterplaat.
3. Pipetteer 10 µl spoelvloeistof uit de spoelfles van de Plate Washer in well 3 van de microtiterplaat.
4. Druk op de toets **Prime** (Primen) op het toetsenpaneel van de Plate Washer, zodat er wasbuffer door de leidingen stroomt. Pipetteer 10 µl wasbuffer uit de bak in well 4 van de microtiterplaat.
5. Druk op de toets **Rinse** (Spoelen) op het toetsenpaneel van de Plate Washer, zodat er spoelvloeistof door de leidingen stroomt. Pipetteer 10 µl wasbuffer uit de bak in well 5 van de microtiterplaat.

6. Dek de plaat af en incubeer 15 minuten bij 20-25°C. Vermijd direct zonlicht.

7. Meet de microtiterplaat met een DML-instrument.

De controle van DR2 (well 1) moet < 50 RLE zijn.

Vergelijk de RLE-waarden van de wells 2, 3, 4 en 5 met de RLE-waarde van de DR2-controle.

De afzonderlijke RLE-waarden van wells 2, 3, 4 en 5 mogen niet meer dan 50 RLE hoger zijn dan de RLE-waarde van de DR2-controle.

Waarden die meer dan 50 RLE hoger zijn dan de DR2-controle geven contaminatie van de Plate Washer aan.

Zie de Gebruikershandleiding voor de Automated Plate Washer (*Automated Plate Washer User Manual*) voor de decontaminatieprocedure..

Contactgegevens

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

Deze pagina is met opzet blanco gelaten

Deze pagina is met opzet blanco gelaten

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

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

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

Hybrid Capture-technologie is beschermd door Europees octrooi nr. 0 667 918, geregistreerd in Oostenrijk, België, Zwitserland, Liechtenstein, Duitsland, Denemarken, Spanje, Frankrijk, Verenigd Koninkrijk, Griekenland, Ierland, Italië, Luxemburg, Nederland en Zweden.

V.S.-octrooi Hybrid Capture

6,228,578B1

V.S.-octrooien HPV

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

© 2012–2015 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

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