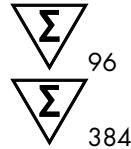


August 2015

Bruksanvisning for digene® HC2 High Risk HPV DNA-test



IVD

En in vitro nukleinsyre-hybridiseringsanalyse med signalforsterkning ved bruk av mikroplate-kjemiluminescens for kvalitativ deteksjon av 13 høyriskotyper av humant papillomavirus (HPV)-DNA i cervikale prøver

Til bruk med:

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



REF

5197-1330 (sett med 1 plate)
618111 (sett med 4 plate)



QIAGEN
19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874
USA

EC REP

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
TYSKLAND

1058538NO Rev. 02

Viktige endringer fra tidligere revisjon av bruksanvisningen

- Tilsatt prøveklargjøringsprosedyren for SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet ved bruk av QIAasymphony® DSP HPV Media-sett sammen med de relaterte ytelsesdata.
- Oppdatert for samsvar med FNs globalt harmoniserte system for klassifisering og merking av kjemikalier (GHS).

Innhold

Bruksområde.....	8
Sammendrag og forklaring	9
Patogeninformasjon	10
Prosedyreprinsipp.....	10
Prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony SP	12
Prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet.	12
Prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet.	12
Testing ved bruk av Rapid Capture-systemet	13
Materialer som følger med	15
Sett med 1 plate.....	15
Sett med 4 plater	15
Settets innhold	16
Nødvendige materialer som ikke følger med.....	17
In vitro-diagnostisk utstyr og materiale.....	17
Utstyr og materiale til generell laboratoriebruk.....	18
Tilleggsutstyr og -materialer for PreservCyt-prøveklargjøring.....	20
Tilleggsutstyr og -materialer for SurePath-prøveklargjøring	20
Advarsler og forsiktighetsregler	21
Advarsler	21
Prøver.....	21
Natriumazid.....	22
Buffer N2.....	22
RCS-automatisert testing	22
Sikkerhets- og risikosestninger for komponenter.....	23
Forsiktighetsregler	24
Oppbevaring og håndtering av reagens	25
Komponenter i settet	25

Klargjorte reagenser	26
Prøvetaking og -klargjøring	26
Cervikale og vaginale prøver i STM	26
Cervicale biopsiprøver	27
Cervikale prøver i PreservCyt-løsning	27
Cervikale prøver i SurePath-konserveringsmiddel	28
Automatisert klargjøring av SurePath-prøver	29
Automatisert prøveklargjøring av SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet	29
Manuell prøveklargjøring av SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet	30
Prosedyre	31
Klargjøring av reagens	31
Denatureringsreagens	33
Denatureringsreagens 2	34
Probeblanding	34
Vaskebuffer	36
Opprette plateoppsett	37
Prøveklargjøring	39
Prøveklargjøring av PreservCyt-prøver ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet	39
Automatisert prøveklargjøring av SurePath-prøver og SurePath-post-gradient-cellepelleter ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet	40
Prøveklargjøring av PreservCyt-prøver ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet	40
Manuell klargjøring av PreservCyt-prøver	40
Manuell prøveklargjøring av SurePath-post-gradient-cellepelleter	41
Denaturering og hybridisering av prøver klargjort ved bruk av QIASymphony SP	42
Denaturering av kalibratorer, kvalitetskontroller og DNA-eluater for manuell testing	43
Valgfritt stoppunkt for DNA-eluater	44
Hybridisering av DNA-eluater	44
Denaturering og hybridisering av STM-prøver og manuelt klargjorte PreservCyt-prøver og SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet	45
Denaturering av kalibratorer, kvalitetskontroller og STM-prøver	45

Valgfritt stoppunkt for klargjorte STM-prøver og manuelt klargjorte PreservCyt-prøver og SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet	47
Hybridisering av klargjorte STM-prøver og manuelt klargjorte PreservCyt-prøver og SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet	48
Hybridisering ved bruk av en mikroplate og Microplate Heater I	48
Hybridisering ved bruk av mikrorør og vannbad	50
Hybridoppfanging.....	51
Hybriddeteksjon.....	52
Vasking.....	54
Automated Plate Washer-metode	54
Manuell vaskemetode	55
Signalforsterkning	56
Måle oppfangingsmikroplaten og generere resultater	57
Tolkning av resultater	58
Resultater fra STM-prøvetesting	58
Resultater fra SurePath-prøvetesting	58
Resultater fra PreservCyt-prøvetesting	58
RLU/CO-verdi nær 1,0	59
Andre HPV-typer	59
Verifisering av analysekalibrering.....	59
Negativ kalibrator	59
Positiv kalibrator	60
Gjennomsnitt for positiv kalibrator / gjennomsnitt for negativ kalibrator.....	60
Cutoff-beregning	60
Kvalitetskontroller	60
Begrensninger.....	61
Ytelsesegenskaper	63
Klinisk ytelse ved screening av pasienter med normale Pap-testresultater som hjelpemiddel ved risikovurdering for pasientadministrasjon	63
Klinisk ytelse ved screening av pasienter med ASC-US-Pap-testresultater for å bestemme behovet for henvisning til kolposkopi	67

Klinisk sensitivitet og spesifisitet for bestemmelse av risikoen for høygradig sykdom hos kvinner med Pap-tester for LSIL eller HSIL	69
Ytelse ved vaginal innsamling eller selvinnsamling	73
Analytisk sensitivitet	74
Ekvivalens mellom prøvetyper	75
Ekvivalens mellom STM- og PreservCyt-prøver	75
Ekvivalens mellom manuell prøveklargjøring av PreservCyt-prøver og prøveklargjøring av PreservCyt-prøver ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet.	75
Ekvivalens mellom manuell prøveklargjøring av PreservCyt-prøver og prøveklargjøring av PreservCyt-prøver ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet.	76
Ekvivalens mellom STM og manuell prøveklargjøring av SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet	76
Ekvivalens mellom manuell prøveklargjøring av SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet og prøveklargjøring av SurePath-prøver ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet.....	77
Ekvivalens mellom manuell prøveklargjøring av SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet og prøveklargjøring av SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet	78
Overensstemmelse mellom testmetoder.....	79
Reproduserbarhet.....	83
Total reproduserbarhet av manuell testing	83
Reproduserbarhet med kliniske STM-prøver	83
Reproduserbarhet for kliniske PreservCyt-prøver	87
Reproduserbarhet av kliniske SurePath-prøver	97
Kryssreaktivitet	102
Krysshybridisering	104
Effekt av blod og andre substanser på STM-prøver	104
Effekt av blod og andre substanser på PreservCyt-prøver.....	105
Manuell prøveklargjøring	105
Prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet.	105
Prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet.....	106
Effekt av blod og andre substanser på SurePath-prøver	107

Prøveklargjøring av SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet.....	107
Overføring	108
Reagensstabilitet lastet på systemet.....	110
Referanser	112
Symboler	117
Feilsøkingsveiledning	118
Kontaminasjonskontroll av DR2	125
Kontaminasjonskontroll av vaskeapparat og/eller vannkilde.....	125
Kontaminasjonskontroll av Automated Plate Washer.....	126
Kontaktinformasjon	127

Bruksområde

Til in vitro diagnostisk (IVD) bruk.

digene HC2 High-Risk HPV DNA-test ved bruk av Hybrid Capture® 2 (HC2)-teknologi er en nukleinsyre-hybridiseringsanalyse med signalforsterkning ved bruk av mikroplate-kjemiluminescens for kvalitativ deteksjon av 13 høyrisikotyper av HPV-DNA i cervikale og vaginale prøver.

Cervikale og vaginale prøver som kan testes med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen inkluderer følgende:

- Cervikale prøver innsamlet av lege ved bruk av prøvetakingsenheten *digene* HC2 DNA
- Selvinnsamlede vaginalprøver innsamlet ved bruk av prøvetakingsenheten *digene* HC2 DNA
- Biopsiprøver samlet inn i *digene* Specimen Transport Medium (Prøvetransportmedium) (STM)
- Prøver samlet inn ved bruk av en prøvetakingsenhet av kosttype eller bestående av en pensel-/spatelkombinasjon, deretter plassert i PreservCyt-løsning eller SurePath-konserveringsmiddel

Bruken av denne testen er indisert:

- For deteksjon av høyrisiko-HPV-typerne 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 og 68, påvist å være den primære årsaksfaktoren ved utvikling av cervikal kreft.
- Som en innledende screeningstest av den generelle populasjonen, for bruk med eller uten Pap-test, for å identifisere kvinner med økt risiko for utvikling av cervikal kreft eller forekomst av høygradig cervikal sykdom. HPV-diagnose er en indikasjon på cervikal sykdom som øker med alderen.
- Som oppfølgingstest for pasienter etter unormale Pap-testresultater eller cervikal sykdom for å bestemme behovet for henvisning til kolposkopi eller andre oppfølgingsprosedyrer.
- Som en oppfølgingstest for pasienter med Pap-testresultater med lavgradig skvamøs intraepitelial lesjon (LSIL) eller høygradig skvamøs intraepitelial lesjon (HSIL) før kolposkopi. For disse pasientene vil et *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testresultat hjelpe legen med pasientadministrasjon ved å hjelpe til med risikovurdering av kvinner for å bestemme fravær av høygradig sykdom.

Sammendrag og forklaring

Forekomsten av enkelte HPV-typer i vagina er forbundet med en rekke sykdommer, deriblant kondylom, Bowenoid papulose, cervikal, vaginal og valvulær intraepitelial neoplasia og karsinom (1–3). Det er generelt akseptert at disse virusene hovedsakelig overføres via seksuell kontakt, og at høyrisiko-HPV-typer er den største vedkjente risikofaktoren for utvikling av cervikal kreft (4–8).

HPV kan så langt ikke dyrkes *in vitro*, og immunologiske tester er ikke tilstrekkelige for å bestemme forekomsten av HPV-infeksjon i cervix. Indirekte holdepunkter for anogenital HPV-infeksjon kan oppnås ved hjelp av fysiske undersøkelser og ved forekomst av karakteristiske celleendringer forbundet med virusreplikasjon i Pap-tester eller biopsiprøver. Alternativt kan biopsiprøver analyseres ved bruk av nukleinsyrehybridisering for å direkte påvise forekomsten av HPV-DNA.

Historisk er HPV-type 16 og 18 ansett som kreftassosierte høyrisikotyper (8–10). HPV-type 31, 33 og 35 er påvist å ha en intermediær assosiasjon med kreft (2,11–14). Denne intermediære assosiasjonen kommer av at disse typene påvises oftere i høygradige skvamøse intraepitelliale lesjoner enn ved kreft. Induksjon av kreft grunnet forekomsten av disse typene er derfor mindre sannsynlig enn når høyrisiko-HPV-DNA-typer er tilstede (15). Disse 5 HPV-typer utgjør sammen omtrent 73 % av alle HPV-infeksjoner (16, 17). Ytterligere HPV-typer, deriblant 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 og 68, er identifisert som de primære HPV-typer som kan påvises i de gjenværende lesjonene (17–27). Disse HPV-typer kan også kategoriseres i intermediære og høyrisikogrupper basert på deres relative fordeling i forskjellige histopatologiske diagnosekategorier (16, 17, 24–28).

HPV-DNA er påvist å forekomme i omtrent 10 % av kvinner med normalt cervixepitel, men den faktiske forekomsten i spesifikke grupper kvinner påvirkes kraftig av alder og andre demografiske variabler (2, 10, 16, 29). Prospektive studier har vist at 15–28 % av kvinner som testet positive for HPV-DNA utviklet skvamøse intraepitelliale lesjoner (SIL) i løpet av 2 år sammenlignet med kun 1–3 % av kvinner som testet negative for HPV-DNA (30, 31). Spesielt var risikoen for progresjon for HPV-type 16 og 18 større (omtrent 40 %) enn for andre HPV-typer (30).

Patogeninformasjon

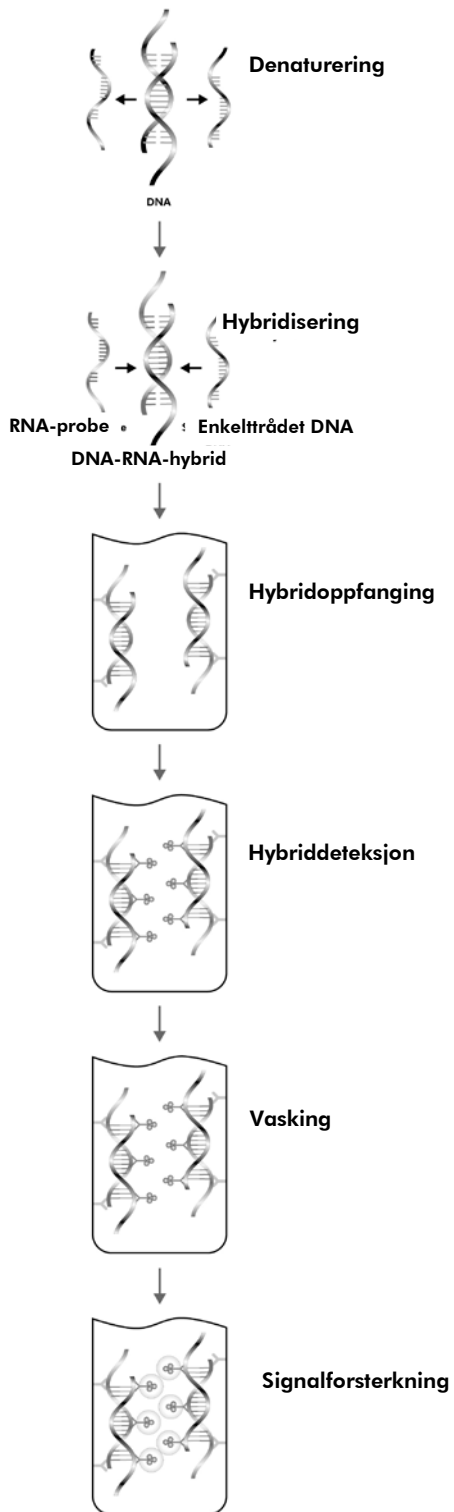
Humane papillomavirus består av et ikosahedralt viruspartikkel (virion) inneholdende et dobbeltrådet, rundt DNA-molekyl med 8000 basepar, omgitt av en proteinkappe. Etter smitte av epitelceller blir virus-DNA etablert gjennom hele tykkelsen av epitelet, men intakte virioner finnes kun i de øvre vevslagene. Viralt DNA kan derfor finnes enten i virioner eller som episomale eller integrerte HPV-sekvenser, avhengig av lesjonens type og grad.

Prosedyreprinsipp

digene HC2 High-Risk HPV DNA-testen, som bruker HC2-teknologi, er en nukleinsyre-hybridiseringsanalyse med signalforsterkning som benytter mikroplatekjemiluminiscent deteksjon. Prøver som inneholder mål-DNA hybridiserer med en spesifikk HPV-RNA-probe. Resulterende RNA-DNA-hybrider fanges opp på overflaten av en mikroplatebrønn belagt med antistoffer som er spesifikke for RNA-DNA-hybrider. Immobiliserte hybrider reagerer deretter med alkaliske fosfatasekonjugerte antistoffer som er spesifikke for RNA-DNA-hybrider, og påvises med et kjemiluminescent substrat. En rekke alkalisk fosfatase-molekyler konjugeres til hvert antistoff. Flere konjugerte antistoffer bindes til hvert oppfangede hybrid, og fører til omfattende signalforsterkning. Siden substratet spaltes av den bundede alkaliske fosfatasen, utstråles lys, som måles som relative lysenheter (RLU) av et *digene* Microplate Luminometer (DML)-instrument. Den utstrålte lysstyrken angir forekomsten av eller fraværet av mål-DNA i prøven.

En RLU-måling ved analysens cutoff (CO) eller mer angir forekomsten av høyrisiko-HPV-DNA-sekvenser i prøven. En RLU-måling under analysens CO angir fraværet av de spesifikke testede høyrisiko-HPV-DNA-sekvensene eller HPV-DNA-nivåer under testens deteksjonsgrense.

Arbeidsprosess for hybridoppfanging



Prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony SP

Automatisert prøveklargjøring av PreservCyt-prøver kan utføres ved bruk av QIASymphony SP med QIASymphony DSP HPV Media-settet eller QIASymphony DSP AXpH DNA-settet.

Prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet.

QIASymphony DSP HPV Media-settet gir prøveekstrakter på hybridiseringsmikroplaten som er klar for automatisert RCS-automatisert testing med Rapid Capture®-systemet (RCS) med digene HC2 High-Risk HPV DNA-testen. QIASymphony SP utfører alle trinn i prøveklargjøringsprosedyren for opptil 88 prøver, i partier på opptil 24, i en enkeltkjøring.

QIASymphony SP behandler 88 PreservCyt-prøver i 2 timer og 15 minutter uten å kreve intervensjon fra bruker når instrumentet er lastet med prøver.

QIASymphony SP behandler 88 SurePath-prøver i 1 timer og 45 minutter uten å kreve intervensjon fra bruker når instrumentet er lastet med prøver. Prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony SP etterfølges øyeblikkelig av en 90-minutters inkubering av prøveekstraktene i hybridiseringsmikroplaten på en mikroplatevarmer. Under inkubering av prøveekstraktene denatureres kalibratorene og kvalitetskontrollene separat i et vannbad, og pipetteres deretter manuelt i den første kolonnen av hybridiseringsmikroplaten når inkuberingen av prøveekstrakten er fullført. Prøveklargjøring av SurePath-prøver ved bruk av QIASymphony SP og QIASymphony DSP HPV Media-settet kan enten skje før oppstart av cytologiprosessering eller etter at cytologiprosessering er fullført.

Viktig: Prøveekstraktene som produseres som følge av prøveklargjøring av PreservCyt- og SurePath-prøver ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet kan kun testes ved bruk av RCS. Manuell ytelse av testen med prøveekstrakter er ikke validert.

Når du utfører automatisert prøveklargjøring med QIASymphony, må du se de relevante QIASymphony-brukerhåndbøkene og Bruksanvisning (håndbok) for QIASymphony DSP HPV Media-settet (*QIASymphony DSP Media Kit Instructions for Use (Handbook)*), samt denne bruksanvisningen, for nødvendig prosedyremessig og beskrivende informasjon.

Prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet.

QIASymphony DSP AXpH DNA-settet gir DNA-eluatet på hybridiseringsmikroplaten som er klar for manuell RCS-automatisert testing med digene HC2 High-Risk HPV DNA-testen. QIASymphony SP utfører alle trinn i prøveklargjøringsprosedyren for opptil 88 prøver, i partier på opptil 24, i en

enkeltkjøring. QIASymphony SP behandler 88 prøver i 4 timer og 30 minutter uten å kreve intervensjon fra bruker når instrumentet er lastet med prøver.

Når du utfører automatisert prøveklargjøring med QIASymphony, må du se de relevante QIASymphony-brukerhåndbøkene og Håndbok for QIASymphony DSP AXpH DNA Kit (*QIASymphony DSP AXpH DNA Kit Handbook*), samt denne bruksanvisningen, for nødvendig prosedyremessig og beskrivende informasjon.

Testing ved bruk av Rapid Capture-systemet

Testing med høyt prøvegjennomløp med digene HC2 High-Risk HPV DNA-testen kan utføres ved bruk av RCS. Settet med 4 plater (kat.nr. 618111) kan kun brukes med RCS, og kan ikke brukes til manuell testing.

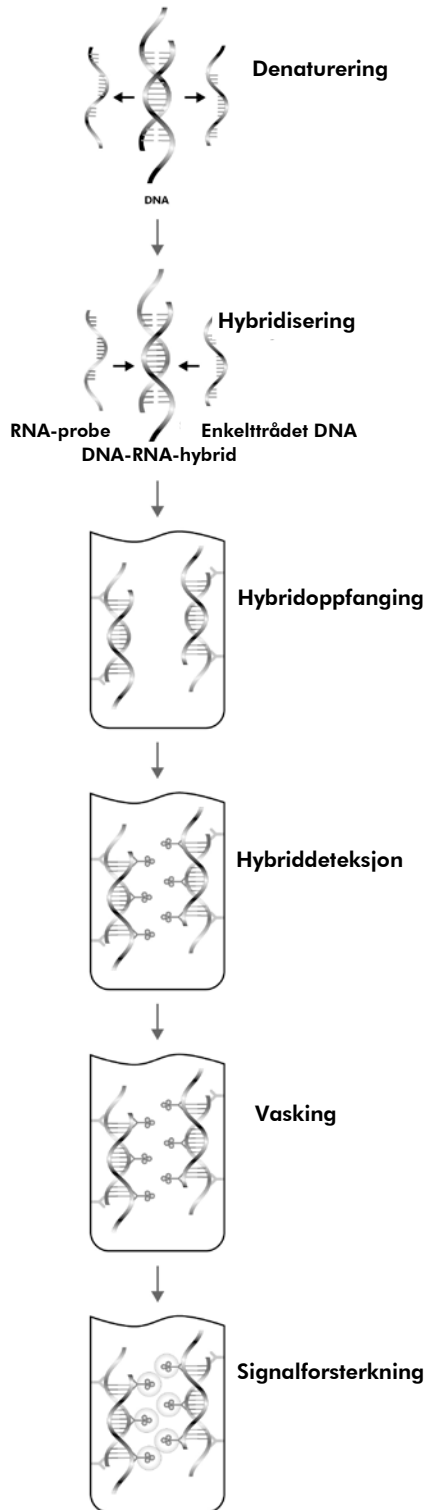
RCS er et automatisert pipetterings- og fortyningssystem til generell bruk som kan brukes med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen for testing med høyt prøvegjennomløp. Dette systemet behandler opptil 352 prøver på 8 timer, deriblant en periode på 3,5 timer der brukeren ikke trenger å gjøre noe. Opptil 704 prøveresultater kan genereres på 13 timer.

Prøveklargjøring utføres uavhengig av RCS før plassering på RCS-dekket. I tillegg utføres kjemiluminescent signaldeteksjon og resultatrapportering ved bruk av et frakoblet DML-instrument som brukes ofte både ved manuell og RCS-automatisert testing.

Hvert digene HC2 High-Risk HPV DNA-testtrinn utføres i nøyaktig samme rekkefølge som ved manuell testing. RCS muliggjør trinnvis behandling av opptil 4 mikroplater, der hver mikroplate inneholder prøver og de nødvendige testkalibratorene og kvalitetskontrollene.

Når du utfører RCS-automatisert testing, må du se Brukerhåndbok for Rapid Capture System (*Rapid Capture System Manual*) og Brukerhåndbok for Rapid Capture System – Utføre digene HC2 DNA-tester ved bruk av QIASymphony SP-behandlede prøver (*Rapid Capture System User Manual – Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*), samt denne bruksanvisningen, for nødvendig prosedyremessig og beskrivende informasjon.

Arbeidsprosess for hybridoppfanging



Manuell prøveklargjøring

Automatisert på Rapid Capture System

Materialer som følger med

Sett med 1 plate

Det er 96 tester i *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen (kat.nr. 5197-1330) med 1 plate.

Ved manuell testing ved bruk av settet med 1 plate anbefales minst 24 tester for hver anvendelse. Hvis man ønsker å bruke færre enn 24 tester, kan det totale antallet tester pr. sett bli redusert grunnet begrensede reagensvolum. Antallet pasientresultater varierer ut fra antall anvendelser pr. sett, som angitt under.

Antall anvendelser	Antall pasientresultater
1	88
2	80
3	72
4	64

Ved RCS-automatisert testing med settet med 1 plate krever bruk av hele settet testing av en hel mikroplate (88 prøver) pr. RCS-kjøring. Testing av en ufullstendig mikroplate er akseptabelt, men hele settet brukes på grunn av dødvolumet påkrevd for drift av instrumentet

Sett med 4 plater

Det er 384 tester i *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen (kat.nr. 618111) med 4 plater.

Settet med 4 plater kan kun brukes til RCS-automatisert testing. For å oppnå 384 tester må settet med 4 plater brukes i 1 eller 2 RCS-kjøringer. Hvis man ønsker mer enn 2 kjøring, kan det totale antallet tester pr. sett bli redusert grunnet begrensede reagensvolum.

Settets innhold

digene HC2 High-Risk HPV DNA Test		
Katalognr.	5197-1330	618111
Antall tester	96	384
Indicator Dye Contains 0.05% (w/v) sodium azide	0.35 ml	2.0 ml
Denaturation Reagent* Dilute sodium hydroxide (NaOH) solution	50 ml	2 x 100 ml
Probe Diluent* Buffered solution with 0.05% (w/v) sodium azide	5 ml	20 ml
High-Risk HPV Probe HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 and 68 RNA probe in buffered solution (red cap)	200 µl	3 x 200 µl
Low-Risk HPV Quality Control 5 pg/ml (500,000 copies/ml) cloned HPV 6 DNA and carrier DNA in STM with 0.05% (w/v) sodium azide.	1 ml	1 ml
High-Risk HPV Quality Control 5 pg/ml (500,000 copies/ml) cloned HPV 16 DNA and carrier DNA in STM with 0.05% (w/v) sodium azide	1 ml	1 ml
Negative Calibrator (Negativ kalibrator) Bærer-DNA i STM med 0,05 % (w/v) natriumazid	2 ml	2 ml
High-Risk HPV Calibrator (Høyrisiko-HPV-kalibrator) 1 pg/ml klonet HPV 16-DNA og bærer-DNA i STM med 0,05 % (w/v) natriumazid	1 ml	2 ml
Capture Microplate (Oppfangingsmikroplate) Belagt med polyklonale anti-RNA-DNA-hybridantistoffer fra geit	1	4
Detection Reagent 1 (Deteksjonsreagens 1) Alkalisk fosfatase-konjugerte antistoffer mot RNA-DNA- hybrider i bufret løsning med 0,05 % (w/v) natriumazid	12 ml	40 ml
Detection Reagent 2 (Deteksjonsreagens 2) CDP-Star® med Emerald II (kjemiluminescent substrat)	12 ml	40 ml
Wash Buffer Concentrate (Vaskebufferkonsentrat)* Inneholder 1,5 % (w/v) natriumazid	100 ml	2 x 100 ml

* Se "Advarsler og forsiktighetsregler", side 21 for helse- og sikkerhetsinformasjon.

Nødvendige materialer som ikke følger med

Viktig: Påse at instrumentene som brukes i denne prosedyren, er blitt kontrollert og kalibrert i henhold til produsentens anbefalinger.

In vitro-diagnostisk utstyr og materiale

Kun utstyr og materiale validert med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen er tilgjengelig fra QIAGEN

- *digene* Hybrid Capture 2 System ("*digene* HC2-system"), bestående av et QIAGEN-godkjent luminometer ("*DML*-instrument"), QIAGEN-godkjent personlig datamaskin og periferiutstyr (monitor, tastatur, mus, skriver og skriverkabel), *digene* HC2 System Software (*digene* HC2-systemprogramvare) ("*digene*-analyseprogramvare"), *digene* HC2 System Assay Protocols for HPV (*digene* HC2-systemanalyseprotokoller for HPV), LumiCheck Plate Software (LumiCheck-plateprogramvare) og Brukerhåndbok for *digene* HC2-systemet (*digene* HC2 System User Manual)
- Hybrid Capture System Rotary Shaker I
- Hybrid Capture System Microplate Heater I
- Hybrid Capture System Automated Plate Washer
- Hybrid Capture System Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 (valgfri)*
- Conversion Rack and Lid (Konverteringsstativ og -lokk) (valgfritt)*
- *digene* Specimen Rack and Lid (Prøvestativ og -lokk) (valgfritt)*
- EXPAND-4 pipette og stativ (valgfritt)†
- Rørforseglerdispenser og kutteenhet (valgfri, brukt med MST Vortexer 2)
- Rapid Capture System (påkrevd for bruk med settet med 4 plater; valgfritt for settet med 1 plate)
- Vaskeapparat
- Hybridiseringsmikroplater
- Mikroplatelokk
- RCS-mikroplatebrønnstrimler*
- RCS-reagenskar*
- RCS-reagenskarlokk*

* Påkrevd for å utføre RCS-automatisert testing.

† Tilpasset gjenstand brukt til å overføre STM-prøver til hybridiseringsmikroplaten. Andre tilpassede, utvidebare, flerkanalpipetter kan brukes, forutsatt at en spissavstand på 3,2 cm kan oppnås i utvidet tilstand.

- RCS-engangsspisser*
- RCS slipp-ned-hetter*
- Buffer N2†
- Buffer D2†
- Blå RCS-vaskerbåt‡
- Ekstra lange pipettespisser
- Prøverør
- Stativ for prøverør
- Skruhetter for prøverør
- Reagensbeholdere til engangsbruk
- DuraSeal™ rørforseglingsfilm
- Hybridiseringsmikrorør§
- Mikrorørstativ§
- Plateforseglere§

Utstyr og materiale til generell laboratoriebruk

- 65 ± 2 °C vannbad av tilstrekkelig størrelse til å romme et prøvestativ (21 cm bredt x 32 cm dypt x 18 cm høyt).
- Mikrosentrifuge
- Vorteksblender med kopffeste
- Enkeltkanalspipette, varibale innstillinger for 20–200 µl og 200–1000 µl volum
- Repetisjonspipette med positiv fortregning, for eksempel Eppendorf® Repeater® pipette
- 8-kanals pipette: variable innstillinger for 25–200 µl volum
- Tidtaker
- Natriumhypoklorittløsning, 0,5 % v/v
- Parafilm® eller tilsvarende
- Engangspipettespisser med aerosolbarriere for enkeltkanalspipette (20–200 µl og 200–1000 µl)
- Engangsspisser for repetisjonspipette med positiv fortregning (12,5, 5, 2,5 og 1,25 ml)
- Engangsspisser for 8-kanals pipette (25–200 µl)

* Påkrevd for å utføre RCS-automatisert testing.


† Påkrevd for testing av prøver klargjort ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet.


‡ Påkrevd for RCS-automatisert testing av prøver behandlet ved bruk av QIASymphony DSP HPV-mediasettet

§ Påkrevd for hybridisering ved bruk av mikrorør og vannbad.

-
- Kintowels® våtservietter eller tilsvarende løfrie papirhåndklæt
 - Overflatedeksel til engangsbruk
 - Pudderfrie engangshansker
 - 5 ml og/eller 15 ml polypropylenrør med hette og rund bunn
 - Rørstativ som rommer 10 ml eller 15 ml rør
 - 50 ml konusformede polypropylenrør


Tilleggsutstyr og -materialer for PreservCyt-prøveklargjøring

 Se Bruksanvisning (håndbok) for QIAasymphony DSP HPV Media-settet (*QIAasymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)*) for automatisert prøveklargjøring ved bruk av QIAasymphony DSP HPV Media-settet.

 Se Brukerhåndbok for QIAasymphony DSP AXpH DNA-settet (*QIAasymphony DSP AxpH DNA Kit Handbook*) for automatisert prøveklargjøring ved bruk av QIAasymphony DSP AXpH DNA-settet.

 Se bruksanvisningen for *digene* HC2 Sample Conversion-settet for manuell prøveklargjøring.

Tilleggsutstyr og -materialer for SurePath-prøveklargjøring

 Se Bruksanvisning (håndbok) for QIAasymphony DSP HPV Media-settet (*QIAasymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)*) for automatisert prøveklargjøring ved bruk av QIAasymphony DSP HPV Media-settet.

Manuell SurePath-prøveklargjøring krever følgende tilleggsutstyr og -materialer:

- "Svingbøtte"-sentrifuge som kan nå $800 \pm 15 \times g$ og romme 15 ml konusformede polypropylensentrifugerør
- *digene* HC2 prøvekonverteringsrør* eller 15 ml VWR® eller Corning® polypropylenrør
Viktig: *digene* HC2 prøvekonverteringsrør som er tilgjengelige fra QIAGEN må brukes med MST Vortexer 2 eller RCS.
- 7 ml overføringspipetter med standardspiss eller tilsvarende
- *digene* Specimen Transport Medium

* *digene* HC2 prøvekonverteringsrør som er tilgjengelige fra QIAGEN må brukes med MST Vortexer 2 eller RCS.

Advarsler og forsiktighetsregler

For bruk i forbindelse med in vitro-diagnostikk

Les alle instruksjonene nøye for du bruker testen.

Advarsler

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Du finner mer informasjon på de aktuelle sikkerhetsdatabladene (HMS-databladene). Disse er tilgjengelige elektronisk i et lettveint og kompakt PDF-format på www.qiagen.com/safety der du kan finne, vise og skrive ut sikkerhetsdatablader for hvert QIAGEN-sett og hver settkomponent.

Prøver

FORSIKTIG Risiko for smittestoffer



Prøver kan inneholde smittestoffer, og må håndteres deretter. Betrakt alle prøver som potensielt smittefarlige.

Ingen kjent testmetode kan fullstendig garantere at prøver ikke vil overføre infeksjon. Det er anbefalt å behandle humane prøver i samsvar med gjeldende nasjonale og lokale biosikkerhetspraksiser. Bruk disse biosikkerhetspraksisene med materialer som inneholder eller mistenkes å inneholde smittesoffer.

Disse forsiktighetsreglene inkluderer, men er ikke begrenset til, følgende:

- Ikke pipetter med munnen.
- Ikke røyk, spis eller drikk i områder der reagenser eller prøver håndteres.
- Bruk pudderfrie engangshansker ved håndtering av reagenser eller prøver. Vask hendene grundig når testen er fullført.
- Rengjør og desinfiser alt søl fra prøver ved bruk av et tuberkulocidalt desinfeksjonsmiddel, for eksempel 0,5 % v/v natriumhypokloritt, eller et annet egnet desinfeksjonsmiddel (32,).
- Dekontaminer og kast alle prøver, reagenser og annet potensielt kontaminert materiale i samsvar med nasjonale og lokale bestemmelser.

Etter denaturering og inkubering anses ikke prøvene lenger å være smittefarlige (34), men laboratoriepersonell skal fremdeles følge nasjonale og lokale forsiktighetsregler.

Natriumazid

Enkelte reagenser inneholder natriumazid. Natriumazid er rapportert å danne bly- eller kopperazid i laboratorienes rørsystemer. Disse azidene kan eksplodere ved støt eller slag, for eksempel fra hammer. Dannelse av bly- eller kopperazid kan forhindres ved å skylle avløpene grundig med vann etter avhending av løsninger som inneholder natriumazid. U.S. Occupational Safety and Health Administration anbefaler følgende for å fjerne kontaminasjon fra gamle avløp der man mistenker oppsamling av azider:

1. Led ut væske fra fellen ved bruk av en gummi- eller plastslange.
2. Fyll med 10 % v/v natriumhydroksidløsning.
3. La stå i 16 timer.
4. Skyll godt med vann.

Buffer N2

FORSIKTIG Risiko for sterkt reaktive forbindelser



Ikke tilsett klor eller sure løsninger direkte i en løsning eller avfall som inneholder Buffer N2.

Buffer N2 inneholder guanidinhydroklorid som kan danne svært reaktive sammensetninger når det kombineres med klor.

Hvis du søler væske som inneholder disse bufrene, må du rengjøre med egnet laboratorierengjøringsmiddel og vann. Hvis den sølte væsken inneholder potensielt smittefarlige stoffer, må det berørte området først rengjøres med laboratorierengjøringsmiddel og vann, og deretter med 1 % (v/v) natriumhypokloritt.

RCS-automatisert testing

Se Brukerhåndboken for Rapid Capture System (*Rapid Capture System User Manual*) for ytterligere advarsler og forsiktighetsregler som er spesifikke for bruken av dette systemet for testing med høyt prøvegjennomløp.

Sikkerhets- og risikosetninger for komponenter

Følgende risiko- og sikkerhetssetninger gjelder komponenter for *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testsettet

Wash Buffer Concentrate (Vaskebufferkonsentrat)



Inneholder: Sodium azide. Advarsel! Farlig ved svelging. Skadelig, med langtidsvirkning, for liv i vann. Unngå utslipp til miljøet. Innhold/ beholder leveres til godkjent avfallsanlegg.

Denaturation Reagent (Denatureringsreagens)



Inneholder: sodium hydroxide. Fare! Gir alvorlige etseskader på hud og øyne. Kan være etsende for metaller. Innhold/ beholder leveres til godkjent avfallsanlegg. VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen. VED HUDKONTAKT (eller håret): Tilsølte klær må fjernes straks. Skyll/dusj huden med vann. Kontakt umiddelbart et GIFTINFORMASJONSSENTER eller lege. Oppbevares innelåst. Benytt vernehansker/ verneklær/ vernebriller/ ansiktsskjerm.

Probe Diluent (Probefortynner)



Inneholder: acetic acid; Polyacrylic acid. Fare! Gir alvorlige etseskader på hud og øyne. Innhold/ beholder leveres til godkjent avfallsanlegg. VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen. VED HUDKONTAKT (eller håret): Tilsølte klær må fjernes straks. Skyll/dusj huden med vann. Kontakt umiddelbart et GIFTINFORMASJONSSENTER eller lege. Oppbevares innelåst. Benytt vernehansker/ verneklær/ vernebriller/ ansiktsskjerm.

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

Advarsel! Forårsaker mild hudirritasjon. Hvis det oppstår hudirritasjon: Få råd fra / oppsøk lege.

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

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

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


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

Negative Calibrator (negativ kalibrator)

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

Forsiktighetsregler

Brukeren må alltid overholde følgende forsiktighetsregler ved utførelse av *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen:

- Reagensene må ikke brukes etter utløpsdatoen angitt ved siden av -symbolet på ytteresken etikett eller utløpsdatoen for de klargjorte reagensene.
- Hvis testen utføres utenfor de angitte tids- og temperaturområdene, kan det produseres ugyldige resultater. Tester som ikke ligger innenfor de fastsatte tids- og temperaturområdene er ugyldige og må gjentas.
- *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testprosedyren, analysekalibrering, kvalitetskontroll og tolking av prøveresultater må følges nøye for å oppnå pålitelige testresultater.
- Det er viktig å pipettere det nøyaktige angitte reagentvolumet og å blande godt etter hver reagentstilsetning. Hvis dette ikke gjøres, kan det føre til feilaktige testresultater. Ved å kontrollere at de angitte fargeendringene inntreffer, bekrefter man at disse betingelsene er oppfylt.

- Med unntak av vaskebufferkonsentratet testes settets komponenter som en enhet. Ikke bytt om komponenter fra andre kilder eller fra ulike partier. Det er imidlertid akseptabelt å kombinere komponenter fra sett med samme partinummer for å få de nødvendige reagensvolum for å teste flere mikroplater i en enkelt RCS-kjøring.
- Nukleinsyrer er svært følsomme for nedbrytning av nuklease i miljøet. Nukleaser finnes på menneskehuden og på overflater eller materialer som håndteres av mennesker. Rengjør og dekk til arbeidsoverflater med et overflatedeksel til engangsbruk og bruk puddefrie hansker når du utfører alle testtrinn.
- Pass på å forhindre kontaminasjon av oppfangingsmikroplaten og deteksjonsreagens 2 (DR2) med eksogen alkalisk fosfatase mens testen utføres. Substanser som kan inneholde alkalisk fosfatase inkluderer deteksjonsreagens 1 (DR1), bakterier, spytt, hår og oljer fra huden. Det er spesielt viktig å dekke til oppfangingsmikroplaten etter vasketrinnet og under DR2-inkubasjonen, siden eksogen alkalisk fosfatase kan reagere med DR2 og produsere falskt positive resultater.
- Beskytt DR2 mot langvarig eksponering for direkte lys. Bruk DR2 rett etter alikvotering, og unngå direkte sollys.
- Prim repetisjonspipetten før reagenstillførsel, og se etter store luftbobler ved jevne mellomrom. Store mengder luftbobler i repetisjonspipettespissen kan forårsake unøyaktig tilførsel, og kan unngås ved å fylle pipetten, dispensere all væsken og fylle den på nytt. Se pipettens brukerhåndbok for spesifikke bruksanvisninger.
- Utfør flerkanalspipettering ved bruk av den motsatte pipetteringsteknikken (se "Hybrid-deteksjon", side 52) for å dispensere DR1 og DR2. Kontroller hver pipettespiss på den multikanals pipetten for riktig montering og fylling.
- Påse at hver oppfangingsmikroplatebrønn vaskes grundig (se "Vasking", side 54). Utilstrekkelig vasking fører til økt bakgrunn, og kan forårsake falskt positive resultater. Resterende vaskebuffer i oppfangingsmikroplatebrønnene kan føre til redusert signal eller dårlig reproduserbarhet.

Oppbevaring og håndtering av reagens

Komponenter i settet

Ved mottak må settet oppbevares ved 2–8 °C. Vaskebufferkonsentratet, denatureringsreagensen og indikatorfargestoffet kan oppbevares ved 2–30 °C, etter behov. Alle reagenser leveres ferdigblandet, bortsett fra denatureringsreagensen (DNR), probeblandingen og vaskebufferen.

Klargjorte reagenser

Etter klar gjøring er DNR stabil i 3 måneder 2–8 °C.

Når vaskebufferen er klar gjørt, er den stabil i 3 måneder ved 2–30 °C.

Ved testing av PreservCyt-prøve behandlet ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet eller QIASymphony DSP AXpH DNA-settet, er de åpne, udenaturerte kalibratorene og kvalitetskontrollene stabile i 3 måneder ved 2–8 °C.

Ved testing av prøver behandlet ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet, er den klar gjorte denatureringsreagens 2 (DNR2) stabil i 8 timer ved 15–30 °C.

Prøvetaking og -klargjøring

Samle inn og transporter cervikale og vaginale prøver for testing med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen ved bruk av en av følgende prøvetakingsenheter:

- *digene* HC2 DNA-prøvetakingsenhet (består av en cervical pensel og STM)
- Biopsiprøve samlet inn i *digene* STM
- En prøvetakingsenhet av kosttype eller bestående av en pensel-/spatelkombinasjon, plassert i PreservCyt-løsning eller SurePath-konserveringsmiddel

Prøver tatt med andre prøvetakingsenheter eller transportert i andre transportmedier er ikke kvalifisert for bruk med denne testen. Ytelseegenskapene til denne testen ble kun etablert med de angitte prøvetakingssettene.

digene HC2 DNA-prøvetakingsenhet må ikke brukes på gravide kvinner. Cervikale prøver må samles inn før påføring av eddiksyre eller jod hvis en kolposkopiundersøkelse utføres. Se bruksanvisningen for *digene* HC2 DNA-prøvetakingsenhet for ytterligere prosedyrer for prøvetaking og -håndtering.

Cervikale og vaginale prøver samlet inn i STM krever ikke prøvekonvertering før testing med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen. PreservCyt- og SurePath-prøver krever prøvekonvertering før testing med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen.

Cervikale og vaginale prøver i STM

Viktig: Ikke samle inn en cervical eller vaginal STM-prøve hvis det finnes høye konsentrasjoner av soppdrepende krem, sæddrepende gel eller skyllemiddel.

STM-prøver kan oppbevares i opptil 2 uker ved romtemperatur og sendt til testslaboratoriet uten nedkjøling. Send prøver i en isolert beholder med ett eller to døgnns frakt.

På testlaboratoriet må prøver oppbevares ved 2–8 °C hvis testen skal utføres innen 1 uke. Hvis testen vil utføres senere enn 1 uke, må du dekke til prøverørhettene med Parafilm og oppbevare prøver ved –20 °C i opptil 3 måneder. Når prøver tas ut av fryseren for testing, må hettene skiftes ut øyeblikkelig med skruhetter for prøverør.

Et konserveringsmiddel er tilsatt i STM for å hemme bakterievekst og for å bevare integriteten til DNAet. Det er ikke beregnet på å bevare levedyktigheten til organismer eller celler.

Cervicale biopsiprøver

Nylig innsamlede cervikale biopsiprøver med et tverrsnitt på 2–5 mm kan testes med digene HC2 High-Risk HPV DNA-testen. Ikke bruk biopsiprøver med diameter under 2 mm. Plasser biopsiprøven øyeblikkelig i 1,0 ml STM, dekk prøverørhettene med Parafilm for å unngå at hettene faller av, og oppbevar nedfrost ved –20 °C. Send biopsiprøver ved 2–30 °C for levering til testlaboratoriet over natten.

På testlaboratoriet skal de oppbevares ved –20 °C frem til behandling. Når prøver tas ut av fryseren for testing, må hettene skiftes ut øyeblikkelig med skruhetter for prøverør.

Cervikale prøver i PreservCyt-løsning

Viktig: Ikke samle inn en PreservCyt cervikal prøve for prøveklargjøring med QIASymphony DSP HPV Media-settet hvis det finnes høye konsentrasjoner av soppdrepende krem, vaginal smøregel eller blod.

Viktig: Ikke ta en PreservCyt cervikal prøve for prøveklargjøring med QIASymphony DSP AXpH DNA-settet hvis det finnes sæddrepende gel.

Ta prøver på rutinemessig måte og klargjør objektglassene med ThinPrep®-celleprøvene i samsvar med bruksanvisningen fra produsenten.

Etter innsamling kan PreservCyt-prøver oppbevares i opptil 3 måneder ved 2–30 °C før prøveklargjøring for *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen. PreservCyt-prøver kan ikke fryses.

Følgende metoder er tilgjengelige for prøveklargjøring:

- Automatisert prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony SP og QIASymphony DSP HPV Media-settet

Resultatet er en prøveekstrakt (som inneholder magnetpartikler, STM og DNR) som er klar til å fortsette til testens denatureringsstrinn.

- Automatisert prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony SP og QIASymphony DSP AXpH DNA-settet

Resultatet er et DNA-eluat som er klart til å fortsette til testens denatureringsstrinn.

- Manuell prøveklargjøring ved bruk av *digene* HC2 Sample Conversion-settet. Resultatet av manuell prøveklargjøring er en denaturert prøve som er klar til å fortsette til testens hybridiseringsstrinn.

Krav til prøvevolum er basert på prøveklargjøringsmetoden som følger:

- Automatisert prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP HPV-mediasettet krever 3 ml prøve
- Automatisert prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet krever 4 ml prøve
- Manuell prøveklargjøring ved bruk av *digene* HC2 Sample Conversion-settet krever minst 4 ml prøve

Prøver med mindre enn det påkrevde prøvevolumet etter at Pap-testen er klargjort, inneholder utilstrekkelig materiale og kan forårsake et falskt negativt resultat i *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen.

Cervikale prøver i SurePath-konserveringsmiddel

Viktig: Ikke samle inn en cervikal SurePath-prøve for prøveklargjøring med QIASymphony DSP HPV Media-settet hvis det finnes sæddrepende gel, soppdrepende krem eller antiinflammatorisk krem.

Samle inn prøver i SurePath-konserveringsmiddel i henhold til bruksanvisningen.

Prøveklargjøring av SurePath-prøver kan skje enten før oppstart av cytologiprosessering eller etter at cytologiprosessering er fullført.

Hvis det skjer før oppstart av cytologiprosessering, brukes en prøve fra den opprinnelige SurePath-prøven som ikke er blitt prosessert med en annen diagnostisk metode, inkludert BD PrepMate®-systemet og BD PrepStain® objektglassbehandler. I denne bruksanvisningen kalles disse prøvene "SurePath-prøver" for å unngå forvirring.

Hvis det skjer etter at cytologi-prosessering er fullført, brukes en prøve fra den resterende post-gradient-cellepelleten etter at en SurePath-prøve er klargjort i henhold til bruksanvisningen for BD PrepMate-systemet og BD PrepStain objektglassbehandler. I denne bruksanvisningen kalles disse prøvene "SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet" for å unngå forvirring.

Følgende metoder er tilgjengelige for prøveklargjøring:

- Automatisert prøveklargjøring av SurePath-prøver ved bruk av QIASymphony SP og QIASymphony DSP HPV Media-settet.

Resultatet er en denaturert prøveekstrakt (som inneholder magnetpartikler, STM og DNR) som er klar til å fortsette til testens hybridiseringstrinn.

- Automatisert prøveklargjøring av SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet ved bruk av QIASymphony SP og QIASymphony DSP HPV Media-settet.

Resultatet er en denaturert prøveekstrakt (som inneholder magnetpartikler, STM og DNR) som er klar til å fortsette til testens hybridiseringstrinn.

- Manuell prøveklargjøring av SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet.

Resultatet av manuell prøveklargjøring er en denaturert prøve som er klar til å fortsette til testens hybridiseringstrinn.

Krav til prøvevolum er basert på prøveklargjøringsmetoden som følger:

- Automatisert prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet krever 950 µl
- Manuell prøveklargjøring krever 2,8 ml av SurePath-prøve med post-gradient-cellepellet

Bruk av et mindre volum enn det som er påkrevd, kan forårsake et falskt negativt resultat i *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen.

Automatisert klargjøring av SurePath-prøver

Etter innsamling kan SurePath-prøver oppbevares i opptil 4 uker ved 5–25°C før prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony SP og QIASymphony DSP HPV Media-settet. SurePath-prøven som brukes, må ikke være prosessert med andre diagnostiske metoder, inkludert BD PrepMate og BD PrepStain objektglassbehandler. Automatisert prøveklargjøring krever 950 µl av SurePath-prøven.

Automatisert prøveklargjøring av SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet

Viktig: Rett etter klargjøring av SurePath Pap-objektglass må 2,0 ml av SurePath-konserveringsmiddel pipetteres inn i sentrifugerøret som inneholder post-gradient-cellepelleten. Dette bevarer pelletsens integritet for utførelse av *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen.

Post-gradient-cellepelleten med SurePath-konserveringsmiddel kan oppbevares i opptil 4 uker ved 5–25 °C før prøveklargjøring for *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen. Automatisert prøveklargjøring krever 950 µl av SurePath-prøven med post-gradient-cellepellet.

Manuell prøveklargjøring av SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet

Viktig: Rett etter klargjøring av SurePath Pap-objektglass må 2,0 ml av SurePath-konserveringsmiddel pipetteres inn i sentrifugerøret som inneholder den resterende cellepelleten. Dette bevarer pelletsens integritet for utførelse av *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen.

Post-gradient-cellepelleten med SurePath-konserveringsmiddel kan oppbevares i opptil 4 uker ved 2–30 °C før prøveklargjøring for *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen.

SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet klargjøres som angitt i denne bruksanvisningen. Resultatet av manuell prøveklargjøring er en denaturert prøve som er klar til å fortsette til testens hybridiseringstrinn.

Prosedyre

Nødvendige tiltak før du starter

- For manuell testing, gi Microplate Heater I minst 60 minutter for å nå $65\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ fra en kaldstart. Hvis du ikke setter av tid til denne oppvarmingsperioden, kan det føre til at hybridiseringsmikroplaten smelter. Se brukerhåndboken for Microplate Heater I (*Microplate Heater I User Manual*) for ytterligere instruksjoner.
- Hvis du bruker et vannbad under denaturerings- og hybridiseringstrinnene, må du påse at vannbadet er 65 °C og at vannivået er tilstrekkelig til å senke hele prøvevolumet ned i røret.

Klargjøring av reagens

- Ta prøvene og alle påkrevde reagenser ut av kjøleskapet før testen startes. La dem nå $20\text{--}25\text{ °C}$ i $15\text{--}30$ minutter. Klargjør PreservCyt- og SurePath-prøver før romtemperering av eventuelle tidligere denaturerte prøver og reagenser.
- Hvis du kombinerer ferdigblandede reagenser for en RCS-kjøring med flere plater, må du blande de individuelle flaskene grundig og deretter kombinere det relevante reagensvolumet i et rent, konusformet polypropylenrør til engangsbruk.
- For manuell testing klargjøres vaskebufferen og probeblandingsreagensene under bestemte trinn i testingen. For RCS-automatisert testing må alle reagenser klargjøres før du starter RCS-kjøringen, og plasseres på RCS-dekket.
- Klargjør DNR og DNR2 ved behov før klargjøring av andre reagenser.
- Kast alle klargjorte reagenser (med mindre annet er angitt) og reagensalikvoter på slutten av testen.
- Bruk tabell 1–5 nedenfor for å bestemme volumet som er påkrevd for hver reagens basert på antallet tester/mikroplater og testmetoden. Volum for RCS-automatisert testing inkluderer reagensens dødvolum som er påkrevd av instrumentet.

Tabell 1. Påkrevde volum av klargjorte og ferdigblandede reagenser for manuell testing av STM-prøver og manuelt klargjorte PreservCyt- og SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet

Antall tester/strimler	Probeblanding	Vaskebuffer	DR1	DR2
24/3	1.04 ml	>1 liter	3 ml	3 ml
48/6	2.08 ml	>1 liter	5 ml	5 ml
72/9	3.12 ml	>1 liter	7 ml	7 ml
96/12	4.16 ml	>1 liter	12 ml	12 ml

Tabell 2. Påkrevde volum av klargjorte og ferdigblandede reagenser for RCS-automatisert testing av STM-prøver, manuelt klargjorte PreservCyt- og SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet samt SurePath-prøver og SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet klargjort ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet

Antall mikroplater	Probeblanding	Vaskebuffer	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

Tabell 3. Påkrevde volum av klargjorte og ferdigblandede reagenser for RCS-automatisert testing av PreservCyt-prøver klargjort ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet

Antall mikroplater	DNR	Probeblanding	Vaskebuffer	DR1	DR2
≤1	2.2 ml	5.20 ml	3 liter	10 ml	10 ml
≤1.5	2.2 ml	6.24 ml	3 liter	14 ml	14 ml
≤2	2.4 ml	8.32 ml	3 liter	18 ml	18 ml
≤2.5	2.4 ml	9.36 ml	6 liter	22 ml	22 ml
≤3	2.6 ml	10.40 ml	6 liter	26 ml	26 ml
≤3.5	2.6 ml	12.48 ml	6 liter	30 ml	30 ml
≤4	2.8 ml	13.52 ml	6 liter	34 ml	34 ml

Tabell 4. Påkrevde volum av klargjorte og ferdigblandede reagenser for manuell testing av PreservCyt-prøver klargjort ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet

Antall tester/stimler	DNR	DNR2	Probeblanding	Vaskebuffer	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

Tabell 5. Påkrevde volum av klargjorte og ferdigblandede reagenser for RCS-automatisert testing av PreservCyt-prøver klargjort ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet

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

Denatureringsreagens

Settet med 1 plate leveres med 50 ml denatureringsreagens, og settet med 4 plater leveres med 2 x 100 ml denatureringsreagens. Sørg for å klargjøre DNR i henhold til volumet som leveres i det aktuelle settet.

Merknader:

- Når DNR er klargjort, er den stabil i 3 måneder ved 2–8 °C.
- Hvis fargen blekner, må du tilsette 3 ekstra dråper indikatorfargestoff og blande grundig før bruk.

Flaske med 50 ml

1. Tilsett 5 dråper indikatorfargestoff i flasken med 50 ml denatureringsreagens.
2. Bland grundig.
DNR skal være en enhetlig, mørk lilla farge.
3. Merk DNR med den nye utløpsdatoen.

Flaske med 100 ml

1. Tilsett 10 dråper indikatorfargestoff i flasken med 100 ml denatureringsreagens.
2. Bland grundig.
DNR skal være en enhetlig, mørk lilla farge.
3. Merk DNR med den nye utløpsdatoen.

Denatureringsreagens 2

Merk: DNR2 er kun påkrevd for testing av preservCyt-prøver klargjort ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet.

1. Merk et rent, konusformet polypropylenrør til engangsbruk som "DNR2".
2. Tilsett det påkrevde volumet av buffer N2 (se tabell 6 under) i den merkede beholderen.

Tabell 6. Klargjøring av DNR2

Påkrevd volum av DNR2	Volumbuffer N2	Volumbuffer D2	Indikatorfargestoff
1.0 ml	0.4 ml	0.6 ml	1–2 dråper
2.0 ml	0.8 ml	1.2 ml	1–2 dråper
2.5 ml	1.0 ml	1.5 ml	1–2 dråper
5.0 ml	2.0 ml	3.0 ml	1–2 dråper
5.5 ml	2.2 ml	3.3 ml	1–2 dråper
6.5 ml	2.6 ml	3.9 ml	1–2 dråper
7.7 ml	3.1 ml	4.6 ml	1–2 dråper
8.8 ml	3.5 ml	5.3 ml	1–2 dråper
10.0 ml	4.0 ml	6.0 ml	1–2 dråper
11.0 ml	4.4 ml	6.6 ml	1–2 dråper

3. Tilsett det påkrevde volumet av buffer D2 (se tabell 6 over) i den merkede beholderen.
4. Tilsett den påkrevde mengden fargestoff (se tabell 6 over) i den merkede beholderen.

Merk: Bruk indikatorfargestoffet som følger med digene HC2 High-Risk HPV DNA-testsettet.

5. Roter i minst 10 sekunder.

Merk: Når DNR2 er klargjort, er den stabil i 8 timer ved 15–30 °C.0.

Probeblending

- For manuell testing må probeblandingen klargjøres under denatureringsinkubasjon av prøven (se "Denaturering av kalibratorer, kvalitetskontroller og STM-prøver" side 45, eller "Denaturering av kalibratorer, kvalitetskontroller og DNA-eluatet for manuell testing.", side 43 ved behov).
- Vær ekstremt forsiktig med å unngå RNase-kontaminasjon. Bruk pipettespisser med aerosolbarriere når du pipetterer prøber.

- Probefortynneren er viskøs. Påse at en synlig vorteks oppnås ved klargjøring av probeblandingen. Ufullstendig blanding kan føre til et redusert signal.
 - Hvis du kombinerer flere hetteglass av proben til RCS-automatisert testing, må du samle proben i ett hetteglass ved å pipettere.
1. For å unngå at proben samles opp i hetteglasslokket, må hvert hetteglass med probe sentrifugeres raskt for å bringe væsken til bunnen av hetteglasset.
 2. Bank forsiktig på hetteglasset for å blande.
 3. Bestem mengden av påkrevd probeblanding:

Anbefaling: Lag ekstra probeblanding for å ta høyde for volumet som kan gå tapt i pipettespissene eller på siden av hetteglasset. Volumene angitt i ovenstående tabell 1–5 inkluderer det anbefalte ekstra volumet.

Manuell testing: Bestem volumene som kreves for en 1:25 fortytning av probe i probefortynneren som klargjør probeblandingen (25 µl/test). Volumene oppgis i Tabell 1, side 31, og Tabell 4, side **Error! Bookmark not defined.**, ved behov.

RCS-automatisert testing: Bruk volumene oppgitt i Tabell 2, side 32, Tabell 3, side **Error! Bookmark not defined.**, eller Tabell 5, side **Error! Bookmark not defined.**, ved behov.
 4. Merk en ny engangsbeholder som "Høyrisiko-HPV-probeblanding".

Avhengig av antallet tester, anbefales enten et 5 ml eller 15 ml polypropylenrør med hette og rund bunn.
 5. Tilsett det påkrevde volumet av probefortynner (se tabell 7 under) i det merkede røret.
 6. Pipetter den påkrevde mengden høyrisiko-HPV-probe inn i probefortynneren (se tabell 7, under) ved å plassere pipettespissen mot den innvendige veggen i røret rett over menisken, og drive ut innholdet.

Viktig: Ikke senk spissen ned i probefortynneren

Tabell 7. Klargjøring av probeblanding

Påkrevd volum av probeblanding	Volumprobefortynner	Volum av høyrisiko-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. Roter i minst 5 sekunder ved maksimal hastighet for å blande grundig.
En synlig vorteks må produseres.

Vaskebuffer

- For manuell testing må du klargjøre vaskebufferen under hybridoppfangningstrinnet (se "Hybridoppfangning", side 51).
- For å minimere eksponering må du tilsette vann i vaskebufferkonsentratet ved klargjøring.
- For den manuelle metoden for mikroplatevasking må du klargjøre 3 liter vaskebuffer i vaskeapparatet.

Anbefaling: Hver 3. måned, rengjør vaskeapparatet og slangene med 0,5 % natriumhypoklorittløsning og skyll grundig med destillert eller deionisert vann for å forhindre mulig kontaminasjon fra alkalisk fosfatase som finnes i bakterier og muggsopper.

- For Automated Plate Washer må du klargjøre vaskebufferen og oppbevare den i en tildekt beholder, eller klargjøre 1 liter som plasseres i vaskebeholderen til Automated Plate Washer.
 - For RCS-automatisert testing må du klargjøre den angitte mengden (se Tabell 2, side 32, Tabell 3, side **Error! Bookmark not defined.**, eller Tabell 5, side **Error! Bookmark not defined.** ved behov) i RCS-vaskeflasken.
1. Bland vaskebufferkonsentratbrønnen og tilsette påkrevd volum av vaskebufferkonsentrat (se tabell 8, under) i den angitte beholderen.
 2. Tilsett det påkrevde volumet av destillert eller avionisert vann (se tabell 8 under) i den merkede beholderen.

Tabell 8. Klargjøring av vaskebuffer

Påkrevd volum av vaskebuffer	Volum av vaskebufferkonsentrat	Volum av destillert eller avionisert vann
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. Plasser et rent, lofritt papirhåndkle over eventuelle åpninger i beholderen, og bland godt.
4. Forsegle beholderen for å forhindre kontaminasjon eller fordamping, eller plasser på det respektive instrumentet ved behov.
5. Merk vaskebufferen med den nye utløpsdatoen.

Merk: Når vaskebufferen er klarlagt, er den stabil i 3 måneder ved 2–30 °C.

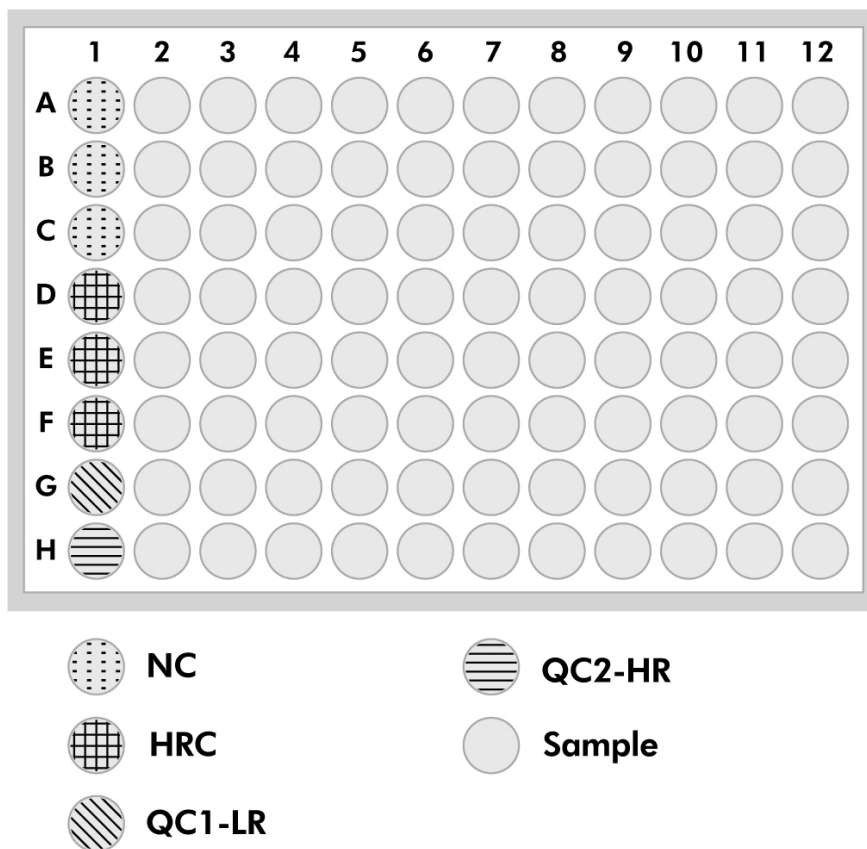
Opprette plateoppsett

1. Opprett et plateoppsett ved bruk av *digene* analyseprogramvare med *digene* analyseprotokoller for HPV.

Se brukerhåndboken for den relevante programvaren for instruksjoner om å opprette et plateoppsett med riktige posisjoner for kalibratorer, kvalitetskontroller og prøver.

Merknader:

- Kalibratorene, kvalitetskontrollene og prøvene kjøres i en kolonnekonfigurasjon med 8 brønner.
- Test kalibratorene og kvalitetskontroller i følgende posisjoner på mikroplaten (se Figur 1, side 38):
 - Negative kalibrator (NC)-replikater i mikroplatebrønn A1, B1, C1
 - Høyrisiko-HPV-kalibrator (HRC)-replikater i mikroplatebrønn D1, E1, F1
 - Lavrisiko-HPV-kvalitetskontroll (QC1-LR) i mikroplatebrønn G1
 - Høyrisiko-HPV-kvalitetskontroll (QC2-HR) i mikroplatebrønn H1



Figur 1: Posisjon av kalibratorer, kvalitetskontroller og prøver på mikroplaten.

Viktig: Når du utfører RCS-automatisert testing må du bruke RCS-spesifikke analyseprotokoller for å opprette plateoppsettet og generere resultater. De definerte parametrene til de RCS-spesifikke analyseprotokollene skiller seg fra de for manuell testing av analyseprotokoller (se "Cutoff-beregning", side 60).

2. Plasser kalibratorer, kvalitetskontroller og prøver som skal testes i et prøverørstativ eller prøvestativ i rekkefølgen de skal testes i.

Viktig: Når du utfører RCS-automatisert testing, er det avgjørende at plateoppsettet tilsvarer de riktige testede prøvene for å forhindre at det rapporteres unøyaktige prøveresultater. For hvert anvendte prøvestativ og lokk må du bekrefte at serienumrene stemmer overens med og, ved behov, merke hvert prøvestativ og lokk i rekkefølgen de skal testes på RCS. Bruk en markør og etikett som ikke vil vaskes av i vannbadet på 65 °C.


Prøveklargjøring

PreservCyt- og SurePath-prøver krever prøveklargjøring før testing med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen. Avhengig av typen prøveklargjøring som utføres er de klargjorte prøvene klare for ulike trinn i *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen.

Følgende metoder er tilgjengelige for prøveklargjøring:


- Automatisert prøveklargjøring av PreservCyt-prøver ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet.
- Automatisert prøveklargjøring av SurePath-prøver og post-gradient-cellepelleter ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet.
- Automatisert prøveklargjøring av PreservCyt-prøver ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet.
- Manuell klargjøring av PreservCyt-prøver
- Manuell prøveklargjøring av SurePath-post-gradient-cellepelleter

Prøveklargjøring av PreservCyt-prøver ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet.


 Se Bruksanvisning (håndbok) for QIASymphony DSP HPV Media-settet (*QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)*) for instruksjoner om å klargjøre PreservCyt-prøver ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet.

Viktig: Prøveekstraktene som produseres som følge av prøveklargjøring av PreservCyt-prøver ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet kan kun testes ved bruk av RCS. Manuell ytelse av testen med prøveekstrakter er ikke validert.

Resultatet fra prøveklargjøring av PreservCyt-prøver ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet er prøveekstrakter i en hybridiseringsmikroplate med den første kolonnen tom. Prøveekstraktene inneholder magnetpartikler, STM og DNR, og er klare for RCS-automatisert testing ved denatureringstrinnet. Kalibratorene, kvalitetskontrollene og prøveekstraktene denatureres samtidig i hybridiseringsmikroplaten under RCS-automatisert testing (se "Denaturering og hybridisering av prøver klargjort ved bruk av QIASymphony SP", side 42).


 Når du utfører RCS-automatisert testing av DNA-eluat, må du se Brukerhåndbok for Rapid Capture System – utføre *digene* HC2 DNA-tester ved bruk av QIASymphony SP-behandlede prøver (*Rapid Capture System User Manual – Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*) for instruksjoner for å fullføre testingen.

Automatisert prøveklargjøring av SurePath-prøver og SurePath-post-gradient-cellepelleter ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet


 Se *Bruksanvisning (håndbok) for QIASymphony DSP HPV Media-settet* for instruksjoner om å klargjøre SurePath-prøver og SurePath-prøver med post-gradient-cellepelleter ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet.

Viktig: Prøveekstraktene som produseres som følge av prøveklargjøring av SurePath-prøver ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet kan kun testes ved bruk av RCS. Manuell ytelse av testen med prøveekstrakter er ikke validert.

Resultatet av prøveklargjøring av SurePath-prøver og SurePath-postgradient-cellepelleterprøver ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet er kalibratorer, kvalitetskontroller og prøveekstrakter i en hybridiseringsmikroplate som er klar til RCS-automatisert testing ved testens hybridiseringstrinn.


 Når du utfører RCS-automatisert testing av DNA-eluatere, må du se Brukerhåndbok for Rapid Capture System – utføre *digene* HC2 DNA-tester ved bruk av QIASymphony SP-behandlede prøver (*Rapid Capture System User Manual – Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*) for instruksjoner for å fullføre testingen.

Prøveklargjøring av PreservCyt-prøver ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet.

 Se håndboken for QIASymphony DSP AXpH DNA-settet (*QIASymphony DSP AXpH DNA Kit Handbook*) for instruksjoner for prøveklargjøring av PreservCyt-prøver.

Resultatet fra prøveklargjøring av PreservCyt-prøver ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet er DNA-eluatere i en hybridiseringsmikroplate med den første kolonnen tom. DNA-eluatere er klare for testens denatureringstrinn. Kalibratorene, kvalitetskontrollene og DNA-eluatene denatureres samtidig på hybridiseringsmikroplaten (se "Denaturering og hybridisering av prøver klargjort ved bruk av QIASymphony SP", side 42).

Manuell klargjøring av PreservCyt-prøver

 Se bruksanvisningen for *digene* HC2 Sample Conversion-settet for manual sample preparation of PreservCyt specimens.

Manuell prøveklargjøring av PreservCyt-prøver ved bruk av *digene* HC2 Sample Conversion-settet fører til prøver som er klare for hybridiseringstrinnet i testen. Klargjør kalibratorer og

kvalitetskontroller hver for seg (se "Denaturering av kalibratorer, kvalitetskontroller og STM-prøver", side 45).

Manuell prøveklargjøring av SurePath-post-gradient-cellepelleter

Manuell prøveklargjøring av SurePath-post-gradient-cellepelleter fører til prøver som er klare for hybridiseringstrinnet i testen. Klargjør kalibratorer og kvalitetskontroller hver for seg (se "Denaturation of calibrators, quality controls and STM specimens" på side **Error! Bookmark not defined.**).

Viktig: Hvis post-gradient-cellepelleten i SurePath-prøven ser ut til å inneholde mindre enn 1 ml, er ikke post-gradient-cellepelleten egnet for testing med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen siden SurePath-konserveringsmidlet ikke ble tilsatt etter cytologi.

1. Romtemperer SurePath-post-gradient-cellepelleter og bekreft at det observerte væskevolumet tilsvarer omtrent 2,8 ml.
2. Sentrifuger SurePath-post-gradient-cellepelleter i en rotor med "svingbøtte" ved $800 \pm 15 \times g$ i 10 ± 1 minutt.
3. Fjern rørene fra sentrifugen.
4. Rett etter sentrifugering må du helle supernatanten forsiktig og tørke hvert rør omtrent 3 ganger på Kimtowels-servietter eller tilsvarende lofrie papirservietter for å fjerne overflødig væske. Observer pelleten i hvert rør.

Viktig: Ikke la cellepelleter gli ned i røret under tørking.

5. Plasser rørene i stativet.
6. Tilsatt 200 µl STM i hver pellet ved bruk av en repetisjons- eller enkeltkanalspipette.
7. Resuspender hver pellet ved å rotere hvert rør enkeltvis i 15 sekunder ved høy hastighet. Hvis pelleten har problemer med å resuspenderes, må du rotere i ytterligere 5–30 sekunder eller til pelletene flyter løs fra bunnen av røret og ser ut til å løses opp.

Merk: Rør kan blandes uten å lukkes med hetter.

8. Pipetter 100 µl DNR i hver SurePath-prøve ved bruk av en repetisjons- eller enkeltkanalspipette.

Viktig: Pass på at du ikke berører sidene av røret, da dette kan føre til krysskontaminasjon av prøver.

9. Bland hvert rør grundig ved å rotere enkeltvis, ved høy hastighet, i 5 sekunder.

Merk: Rør kan blandes uten å lukkes med hetter.

10. Merk *digene* HC2 Sample Conversion-rør eller 15 ml konusformede rør med relevant prøveidentifikasjon og -type (for eksempel "SP" for en SurePath-prøve), og plasser rørene i et rørstativ.

Merk: For RCS-automatisert testing må *digene* HC2 Sample Conversion-rør brukes.

11. Overfør hele volumet til det relevante 15 ml konusformede røret ved bruk av en 7 ml overføringspipette til engangsbruk med standardspiss eller tilsvarende.

12. Sett hetter på de konusformede rørene og plasser dem i et rørstativ.

13. Inkuber rørene i et 65 ± 2 °C vannbad i 90 ± 5 minutter.

Merk: Denne inkubasjonstiden er lengre enn det som kreves for andre prøvetyper.

Hvis testing vil fullføres på samme dag, må du denaturere kalibratorene og kvalitetskontrollene (se "Denaturering av kalibratører, kvalitetskontroller og STM-prøver", side 45).

14. Ta rørstativet ut av vannbadet etter inkubasjonen.

Hvis du bruker et prøvestativ, må det ikke få kjøles ned før du fjerner stativlokket. Fortsett med testingen umiddelbart eller fjern stativlokket og DuraSeal-rørforseglerfilmen.

Merk: Hvis prøvestativet kjøles ned, kan rørene sette seg fast i stativlokket og søles.

De klargjorte SurePath-prøvene kan:

- Testes omgående (fortsett til "Hybridization of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples" på side 48)
- Oppbevares (se "Optional stop point of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples" på side 47)

Denaturering og hybridisering av prøver klargjort ved bruk av QIASymphony SP


Resultatet av å klargjøre prøver på QIASymphony SP er en hybridiseringsmikroplate som minst inneholder de klargjorte prøvene.

Hvis PreservCyt ble klargjort ved bruk av QIASymphony SP, er den første kolonnen på hybridiseringsmikroplaten tom. Innholdet på mikroplaten er klart for testens denatureringstrinn. Kalibratorene og kvalitetskontrollene tilsettes i hybridiseringsmikroplaten enten manuelt eller under RCS-automatisert testing, og deretter utføres denatureringstrinnet.

Hvis SurePath-prøver eller SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet ble klargjort ved bruk av QIASymphony SP, inneholder platen de klargjorte prøvene med de denaturerte kalibratorene og

kvalitetskontrollene pipettert i den første kolonnen på hybridiseringsmikroplaten. Innholdet på mikroplaten er klart for RCS-automatisert testing i testens denatureringstrinn.

Important: Prøveekstraktene som produseres som følge av prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet, kan kun testes ved bruk av RCS. Manuell ytelse av testen med prøveekstrakter er ikke validert.

 Når du utfører RCS-automatisert testing av DNA-eluat, må du se Brukerhåndbok for Rapid Capture System – utføre *digene* HC2 DNA-tester ved bruk av QIASymphony SP-behandlede prøver (*Rapid Capture System User Manual – Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*) for instruksjoner for å fullføre testingen.

Denaturering av kalibratører, kvalitetskontroller og DNA-eluat for manuell testing.

- Denne prosedyren er for manuell testing av PreservCyt-prøver klargjort ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet. Når du utfører RCS-automatisert testing, må du se Brukerhåndbok for Rapid Capture System – utføre *digene* HC2 DNA-tester ved bruk av QIASymphony SP-behandlede prøver (*Rapid Capture System User Manual – Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*) for instruksjoner for å fullføre testingen.
- Denaturering av kalibratører og kvalitetskontroller utføres ved bruk av DNR, mens denaturering av DNA-eluatene utføres ved bruk av DNR2.

1. Roter hver kalibrator og kvalitetskontroll i 10 sekunder ved den maksimale innstillingen.
2. Vend hvert rør for å få ut materiale fra hetten til røret.
3. Fjern hettene fra kalibrator- og kvalitetskontrollrørene, og kast dem.
4. Ved bruk av en enkeltkanalspipette, tilsett 50 µl av den aktuelle kalibratoren eller kvalitetskontrollen i bunnen av den tomme hybridiseringsmikroplatebrønnen i samsvar med det opprettede plateoppsettet.

Hvis kalibratoren og kvalitetskontrollene skal brukes til ytterligere testing, må rørene lukkes med nye skruhetter for prøverør, merkes med en ny utløpsdato, og oppbevares ved 2–8 °C.

Merk: Åpnede udenaturete kalibratører og kvalitetskontroller er stabile i 3 måneder ved 2–8 °C.

5. Roter den klargjorte DNR og DNR2 grundig, og alikvoter hver inn i en riktig merket reagensbeholder til engangsbruk.

Viktig: Pass på å tilsette riktig reagens i riktig kolonne av eluatmikroplaten.

6. Ved bruk av en 8-kanals pipette, tilsett 25 µl DNR i første kolonne av hybridiseringsmikroplaten som inneholder kalibratorene og kvalitetskontrollene.

7. Ved bruk av en 8-kanals pipette, tilsett 25 µl DNR2 i hver hybridiseringsmikroplatebrønn som inneholder et DNA-eluat.
8. Dekk hybridiseringsmikroplaten med et mikroplatelokk og ryst i 30 sekunder med Rotary Shaker I innstilt ved 1100 ± 100 rpm.
9. Plasser mikroplaten i Microplate Heater I temperert til 65 ± 2 °C, og pass på at den ikke spruter. Inkuber hybridiseringsmikroplaten i 45 ± 5 minutter.
Klargjør probeblandingen under denne inkubasjonen (se "Probeblending", side 34).
10. Fjern hybridiseringsmikroplaten fra Microplate Heater I.
De denaturerte kalibratorene, kvalitetskontrollene og DNA-eluatene kan:
 - Oppbevares (se "Valgfritt stoppunkt for DNA-eluator", side 44)
 - Testes omgående (fortsett til "Hybridisering av DNA-eluator", side 44)

Valgfritt stoppunkt for DNA-eluator

Denaturerte DNA-eluator, deriblant kalibratorer og kvalitetskontroller, kan oppbevares dekt med et mikroplatelokk ved 2–8 °C i 2 uker

Hybridisering av DNA-eluator

1. Hvis hybridiseringsmikroplaten som inneholder de denaturerte kalibratorene, kvalitetskontrollene og DNA-eluator har vært oppbevart, må du fjerne mikroplatelokket og la hybridiseringsmikroplaten romtempereres til 20–25 °C.
2. Roter probeblandingen grundig og alikvoter inn i en reagensbeholder til engangsbruk.
3. Pipetter 25 µl av probeblandingen forsiktig inn i hver hybridiseringsmikroplatebrønn ved bruk av en 8-kanals pipette og nye spisser for hver tilsetning av probeblending.
Unngå oppsprut og berøring av sidene av hybridiseringsmikroplatebrønnene.
4. Dekk hybridiseringsmikroplaten med et mikroplatelokk og ryst i 3 ± 2 minutter med Rotary Shaker I innstilt ved 1100 ± 100 rpm.
Etter rysting må kalibratorene, kvalitetskontrollene og DNA-eluatene bli gule.
Prøver som forblir lilla har kanskje ikke fått riktig mengde probeblending. Tilsett ytterligere 25 µl probeblending i prøvene som forblir lilla, og ryst på nytt. Hvis en prøve forblir lilla når denne prosedyren er fullført, må prøven testes på nytt.
5. Plasser mikroplaten i Microplate Heater I temperert til 65 ± 2 °C, og pass på at den ikke spruter. Inkuber hybridiseringsmikroplaten i 60 ± 5 minutter.
6. Fortsett til "Hybridoppfanging" side 51, for å fortsette testingen.0.

Denaturering og hybridisering av STM-prøver og manuelt klargjorte PreservCyt-prøver og SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet

- Ved testing av manuelt klargjorte PreservCyt-prøver og SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet er ikke denatureringstrinnet påkrevd for prøvene. Kalibratorene og kvalitetskontrollene som er påkrevd med testen denatureres imidlertid i samsvar med instruksjonene nedenfor.
- Enkelte STM-prøver kan inneholde blod eller annet biologisk materiale som kan maskere fargeendringer ved tilsetning av DNR. Prøver som utviser en mørk farge før tilsetning av DNR gir ikke nødvendigvis riktig fargeendring i dette trinnet. I disse tilfellene vil ikke fravær av riktig fargeendring påvirke testresultatene. Riktig blanding kan bekreftes ved å observere fargeendringen til kalibratorene og kvalitetskontrollene.

Denaturering av kalibratører, kvalitetskontroller og STM-prøver

- Prøvetakingsenheten må ikke fjernes fra prøverøret på noe tidspunkt.
 - For å unngå falskt positive resultater er det avgjørende at alt prøvemateriale kommer i kontakt med DNR. Blanding etter tilsetning av DNR er et avgjørende trinn.
 - STM-prøver som er denatureert med MST Vortexer 2-metoden, må bruke metoden "Hybridisering ved bruk av en mikroplate og Microplate Heater 1" på side **Error! Bookmark not defined.**.. Metoden "Hybridisering ved bruk av mikrorør og vannbad" (side **Error! Bookmark not defined.**) er ikke validert med STM-prøver som er blitt denatureert med MST Vortexer 2.
1. Ta av og kast hettene fra rørene.
Viktig: Hetter som fjernes fra STM-prøverør skal anses som potensielt smittefarlige (se "Advarsler og forsiktighetsregler" side 21, for mer informasjon).
 2. Pipetter det angitte volumet (se tabell 9, under) av DNR inn i rørene ved bruk av en repetisjonspipette eller justerbar pipette.

Pass på at du ikke berører sidene av rørene, da dette kan føre til krysskontaminasjon av prøver.

Viktig: Settet med 1 plate og settet med 4 plater har ulike volum for High-Risk HPV-kalibratoren. Sørg for å tilsette riktig volum av DNR.

Merk: Volumet av DNR som tilsettes tilsvarer halvparten av væskevolumet i røret.

Tabell 9. Tilsetning av DNR

Kalibrator, kvalitetskontroll eller STM-prøve	Påkrevd DNR-volum
Negativ kalibrator, 2 ml	1000 µl
Høyrisiko-HPV-kalibrator, 1 ml	500 µl
Høyrisiko-HPV-kalibrator, 2 ml	1000 µl
Lavrisiko-HPV- eller høyrisiko-HPV-kvalitetskontroll, 1 ml	500 µl
STM-prøve, 1 ml	500 µl

3. Bland rørene ved hjelp av enten MST Vortexer 2-metoden eller den manuelle, individuelle rørroteringsmetoden.

MST Vortexer 2-metode

- a. Dekk rørene med DuraSeal-rørforseglerfilm ved å trekke filmen over rørene i prøvestativet.
- b. Plasser stativlokket over de filmdekte rørene og lås på plass med de 2 sideklemmene. Skjær filmen med skjæreenheten.
- c. Flytt spaken med rødt håndtak til OPP-stilling slik at den er horisontal.
- d. Plasser prøvestativet sikkert innenfor styreinnevingene på MST Vortexer 2, med hjørnet av stativet med største innsnitt plassert i hjørnet foran til høyre. Sikre prøvestativet ved å flytte spaken med rødt håndtak til "ned"-stilling slik at den er vertikal.
- e. Påse at hastighetsinnstillingen er 100 (maksimal hastighet) og at strømmen til MST Vortexer 2 er PÅ.
- f. Roter rørene i 10 sekunder.
- g. Slå AV MST Vortexer 2.
- h. Fjern prøvestativet fra MST Vortexer 2 ved å flytte spaken med rødt håndtak til oppstilling.

Manuell, individuell rørroteringsmetode

- a. Lukk rørene med nye skruhetter for prøverør.
 - b. Bland hvert rør grundig ved å rotere enkeltvis, ved høy hastighet, i 5 sekunder.
- Viktig:** Under blanding må det observeres en synlig vorteks med væske som vasker hele den innvendige overflaten av røret.

- c. Vend hvert rør én gang for å vaske innsiden av røret, hetten og kanten.
- d. Sett røret tilbake i stativet.

Væsken i røret skal bli lilla.

4. Inkuber rørene i et stativ i et 65 ± 2 °C vannbad i 45 ± 5 minutter.

For manuell testing, klargjør probeblandingen under denne inkubasjonen (se "Probeblending", side 34).

5. Ta rørene ut av vannbadet etter inkubasjonen.

Hvis du bruker et prøvestativ, må det ikke få kjøles ned før du fjerner stativlokket. Fortsett med testingen umiddelbart eller fjern stativlokket og DuraSeal-rørforseglerfilmen.

Merk: Hvis prøvestativet kjøles ned, kan rør sette seg fast i stativlokket og søles.

De denaturerte kalibratorene, kvalitetskontrollene og STM-prøvene kan:

- Oppbevares (se "Optional stop point of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples" på side 47)
- Testes omgående (fortsett til "Hybridization of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples" på side 48)

Valgfritt stoppunkt for klargjorte STM-prøver og manuelt klargjorte PreservCyt-prøver og SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet


Viktig: Denaturerte prøver må ikke oppbevares eller sendes på tørris.

Alle klargjorte prøver, deriblant kalibratorer og kvalitetskontroller, kan oppbevares ved 2–8 °C over natten eller ved –20 °C i opptil 3 måneder. Maksimalt 3 fryse-tine-sykluser kan utføres med maksimalt 2 timer ved romtemperatur i løpet av hver tinesyklus.

For oppbevaring over natten ved 2–8 °C i prøvestativet må du dekke prøvene med DuraSeal-rørforseglerfilm og sette på stativlokket igjen.

For oppbevaring ved –20 °C i prøvestativet, fjern stativlokket og DuraSeal-rørforseglerfilmen og sett en korrekt hette på rørene.

Hybridisering av klargjorte STM-prøver og manuelt klargjorte PreservCyt-prøver og SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet

 Når du utfører RCS-automatisert testing av STM-prøver eller manuelt klargjorte PreservCyt-prøver og SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet, må du se *Brukerhåndbok for Rapid Capture System* for instruksjoner om å fullføre testingen.

Hvis de denaturerte kalibratorene, kvalitetskontrollene eller prøvene har vært oppbevart, må de romtempereres til 20–25 °C og, hvis de ble oppbevart i et prøvestativ, må du fjerne og kaste hettene fra rørene.

- To hybridiseringsmetoder er tilgjengelige for STM-prøver og manuelt klargjorte PreservCyt-prøver og SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet: "Hybridisering ved bruk av mikroplate og Microplate Heater I" og "Hybridisering ved bruk av mikrorør og vannbad".
- STM-prøver som er denaturert med MST Vortexer 2-metoden må bruke metoden "Hybridisering ved bruk av en mikroplate og Microplate Heater I" på side **Error! Bookmark not defined.** "Hybridisering ved bruk av mikrorør og vannbad" (side **Error! Bookmark not defined.**) er ikke validert med STM-prøver som er blitt denaturert med MST Vortexer 2.
- Probeblandingen er viskøs. Påse at probeblandingen er grundig blandet og at den påkrevde mengden er helt dispensert i hver(t) hybridiseringsmikroplatebrønn eller hybridiseringsmikrorør.
- Når prøven overføres til hybridiseringsmikroplaten eller hybridiseringsmikrorøret, må du unngå å berøre sidene av hybridiseringsmikroplatebrønnene eller hybridiseringsmikrorørene, siden det kan oppstå falskt positive resultater hvis prøvene ikke overføres forsiktig. Begrens dannelsen av luftbobler. Bruk en ren, ekstra lang pipettespiss for hver overføring for å unngå krysskontaminasjon

Hybridisering ved bruk av en mikroplate og Microplate Heater I

1. Skaff tilveie og merk en hybridiseringsmikroplate.
2. Roter ved bruk av en av følgende metoder:

Kalibratører, kvalitetskontroller eller STM-prøver med MST Vortexer 2

- a. Ved behov dekker du rørene med DuraSeal-rørforseglerfilm og fester stativlokket på prøvestativet.
- b. Roter prøvestativet i minst 5 sekunder ved maksimal hastighetsinnstilling.
- c. Plasser prøvestativet på arbeidsbenken umiddelbart, og åpne låsene. Løft stativlokket ca. 1 cm og flytt det forsiktig til venstre og høyre for å frigi alle prøveglass som kan

ha klebet seg til DuraSeal-prøveglassforseglerfilmen. Fjern stativlokket ved å løfte det rett opp inntil det er borte fra prøvestativet.

- d. Trekk DuraSeal-prøveglassforseglerfilmen forsiktig av lokket og kast den.

PreservCyt-prøver eller SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet med MST Vortexer 2

- a. Ved behov dekker du rørene med DuraSeal-rørforseglerfilm og fester stativlokket på prøvestativet.
- b. Roter konverteringsstativet i minst 10 sekunder ved maksimal hastighetsinnstilling.
- c. Plasser prøvestativet på arbeidsbenken umiddelbart, og åpne låsene. Løft stativlokket ca. 1 cm og flytt det forsiktig til venstre og høyre for å frigi alle prøveglass som kan ha klebet seg til DuraSeal-prøveglassforseglerfilmen. Fjern stativlokket ved å løfte det rett opp inntil det er borte fra prøvestativet.
- d. Trekk DuraSeal-prøveglassforseglerfilmen forsiktig av lokket og kast den..

Alle prøvetyper med vorteksblender

- a. Vortex each tube individually for at least 5 seconds.

3. Ved bruk av EXPAND-4-pipetten eller en enkeltkanalspipette med ekstra lang pipettespiss, overfør 75 µl av hver kalibrator, kvalitetskontroll eller prøver til bunnen av en tom hybridiseringsmikroplatebrønn i samsvar med det opprettede plateoppsettet.

Hvis prøver skal oppbevares, må de denaturerte kalibratorene, kvalitetskontrollene og STM-prøvene lukkes med nye skruhetter for prøver, og originalhetten for hver prøve må plasseres på PreservCyt-prøvene og SurePath-prøvene med post-gradient-cellepellet.

Merk: Oppbevar prøvene i samsvar med grensene beskrevet i "Optional stop point of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples" på side 47.

4. Når den siste prøven er overført, må du dekke hybridiseringsmikroplaten med et mikroplatelukk og inkubere i 10 minutter ved 20–25 °C.
5. Roter probeblandingen grundig og alikvoter inn i en reagensbeholder til engangsbruk.
6. Pipetter 25 µl av probeblandingen forsiktig inn i hver hybridiseringsmikroplatebrønn ved bruk av en 8-kanals pipette og nye spisser for hver tilsetning av probeblanding.
Unngå oppsprut og berøring av sidene av hybridiseringsmikroplatebrønnene.
7. Dekk hybridiseringsmikroplaten med et mikroplatelukk og ryst i 3 ± 2 minutter med Rotary Shaker I innstilt ved 1100 ± 100 rpm.

Etter rysting skal kalibratorene, kvalitetskontrollene, STM-prøvene og SurePath-prøvene bli gule, og PreservCyt-prøvene skal bli rosa.

Prøver som forblir lilla har kanskje ikke fått riktig mengde probeblanding. Tilsett ytterligere 25 µl probeblanding i prøvene som forblir lilla, og ryst på nytt. Hvis en prøve forblir lilla når denne prosedyren er fullført, må prøven testes på nytt.

8. Plasser mikroplaten i Microplate Heater I temperert til 65 ± 2 °C, og pass på at den ikke spruter. Inkuber hybridiseringsmikroplaten i 60 ± 5 minutter.
9. Fortsett til "Hybridoppfangning" side 51, for å fortsette testingen.

Hybridisering ved bruk av mikrorør og vannbad

1. Merk og plasser det påkrevde antallet rene hybridiseringsmikrorør i mikrorørstativet.
2. Roter hver kalibrator, kvalitetskontroll og prøverør enkeltvis i minst 5 sekunder før prøven fjernes.
3. Ved bruk av en enkeltkanalpipette med ekstra lang pipettespiss, overfør 75 µl av hver kalibrator, kvalitetskontroll eller prøver til bunnen av den aktuelle hybridiseringsmikroplatebrønnen i samsvar med det opprettede plateoppsettet.

Hvis prøver skal oppbevares, må de denaturerte kalibratorene, kvalitetskontrollene og STM-prøvene lukkes med nye skruhetter for prøver, og originalhetten for hver prøve må plasseres på PreservCyt-prøvene og SurePath-prøvene med post-gradient-cellepellet.

Merk: Oppbevar prøvene i samsvar med grensene beskrevet i "Optional stop point of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples" på side 47.

4. i 10 minutter ved 20–25 °C.
5. Roter probeblandingen grundig og alikvoter inn i en reagensbeholder til engangsbruk.
6. Pipetter 25 µl av probeblandingen forsiktig inn i hvert hybridiseringsmikroplaterør ved bruk av en 8-kanals pipette og nye spisser for hver rad.

Unngå oppsprut og berøring av sidene av hybridiseringsmikrorørene.

Undersøk stativet underfra for å påse at alle hybridiseringsmikrorør har fått riktig mengde probeblanding.

7. Dekk hybridiseringsmikrorørene med en plateforsegler. Plasser stativlokket på stativet. Ryst mikrorørstativet i 3 ± 2 minutter med Rotary Shaker I innstilt ved 1100 ± 100 rpm.
Etter rysting skal kalibratorene, kvalitetskontrollene, STM-prøvene og SurePath-prøvene med post-gradient-cellepellet bli gule, og PreservCyt-prøvene skal bli rosa.

Prøver som forblir lilla har kanskje ikke fått riktig mengde probeblanding. Tilsett ytterligere 25 µl probeblanding i prøvene som forblir lilla, og ryst på nytt. Hvis en prøve forblir lilla når denne prosedyren er fullført, må prøven testes på nytt.

8. Inkuber mikrorørstativet i 60 ± 5 minutter i et 65 ± 2 °C vannbad.
Påse at vannivået i vannbadet er tilstrekkelig til å dekke hele hybridiseringsmikrorørvolumet.

Merk: Mikrorørstativet vil flyte i vannbadet.

9. Fortsett til "Hybridoppfanging" side 51, for å fortsette testingen.

Hybridoppfanging

1. Fjern alle oppfangingsmikroplatebrønner bortsett fra det påkrevde antallet fra platerammen.
2. Legg de ubrukte oppfangingsmikroplatebrønnene tilbake i originalposen, og forsegle på nytt.
3. Nummerer hver kolonne i rekkefølge med en markør, og merk oppfangingsmikroplaten med en relevant identifikator.

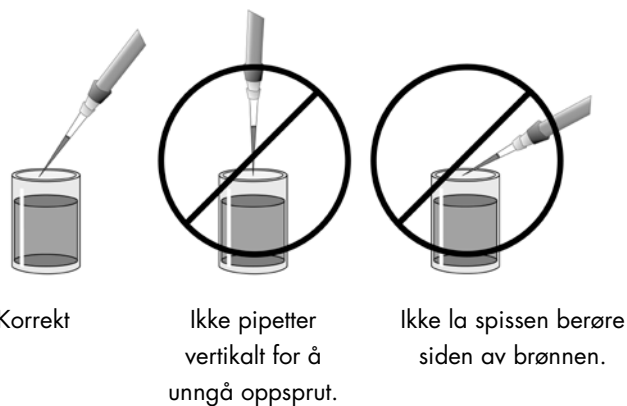
Prøvene vil bli tilsatt i oppfangingsmikroplatebrønnene i samsvar med det opprettede plateoppsettet.

4. Ved behov må du fjerne hybridiseringsmikroplaten fra Microplate Heater I eller mikrorørstativet fra vannbadet.

Fjern mikroplatelokket umiddelbart og plasser det på en ren overflate, eller fjern stativlokket og trekk plateforsegleren langsomt opp og over mikrorørstativet.

5. Ved bruk av en 8-kanals pipette må hele innholdet (ca. 100 µl) i hybridiseringsmikroplatebrønnene eller hybridiseringsmikrorørene overføres til bunnen av de tilsvarende oppfangingsmikroplatebrønnene.

Bruk nye pipettespisser for hver overføring, og la hver pipettespiss tømmes for å sørge for at prøveoverføringen er fullstendig. Ved behov kan pipetten stabiliseres ved å støtte midten av pipettespissene på overkanten av oppfangingsmikroplatene (se Figur 2, under).



Figur 2. Riktig pipettering.

6. Dekk oppfangingsmikroplaten med mikroplatelokket eller en ny plateforsegler, og ryst i 60 ± 5 minutter med Rotary Shaker I innstilt ved $1100 + 100$ rpm ved $20-25$ °C.
Klargjør vaskebufferen under denne inkubasjonen (se "Vaskebuffer", side 36).
7. Når inkubasjonen er fullført, må du fjerne oppfangingsmikroplaten fra Rotary Shaker I og fjerne mikroplatelokket eller plateforsegleren forsiktig.
8. Fjern væsken fra oppfangingsmikroplatebrønnene ved å kaste den i en vask. Vend oppfangingsmikroplaten helt over vasken og ryst hardt i en nedadgående bevegelse.
Viktig: Ikke vend mikroplaten på nytt.
Pass på at du ikke heller for nær bunnen av vasken slik at det oppstår oppsprut.
9. Tørk ved å banke bestemt 2–3 ganger på rene Kimtowels-servietter eller tilsvarende lofrie papirservietter.
Påse at all væske er fjernet fra oppfangingsmikroplatebrønnene og at toppen av oppfangingsmikroplaten er tørr.
10. Fortsett med "Hybriddeteksjon" side 52, for å fortsette testingen..0.

Hybriddeteksjon

- Tilsett reagenser på tvers av capture-mikroplaten fra venstre til høyre ved bruk av en 8-kanals pipette. Tørk av spissene på reagensbeholderen til engangsbruk for å fjerne overflødig reagens før tilførsel til mikroplaten.
- Hvis en 8-kanals pipette ikke brukes, kan en repetisjonspipette brukes i stedet. Alikvoter DR1 inn i et polypropylenrør som er stort nok til å romme det påkrevde volumet.
- Det anbefales å benytte den omvendte pipetteringsteknikken for å forbedre konsekvensen av reagenstilførselen. Denne prosedyren er beskrevet nedenfor.

- Ved behov kan pipetten stabiliseres ved å støtte midten av pipettespissen på den øvre kanten av capture-mikroplatebrønnene. Pass på at du ikke berører sidene av oppfangingsmikroplatebrønnene, siden det kan oppstå krysskontaminasjon av prøver (se Figur 2, side 52)
1. Bland DR1 grundig, og overfør det relevante volumet forsiktig (se Tabell 1, side 31, eller Tabell 4, side **Error! Bookmark not defined.** ved behov) til en ren reagensbeholder til engangsbruk.
 2. Pipetter 75 µl DR1 forsiktig inn i hver oppfangingsmikroplatebrønn ved bruk av den omvendte pipetteringsteknikken, som følger:
 - a. Fest spissene på en 8-kanals pipette og påse at alle spissene sitter godt fast.
 - b. Skyv stempelet på pipetten forbi det første stoppet til det andre stoppet.
 - c. Senk spissene ned i reagensen.
 - d. Slipp opp stempelet langsomt og la reagensen fylle spissene.
 - e. Dispenser reagensen inn i mikroplatebrønnene ved å trykke stempelet til det første stoppet. Ikke slipp opp stempelet før pipettespissene er nedsunket i reagensen.
 - f. Fyll spissene på nytt og gjenta til alle mikroplatebrønner er fylt.

Påse at alle oppfangingsmikroplatebrønner er fylt ved å observere styrken av rosafargen. Alle oppfangingsmikroplatebrønner skal ha samme styrke på rosafargen.
 3. Dekk oppfangingsmikroplaten med et mikroplatelokk, ren Parafilm eller tilsvarende, og inkuber i 30–45 minutter ved 20–25 °C.
 4. Fortsett med "Vasking" side 54, for å fortsette testingen.

Vasking

Vask oppfangingsmikroplaten ved bruk av en av metodene under.

Automated Plate Washer-metode

Automated Plate Washer skal alltid være slått PÅ. Påse at skyllebeholderen er fylt og at avfallsbeholderen er tom. Automated Plate Washer vil skylle systemet rutinemessig for rengjøring. Se brukerhåndboken for Automated Plate Washer (*Automated Plate Washer User Manual*) for ytterligere instruksjoner.

- Påse at vaskebeholderen er fylt minst til 1 liter-merket med vaskebuffer. Hvis ikke må du klargjøre vaskebufferen (se "Vaskebuffer", side 36).
 - Påse at skyllebeholderen er fylt med avionisert eller destillert vann.
 - Påse at avfallsbeholderen er tom og at hetten sitter godt fast.
 - Automated Plate Washer vil prime automatisk før hver vask og skylle etter hver vask.
 - Hvis du kun bruker en delvis strimmel av oppfangingsmikroplatebrønner, må du plassere de tomme mikroplatebrønnene i oppfangingsmikroplaten for å fullføre kolonnen før vasking.
1. Fjern mikroplatelokket og plasser oppfangingsmikroplaten på Automated Plate Washer-plattformen.
 2. Påse at Automated Plate Washer er slått PÅ og at displayet viser **Digene Wash Ready** (Digenevask klar) eller **P1**.
 3. Velg antallet strimler som skal vaskes ved å trykke på knappen **Rows** (Rader) og deretter **+** eller **-** for å justere.
 4. Trykk på knappen **Rows** igjen for å returnere til **Digene Wash Ready** eller **P1**.
 5. Trykk på knappen **Start/Stop** for å begynne.

Automated Plate Washer vil utføre 6 fyll-/aspirasjonsykluser som tar ca. 10 minutter. Det vil oppstå en kort pause i løpet av programmet. Ikke fjern mikroplaten for tidlig.

Når Automated Plate Washer er ferdig å vaske, vil den vise "Digene Wash Ready" eller "P1".
 6. Fjern capture-mikroplaten fra plattformen til Automated Plate Washer når programmet er ferdig.

Oppfangingsmikroplaten skal være hvit, og ingen resterende rosa væske skal bli værende i oppfangingsmikroplatebrønnene.
 7. Fortsett med "Signalforsterkning" side 56, for å fortsette testingen.

Manuell vaskemetode

1. Fjern DR1 fra oppfangingsmikroplatebrønnene ved å plassere rene Kimtowels-servietter eller tilsvarende lofrie papirservietter på oppfangingsmikroplaten.
2. Påse at papirserviettene er i kontakt med hele overflateområdet av oppfangingsmikroplaten, og vend forsiktig.
3. La oppfangingsmikroplaten tømmes i 1–2 minutter.
4. Tørk godt på rene Kimtowels-servietter eller tilsvarende lofrie papirservietter.
Kast de brukte papirserviettene med omhu for å unngå kontaminasjon med alkalisk fosfatase.
5. Vask oppfangingsmikroplaten manuelt 6 ganger med vaskeapparatet.
For å vaske skikkelig må hver oppfangingsmikroplate oversvømmes med vaskebuffer. Dette vil fjerne DR1 fra toppen av capture-mikroplatebrønnene. Vasking starter ved oppfangingsmikroplatebrønn A1 og fortsetter i en buktende bevegelse til høyre og nedover. Når alle capture-mikroplatebrønnene er fylt, må væsken helles i vasken med en kraftig nedadvendt bevegelse. Den andre vaskingen startes ved oppfangingsmikroplatebrønn H12 i en buktende bevegelse til venstre og oppover. Denne sekvensen med 2 vasker gjentas 2 ganger til i totalt 6 vasker per oppfangingsmikroplatebrønn.
6. Etter vasking må oppfangingsmikroplaten tørkes ved å vende den opp ned på rene Kimtowels-servietter eller tilsvarende lofrie papirservietter og banke bestemt 3–4 ganger. Skift ut papirhåndklærne og absorber på nytt.
7. La oppfangingsmikroplaten stå opp ned og la den tørke i 5 minutter. Tørk oppfangingsmikroplaten en gang til.
Oppfangingsmikroplaten skal være hvit, og ingen resterende rosa væske skal bli værende i oppfangingsmikroplatebrønnene.
8. Fortsett med "Signalforsterkning" side 56, for å fortsette testingen.

Signalforsterkning

- Bruk et nytt par hansker til håndtering av DR2.
 - Tilsett reagens over oppfangingsmikroplaten fra venstre til høyre ved bruk av en 8-kanals pipette.
 - Hvis en 8-kanals pipette ikke brukes, kan en repetisjonspipette brukes i stedet. Alikvoter DR2 inn i et polypropylenrør som er stort nok til å romme det påkrevde volumet.
 - Tilsett DR2 uten avbrytelser. Inkuberingstiden for alle capture-mikroplatebrønnene må være så nær som mulig.
 - Pass på å ikke berøre sidene av oppfangingsmikroplatebrønnene eller sprute reagens på spissene, siden dette kan føre til krysskontaminasjon av prøvene (se Figur 2, side 52).
1. Bland DR2 grundig, og overfør det relevante volumet (se Tabell 1, side 31, eller Tabell 4, side **Error! Bookmark not defined.** ved behov) til en ren reagensbeholder til engangsbruk.
 2. Pipetter 75 µl DR2 forsiktig inn i hver oppfangingsmikroplatebrønn ved bruk av den omvendte pipetteringsteknikken som er beskrevet tidligere (se "Hybrideteksjon", side 52). Pass på at alle oppfangingsmikroplater er fylt nøyaktig ved å observere styrken på gulfargen. Alle oppfangingsmikroplatebrønner skal ha like sterk gulfarge.
 3. Dekk oppfangingsmikroplaten med et mikroplatelokk og inkuber ved 20–25 °C i 15 minutter (maksimalt 30 minutter).
Viktig: Unngå direkte sollys.
 4. Fortsett med "Måle oppfangingsmikroplaten og generere resultater" side 57, for å fortsette testingen.0.

Måle oppfangingsmikroplaten og generere resultater

1. Mål oppfangingsmikroplaten ved bruk av et DML-instrument.
Se den relevante programvarebrugerhåndboken for informasjon om å måle en oppfangingsmikroplate og generere testresultatrapporter. Med *digene* analyseprogramvaren kan du legge inn relevant testinformasjon.
2. Hvis en hel oppfangingsmikroplate ikke ble brukt, må du fjerne brukte mikroplatebrønner fra mikroplaterammen, skylle mikroplaterammen grundig med destillert eller avionisert vann, tørke og spare til neste test.
3. Kast alle reagensaliquoter og klargjorte reagenser, med mindre annet er angitt.
Fortynn gjenværende DNR i flasken før avhending i samsvar med nasjonale og lokale laboratorieprosedyrer.

Tolkning av resultater

digene HC2 High-Risk HPV DNA-testanalysens CO på 1 pg/ml tilsvarer 100 000 HPV-kopier/ml eller 5000 HPV-kopier per analyse.

Resultater fra STM-prøvetesting

STM-prøver med en RLU/CO-verdi $\geq 1,0$ anses som "positive" for 1 eller flere av HPV-typene 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 og 68.

STM-prøver med en RLU/CO-verdi $< 1,0$ anses som "negative" eller "no HPV DNA detected" (ingen HPV-DNA påvist) for de 13 testede HPV-typene. Høyrisiko-HPV-DNA-sekvenser er enten fraværende eller HPV-DNA-nivåene er under testens deteksjonsgrense.

Resultater fra SurePath-prøvetesting

SurePath-prøver med en RLU/CO-verdi $\geq 1,0$ anses som "positive" for 1 eller flere av HPV-typene 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 og 68.

SurePath-prøver med en RLU/CO-verdi $< 1,0$ anses som "negative" eller "no HPV DNA detected" (ingen HPV-DNA påvist) for de 13 testede HPV-typene. HPV-DNA-sekvenser er enten fraværende eller HPV-DNA-nivåene er under testens deteksjonsgrense.

Resultater fra PreservCyt-prøvetesting

PreservCyt-prøver med en RLU/CO-verdi $\geq 1,0$ anses som "positive" for 1 eller flere av HPV-typene 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 og 68.

PreservCyt-prøver med en RLU/CO-verdi $< 1,0$ anses som "negative" eller "no HPV DNA detected" (ingen HPV-DNA påvist) for de 13 testede HPV-typene. HPV-DNA-sekvenser er enten fraværende eller HPV-DNA-nivåene er under testens deteksjonsgrense.

For PreservCyt-prøver med en RLU/CO-verdi $\geq 1,0$ og $< 2,5$, anbefaler QIAGEN å teste prøven på nytt som følger:

- Hvis den første omtesten viser at RLU/CO er $\geq 1,0$, skal prøven rapporteres som "positive". Ingen ytterligere testing er nødvendig.

- Hvis den første omtesten viser at RLU/CO er $<1,0$, er en ny omtest (tredje resultat) påkrevd. Det andre resultatet er det endelige resultatet ($<1,0$ er negativt, $\geq 1,0$ er positivt), og rapporteres.

RLU/CO-verdi nær 1,0

Hvis RLU/CO for en prøve er nær, men mindre enn, 1,0 og høyrisiko-HPV-infeksjon mistenkes, må du vurdere alternative testmetoder og/eller gjenta prøven.

Andre HPV-typer

Siden denne analysen kun påviser høyrisiko-HPV-typerne 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 og 68, må du være klar over at det kan forekomme andre lavrisiko-HPV-typer i prøven. Hvis du tester spesifikt for forekomst av seksuelt overførbare lavrisiko-HPV, må du bruke *digene* HC2 HPV DNA-testen, som påviser lavrisiko- og høyrisiko-HPV-DNA-typer.

Verifisering av analysekalibrering

Verifisering av analysekalibrering utføres for å påse at reagensene, kalibratorene og kvalitetskontrollene fungerer som de skal, og gir en nøyaktig bestemmelse av analysens CO. *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen forutsetter analysekalibrering med hver test, så hver analyse må verifiseres. Denne verifiseringsprosedyren er ikke beregnet å erstatte intern kvalitetskontrolltesting. Godkjente områder for analysekalibrering og kvalitetskontroller er kun etablert for DML-instrumenter som QIAGEN har godkjent.

Analysekalibrering utføres automatisk av *digene*-analyseprogramvaren og skrives ut på dataanalyserapporten. Brukere med *digene* Qualitative Software versjon 1.03 eller tidligere må imidlertid utføre verifiseringen av analysekalibreringen manuelt før pasientresultatene kan rapporteres. Kontakt QIAGENS tekniske serviceavdeling for mer informasjon.

Testen må oppfylle de angitte kriteriene for analysekalibrering. Hvis noen av følgende kriterier er ugyldige, vil ikke programvaren tolke prøveresultatene

Negativ kalibrator

NC må testes i triplikate med hver test. NC-gjennomsnittet må være ≥ 10 og ≤ 250 RLU, og variasjonskoeffisienten (CV) må være ≤ 25 %. Hvis CV er >25 %, fjerner programvaren RLU-

verdien lengst unna gjennomsnittet som en ekstremverdi og beregner gjennomsnittet og CV på nytt med de gjenværende verdiene.

Hvis CV forblir >25 %, er analysekalibreringen ugyldig og testen må gjentas for alle pasientprøver. Resultatene fra pasientprøvene skal derfor ikke rapporteres.

Positiv kalibrator

HRC må testes i triplikate med hver test. CV for HRC må være ≤ 15 %. Hvis CV er >15%, fjerner programvaren RLU-verdien lengst unna gjennomsnittet som en ekstremverdi og beregner gjennomsnittet og CV på nytt med de gjenværende verdiene.

Hvis CV forblir >15%, er analysekalibreringen ugyldig og testen må gjentas for alle pasientprøver. Resultatene fra pasientprøvene skal derfor ikke rapporteres.

Gjennomsnitt for positiv kalibrator / gjennomsnitt for negativ kalibrator

Programvaren bruker $HRC\bar{X}$ og $NC\bar{X}$ til å beregne $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$. En gyldig $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$ er definert som $2,0 \leq HRC\bar{X}/NC\bar{X} \leq 15$.

Hvis $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$ er <2,0 eller >15, er analysekalibreringen ugyldig og testen må gjentas for alle pasientprøver. Resultatene fra pasientprøvene skal derfor ikke rapporteres.

Cutoff-beregning

digene-analyseprogramvaren beregner og rapporterer RLU/CO og positive/negative resultater for alle prøver. CO for bestemmelse av positive prøver er $HRC\bar{X}$. *digene*-analyseprogramvaren bruker prøvens RLU-verdier til å uttrykke resultater som prøvens RLU/CO.

For RCS-automatisert testing bruker RCS-HPV-analyseprotokollen en kalibreringsjusteringsfaktor (CAF) på 0,8 på den gyldige $HRC\bar{X}$. Denne CAF er nødvendig for at ytelsesegenskapene til RCS-automatisert testing fortsatt skal tilsvare den manuelle testingen. Siden CAF kun brukes på RCS-automatiserte testresultater, er det avgjørende å velge riktig analyseprotokoll for å generere nøyaktige testresultater.

Kvalitetskontroller

Kvalitetskontrollprøver leveres med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen, og må brukes til intern kvalitetskontroll. De medfølgende kvalitetskontrollene er klonede HPV-DNA-mål, og ikke utledet fra

villtype-HPV. Dette er samme type materiale som brukes for de medfølgende kalibratorene. Ytterligere kvalitetskontroller kan testes i samsvar med retningslinjer eller krav fra nasjonale eller lokale forskrifter eller godkjenningsorganisasjoner. De medfølgende kvalitetskontrollene er ikke egnet som kvalitetskontroll for behandling av PreservCyt-løsning eller SurePath-konserveringsvæske.

Se den relevante brukerhåndboken for *digene*-analyseprogramvaren for instruksjoner om å legge inn partinumre og utløpsdatoer for kvalitetskontrollene. Hvis en analyse skal være gyldig, må RLU/CO for hver kvalitetskontroll ligge innenfor de angitte kriteriene, som angitt i tabell 10 nedenfor.

Hvis kvalitetskontrollene ikke ligger innenfor disse områdene, er analysen ugyldig og testen må gjentas. Pasientresultatene skal derfor ikke rapporteres.

Tabell 10. Valideringskriterier for kvalitetskontrollanalyse

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

Begrensninger

- digene HC2 High-Risk HPV DNA-testen for HPV-type 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 og 68 er ikke anbefalt for evaluering av mistenkt seksuelt misbruk.
- Forekomsten av HPV-infeksjon i en populasjon kan påvirke ytelsen. Positive prediktive verdier reduseres ved testing av populasjoner med lav forekomst eller personer uten infeksjonsrisiko.
- Et negativt testresultat utelukker ikke muligheten for HPV-infeksjon, siden svært lave nivåer av infeksjon eller prøvetakingsfeil kan forårsake et falskt negativt testresultat. Denne testen påviser heller ikke DNA i lavrisiko-HPV-typer (6, 11, 42, 43 og 44).
- Infeksjon med HPV er ikke en definitiv indikator på forekomst av høygradig cervikal sykdom, og indikerer heller ikke bestandig at det høygradig cervikal sykdom eller kreft vil utvikles.
- Det finnes en liten mengde krysshybridisering mellom høyrisiko-HPV-proben og HPV-type 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 og MM9. Pasienter med prøver som inneholder høye nivåer av disse HPV-typer kan henvises feilaktig til kolposkopi (15, 35).
- digene HC2 High-Risk HPV DNA-testen er beregnet på å påvise høyrisiko-HPV-typer, deriblant 39, 58, 59 og 68. Analytiske studier utført av QIAGEN ved bruk av klonet HPV-plasmid-DNA viser at testen påviser disse typene ved konsentrasjoner fra 0,62 pg/ml til 1,39 pg/ml. Dette

tilsvarer deteksjonsegenskapene til andre HPV-typer som digene HC2 High-Risk HPV DNA-testen retter seg mot. QIAGEN kunne bare validere deteksjon av disse HPV-typer i et begrenset antall kliniske prøver. Grunnet den lave forekomsten av disse typene i den generelle populasjonen (28), er ikke ytelseegenskapene til digene HC2 High-Risk HPV DNA-testen for deteksjon av HPV-type 39, 58, 59 og 68 statistisk bekreftet.

- Hvis det finnes høye konsentrasjoner av soppdrepende krem, sæddrepende gel eller skyllemiddel når en STM-prøve samles inn for testing, kan man få falskt negativt resultat hvis disse prøvene inneholder HPV-DNA-nivåer som gir RLU/CO-verdier nær analysens CO.
- Hvis det finnes høye konsentrasjoner av soppdrepende krem, vaginal smøregel eller blod når en PreservCyt cervikal prøve samles inn for prøveklargjøring med QIASymphony DSP HPV Media-settet, kan man få falskt negativt resultat hvis disse prøvene inneholder HPV-DNA-nivåer som gir RLU/CO-verdier nær analysens CO.
- Hvis det finnes sæddrepende gel når en cervikal PreservCyt-prøve samles inn for prøveklargjøring med QIASymphony DSP AXpH DNA-settet, kan det oppstå et falskt negativt resultat.
- Hvis det finnes sæddrepende gel, soppdrepende krem eller antiinflammatorisk krem når en cervikal SurePath-prøve samles inn for prøveklargjøring med QIASymphony DSP HPV Media-settet, kan det oppstå et falskt negativt resultat.
- Det kan oppstå kryssreaktivitet mellom høyrisiko-HPV-proben og plasmidet pBR322. Forekomsten av homologe pBR322-sekvenser er rapportert i prøver fra humane genitalia, og falskt positive prøver kan oppstå ved forekomst av høye nivåer av bakterieplasmid.
- Når du utfører RCS-automatisert testing og ikke observerer hybridiseringsplaten visuelt for å sørge for riktig prøveoverføring og ikke korrigerer for eventuell utilstrekkelig prøveoverføring, kan det føre til falskt negative resultater.

Ytelsesegenskaper

Klinisk ytelse ved screening av pasienter med normale Pap-testresultater som hjelpemiddel ved risikovurdering for pasientadministrasjon

Resultater fra 8 uavhengige kliniske studier gjennomført av ledende medisinske, akademiske og statlige institusjoner ved sentre i USA og i utlandet er beskrevet under. Studiene brukte de etablerte Pap-metodene i landene der studien ble gjennomført. I alle tilfeller bortsett fra 2 ble Bethesda-klassifiseringssystemet brukt til å tolke Pap-resultatene. For tilsvarende terminologi for screening av cervikal kreft i EU, se European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening (36). I tillegg ble høygradig cervikal sykdom diagnostisert ved bruk av kolposkopistyrte biopsi for hver studie. Disse studiene vurderte den kliniske nytten av *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen sammenlignet med Pap-testen for eldre kvinner (generelt over 30 år). Alle bortsett fra én studie utførte også prospektiv HPV-testing ved bruk av *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen.

Studiene var tverrsnitt-screeningsstudier av den generelle populasjonen som brukte *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen, med mindre annet er angitt under. To av studiene ble utført i USA, to i Europa, to i Latin-Amerika, én i Afrika og én i Asia.

Ytelsen til *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen observert fra 6 tverrsnittstudier er oppsummert (se tabell 11 og 12 under) for kvinner fra 30 år som er diagnostisert med histologisk bekreftet høygradig cervikal neoplasi, hvilket er definert som cervikal intraepitelial neoplasi (CIN) av grad 3 eller høyere.

Tabell 11. Ytelsesberegninger – sensitivitet og spesifisitet

Populasjon	n	Sensitivitet (%)			Spesifisitet (%)		
		(n/N)			(n/N)		
		95 % konfidensintervall (CI)			95 % CI		
		Kun Pap	Kun HPV	HPV + Pap	Kun Pap	Kun HPV	HPV + Pap
Vest-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
Latin-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
Latin-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
Asia	1936	97.6	100.0	100.0	76.3	83.0	68.0
		(41/42)	(42/42)	(42/42)	(1445/1894)	(1572/1894)	(1287/1894)
		87.4–99.9	91.6–100.0	91.6–100.0	74.3–78.2	81.2–85.0	65.8–70.1
USA 1	1040	50.0	100.0	100.0	97.6	96.2	95.5
		(1/2)	(2/2)	(2/2)	(1013/1038)	(999/1038)	(991/1038)
		1.26–98.7	15.8–100.0	15.8–100.0	96.5–98.4	94.9–97.3	94.0–96.7

* *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testdata når tilgjengelig, HCS-data brukt ellers; data kombinert.

Tabell 12. Ytelsesberegning – positiv og negativ prediktiv verdi

Populasjon	Forekomst (%)		Positiv prediktiv verdi (%)			Negativ prediktiv verdi (%)		
	n	CIN 3	(n/N)			(n/N)		
			95 % CI			95 % CI		
			Kun Pap	Kun HPV	HPV + Pap	Kun Pap	Kun HPV	HPV + Pap
Vest-Europa 1	7592	0.36 (27/7592) 0.23–0.52	11.1 (14/126) 6.2–17.9	8.23 (26/316) 5.5–11.8	6.77 (27/399) 4.5–9.7	99.83 (7453/7466) 99.7–99.9	99.99 (7275/7276) 99.9–100.0	100.0 (7193/7193) 99.9–100.0
Latin-Amerika 1	6115	1.26 (77/6115) 0.99–1.57	37.2 (45/121) 28.6–46.4	16.5 (73/442) 13.2–20.3	15.8 (75/476) 12.6–19.4	99.47 (5962/5994) 99.3–99.6	99.93 (5669/5673) 99.8–100.0	99.96 (5637/5639) 99.9–100.0
Latin-Amerika 2*	6176	1.10 (68/6176) 0.86–1.39	12.7 (53/416) 9.7–16.3	14.3 (61/427) 11.1–18.0	9.4 (64/682) 7.3–11.8	99.74 (5745/5760) 99.6–99.9	99.88 (5742/5749) 99.8–100.0	99.93 (5490/5494) 99.8–100.0
Afrika	2925	3.66 (107/2925) 3.01–4.40	19.1 (90/472) 15.6–22.9	14.5 (96/661) 11.9–17.4	12.9 (99/765) 10.6–15.5	99.31 (2436/2453) 98.9–99.6	99.51 (2253/2264) 99.1–99.8	99.63 (2152/2160) 99.3–99.8
Asia	1936	2.17 (42/1936) 1.57–2.92	8.37 (41/490) 6.1–11.2	11.5 (42/364) 8.4–15.3	6.47 (42/649) 4.7–8.7	99.93 (1445/1446) 99.6–100.0	100.0 (1572/1572) 99.8–100.0	100.0 (1287/1287) 99.7–100.0
USA 1	1040	0.19 (2/1040) 0.02–0.69	3.85 (1/26) 0.1–19.6	4.88 (2/41) 0.6–16.5	4.08 (2/49) 0.5–14.0	99.90 (1013/1014) 99.5–100.0	100.0 (999/999) 99.6–100.0	100.0 (991/991) 99.6–100.0

* *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testdata når tilgjengelig, HCS-data brukt ellers; data kombinert.

På tvers av studiene er det en enhetlig, og ofte svært signifikant, forbedring i sensitivitet for *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen i forhold til kun Pap-testen. I likhet med sensitivitet overskrider den negative prediktive verdien for HPV den for kun Pap i alle tilfeller, tilnærmet 100 %. Denne negative prediktive verdien viser den høye sannsynligheten for fravær av høygradig cervical sykdom eller kreft hos kvinner med normal cytologi som ikke har HPV-infeksjon.

Selv om spesifisiteten for *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen er lavere enn for kun Pap, har analysen av sannsynlighetsforhold påvist at reduksjonen av observert spesifisitet ikke er signifikant nok til å påvirke den kliniske nytten av å bruke testen til å identifisere kvinner med liten eller ingen risiko for å ha eller utvikle cervical sykdom. Det er likevel viktig at beslutningen om å henvise en pasient til kolposkopi er basert på all klinisk informasjon og risikoinformasjon, samt pasientanemnesen som er tilgjengelig for legen. Viktige variabler inkluderer anamnese med HPV-infeksjon og/eller unormal Pap-test, alder for første samleie, antall seksuelle partnere og samtidige seksuelt overførbare sykdommer (37, 38).

Selv om forekomsten av høygradig sykdom ikke varierer signifikant blant studiene der ytelse ble bestemt, kan forekomst av HPV-infeksjon i en populasjon påvirke ytelse, og varierer som regel

med pasientpopulasjonen. I tillegg er forekomst av HPV-infeksjon påvist å reduseres kraftig med alderen (17, 24–29, 38–40). Positive prediktive verdier reduseres ved testing av populasjoner med lav forekomst eller personer med lav infeksjonsrisiko.

Langsgående analyser ble utført ved bruk av resultater fra to studier, én utført i USA ved National Cancer Institute (NCI) (Nasjonalt kreftinstitutt) i Portland, Oregon, og den andre i Frankrike ved Laboratoire Pol Bouin C.H.U. de Reims. Disse langsgående analysene ble utført for å vise at Pap-negative/HPV-negative pasienter har lavere risiko for å ha cervikal sykdom sammenlignet med tradisjonelt definerte lavrisikokvinner med ukjent HPV status og sammenlignet med Pap-negative/HPV-negative/HPV-positive pasienter (se tabell 13 og 14 under).

Tabell 13. Langsgående analyse – relativ risiko for høygradig sykdom

Studiegruppe	Alder	Lav risikoklassifisering	n	Tilfeller av CIN 3+	Rate (per 100 pasientår)	Relativ risiko 95 % CI
NCI	30 og over	Normal Pap, HPV-negativ	12,054	28	0.043	0.897 (0.596–1.348)
		Etterfølgende normale Pap-tester*	9429	19	0.048	1.000
	Alle	Normal Pap, HPV-negativ	17,594	48	0.056	0.678 (0.514–0.894)
		Etterfølgende normale Pap-tester*	13,392	44	0.082	1.000
Frankrike	30 og over	Normal Pap, HPV-negativ	1690	3	0.084	0.849 (0.307–2.35)
		Etterfølgende normale Pap-tester†	2026	4	0.099	1.000
	Alle	Normal Pap, HPV-negativ	2180	3	0.066	0.491 (0.221–1.09)
		Etterfølgende normale Pap-tester†	2650	7	0.136	1.000

* Tre normale Pap-tester over ca. 2 år.

† To normale Pap-tester over ca. 2 år.

Tabell 14. Langsgående analyse – sykdomsrater stratifisert etter HPV-status ved baseline

Studiegruppe	Alder	Baseline-status	n	Tilfeller av CIN 3+	Rate (per 100 pasientår)	Relativ risiko 95 % CI
NCI	30 og over	Normal Pap, HPV-positiv	1078	24	0.451	10.50 (6.13–18.0)
		Normal Pap, HPV-negativ	12,054	28	0.043	1.00
	Alle	Normal Pap, HPV-positiv	2561	63	0.096	10.64 (7.33–15.5)
		Normal Pap, HPV-negativ	17,594	48	0.056	1.00
Frankrike	30 og over	Normal Pap, HPV-positiv	419	14	2.346	27.3 (8.41–88.3)
		Normal Pap, HPV-negativ	1696	3	0.084	1.00
	Alle	Normal Pap, HPV-positiv	619	22	2.520	37.0 (11.8–116)
		Normal Pap, HPV-negativ	2180	3	0.066	1.00

Den kliniske nytten av HPV-testresultatet demonstreres ytterligere av den økte risikoen for cervikal sykdom hos HPV-positive kvinner sammenlignet med HPV-negative kvinner.

Klinisk ytelse ved screening av pasienter med ASC-US-Pap-testresultater for å bestemme behovet for henvisning til kolposkopi

En studie kalt "Utility of HPV DNA Testing for Triage of Women with Borderline Pap Smears" (Nytte av HPV-DNA-testing for triage av kvinner med Pap-testresultater i grenseområdet) ble utført i USA i 1996 av Kaiser Foundation Research Institute (Kaiser Foundation forskningsinstitutt) og Kaiser Permanente Medical Group (Kaiser Permanente medisinsk gruppe). Cervikale prøver til rutinemessig Pap-testing og *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen ble tatt fra kvinner som oppsøkte en rekke Kaiser-klinikker. Innledende Pap-tester ble evaluert i samsvar med Bethesda-klassifiseringen. For tilsvarende terminologi for screening av cervikal kreft i EU, se European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening (42). Kvinner (fra 15 år) med Pap-testresultater med unormale celler av ubestemt betydning (ASC-US) returnerte for kolposkopi og biopsi. Kolposkopistyrte histologiske prøver ble undersøkt av patologer, og en innledende diagnose ble stilt. Hver histologi-prøve ble også evaluert av en uavhengig patolog, og avvik mellom den innledende evalueringen og den uavhengige evalueringen ble bedømt av en tredje patolog.

Den innledende prøven ble testet med en prototype av *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen som inneholdt prober til 11 av de 13 HPV-typene (bortsett fra HPV-type 59 og 68). Forskjellen forventes ikke å føre til en signifikant ulik ytelsesprofil for testen.

Høyrisiko-HPV-DNA-tester og histologiske diagnoser var tilgjengelige fra 885 kvinner med ASC-US Pap-tester. Testing på de fleste pasientene ble utført med prøver samlet inn i både STM- og PreservCyt-løsning. På grunn av likhetene mellom ytelseegenskapene til *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen for STM- og PreservCyt-løsning, presenteres kun analyseytelsen for PreservCyt-løsning.

Blandt de som presenterer med en ASC-US-henvist Pap-test, er den negative prediktive verdien for *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen for å ha HSIL eller alvorligere sykdom ved kolposkopi 99 % (se tabell 15 under).

Tabell 15. Sammenligning av *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen kontra konsensushistologi; ASC-US-henvist Pap-test; Kaiser-studie, PreservCyt-prøver

		HSIL eller alvorligere sykdom ved kolposkopi		Totalt
		+	-	
<i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA Test result	+	66	317	383
	-	5	497	502
Totalt		71	814	885

Sensitivitet $[TP/(TP+FN)] = 93,0\%$ (66/71)
 95 % CI = 84,3–97,7
 Spesifisitet $[TN/(TN+FP)] = 61,1\%$ (497/814)
 95 % CI = 57,7–64,4
 Sykdomsforekomst = 8,0 % (71/885)
 Positiv prediktiv verdi for analyse = 17,2 % (66/383)
 Negativ prediktiv verdi for analyse = 99,0 % (497/502)

De teoretiske positive og negative prediktive verdiene basert på ulike forekomster for en innledende ASC-US påvist som HSIL eller høyere basert på høyrisiko-HPV-testresultatene ble bestemt (se tabell 16 under).

Tabell 16. Teoretisk positiv og negativ prediktiv verdi for høyrisiko-HPV-testing av ASC-US Pap-testresultater

Teoretisk utbredelse for HSIL	Innledende ASC-US Pap-testresultater	
	Positiv prediktiv verdi for analyse	Negativ prediktiv verdi for analyse
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

Variasjonen mellom de ulike aldersgruppene i denne studien ble bestemt (se tabell 17 under).

Tabell 17. Kaiser-studiedata: digene HC2 High-Risk HPV DNA-testens ytelse kontra konsensushistologieresultater (HSIL) – aldersspesifikke egenskaper

	Alder <30	Alder 30–39	Alder >39
n	287	233	365
Sykdomsforekomst (%)	12.2	11.2	2.7
Sensitivitet (%)	100	88.46	80.0
(n/N)	(35/35)	(23/26)	(8/10)
95 % CI	90.0–100.0	69.9–97.6	44.4–97.5
Spesifisitet (%)	31.4	66.2	79.15
(n/N)	(79/252)	(132/207)	(281/355)
95 % CI	25.7–37.5	59.3–72.6	74.6–83.3
Negativ prediktiv verdi (%)	100.0	97.86	99.29
(n/N)	(79/79)	(137/140)	(281/283)
Positiv prediktiv verdi (%)	16.83	24.73	9.76
(n/N)	(35/208)	(23/93)	(8/82)

Klinisk sensitivitet og spesifisitet for bestemmelse av risikoen for høygradig sykdom hos kvinner med Pap-tester for LSIL eller HSIL

En klinisk multisenterstudie som brukte *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen ble utført med prøver fra flere store kolposkopiklinikker ved sykehus og legesentre (3 klinikker) med høy forekomst av cervikal sykdom og HPV i Vest- og Sør-USA. HPV-testing ble utført ved 3 forskningsinstitusjoner uten tilknytning til kolposkopiklinikkene som prøvene ble samlet inn fra. Populasjonen for denne kliniske studien besto av kvinner diagnostisert som enten LSIL eller HSIL

basert på en nylig Pap-test og henvist til oppfølgingskolposkopi. Av 702 påmeldte pasienter hadde 327 Pap-testresultater på mer enn ASC-US med tilstrekkelig informasjon tilgjengelig. 96 av disse hadde en endelig sykdomsstatus på HSIL eller høyere.

Eksfolierte celleprøver fra cervix ble enten tatt med *digene* HC2 DNA-prøvetakingsenheten og plassert i STM, eller tatt med en kostehet og skylt i PreservCyt-løsning. Prøver ble tatt under kolposkopi. Prøver ble testet med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen, og resultatene ble sammenlignet med sykdomsstatusen bestemt for hver pasient. Sykdomsstatus var basert på resultatene fra histologisk evaluering. Ved negativ histologi eller manglende histologieresultat, ble imidlertid sykdomsstatusen bestemt ved hjelp av cytologi under kolposkopiundersøkelsen (se tabell 18, under).

digene HC2 High-Risk HPV DNA-testen ble utført ved 3 store storbylegesentre uten tilknytning til klinikkene som tar prøvene under kolposkopi. Cytologi ble utført ved et referansepatologilaboratorium, og histologien ble utført ved institusjonene som utfører kolposkopi. Testresultater ble sammenlignet med sykdomsstatus for å evaluere testens sensitivitet, spesifisitet og negative og positive prediktive verdier for deteksjon av høygradig cervikal neoplasi. På grunn av likhetene mellom *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testens ytelsesegenskaper for STM- og PreservCyt-løsning, presenteres kun analyseytelsen for PreservCyt-løsning. Det ble ikke observert forskjeller mellom høyrisiko-HPV-testresultater fra STM-prøver og PreservCyt-prøver.

Tabell 18. Algoritme for pasientsykdomsstatus

Cytologieresultat	Histologieresultat	Sykdomsstatus
Negativ	Negativt eller ikke utført*	Negativ
LSIL	Negativ	LSIL
HSIL	Negativ	HSIL
Kreft	Negativ	HSIL+
Negativ	LSIL	LSIL
LSIL	Ikke utført*	LSIL
LSIL	LSIL	LSIL
HSIL	LSIL	LSIL
Kreft	LSIL	LSIL
Negativ	HSIL	HSIL
LSIL	HSIL	HSIL
HSIL	HSIL	HSIL
HSIL	Ikke utført*	HSIL
Kreft	HSIL	HSIL
Negativ	Kreft	HSIL+
LSIL	Kreft	HSIL+
HSIL	Kreft	HSIL+
Kreft	Ikke utført*	HSIL+
Kreft	Kreft	HSIL+

* Biopsi og/eller endocervikal utskrapning (ECC) ble ikke utført siden det ikke ble observert abnormiteter ved kolposkopi eller histologieresultatet var ikke tilgjengelig.

Ytelsen til *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen ble bestemt ved bruk av 327 PreservCyt-prøver, hvorav 96 ble tatt fra kvinner diagnostisert med høygradig cervikal sykdom (se tabell 19 og 20, under). Sammenligningene ble utført ved bruk av alle studiepasienter med unormale resultater fra henvist Pap-test.

Tabell 19. Resultater fra høyrisiko-HPV-testing

		Endelig sykdoms-status for HSIL		Endelig sykdoms-status for LSIL		Endelig sykdoms-status negativ		Totalt
		+	-	+	-	+	-	
		High-risk HPV result						
Resultat fra henvist Pap-test	LSIL	44	4	78	33	28	37	224
	HSIL	45	3	29	14	5	7	103
	Totalt	89	7	107	47	33	44	327
Totalt		96		154		77		327

digene HC2 High-Risk HPV DNA-testen viste ca. 93 % total sensitivitet for identifisering av kvinner med høygradig neoplas i en populasjon henvist for kolposkopi på grunnlag av en Pap-testdiagnose med LSIL, HSIL eller tilsvarende (se tabell 20, under). Testen viste også en negativ prediktiv verdi på nesten 95 % i denne populasjonen.

Tabell 20. Ytelseegenskaper for høyrisiko-HPV-DNA-testing blant pasienter med henvist Pap-test med LSIL eller høyere og HSIL som endelig sykdomsstatus

		Endelig sykdomsstatus		Totalt
		HSIL	LSIL eller negativ	
Høyrisiko-HPV-DNA-testresultat	+	89	140	229
	-	7	91	98
Totalt		96	231	327

Sensitivitet [TP/(TP+FN)] = 92,7% (89/96)
 95 % CI = 85,6–97,0
 Spesifisitet [TN/(TN+FP)] = 39,4% (91/231)
 95 % CI = 33,1–46,0
 Sykdomsforekomst for henvist LSIL til endelig HSIL = 21,4 %
 Sykdomsforekomst for henvist HSIL til endelig HSIL = 46,6 %
 Total positiv prediktiv verdi = 38,9 % (89/229)
 Total negativ prediktiv verdi = 92,8 % (91/98)

Selv om spesifisiteten til *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen var noe lav, forventes det ikke en sterk sammenheng mellom fravær av neoplas og et negativt HPV-resultat. HPV-DNA kan forekomme hos kvinner som ikke har utviklet høygradig sykdom. Faktisk, når HPV-polymerasekjedereaksjon (PCR)-testing (en analyse kun til forskningsbruk) ble utført på prøver med

positive *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testresultater og de med en tilsvarende sykdomsstatus under lavgradig neoplasi, var nesten 75 % positive.

Teoretiske positive og negative prediktive verdier for *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen for innledende LSIL- eller HSIL-Pap-testresultater ble påvist å være HSIL eller alvorligere sykdom ved kolposkopi (se tabell 21, under).

Tabell 21. Teoretisk positiv og negative prediktiv verdi for *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen for innledende LSIL- eller HSIL-Pap-testresultater.

Teoretisk utbredelse for HSIL	Innledende LSIL- eller HSIL-Pap-testresultat	
	Positiv prediktiv verdi for analyse	Negativ prediktiv verdi for analyse
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

Ytelse ved vaginal innsamling eller selvinnsamling

I dokumentasjonen som er oppgitt for ytelsen til *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen for selvinnsamlede vaginalprøver, deltok over 141 000 kvinner i alderen 16–54 år. Studiegruppene omfattet kvinner fra Kina (41, 42), Mexico (43, 44) og Storbritannia (45). Studiene var noe ulikt utformet, men generelt fikk kvinner med positivt testresultat tilbud om videre undersøkelser i form av kolposkopi, og resultatene ble rapportert for sensitivitet og spesifisitet versus komparativ metode.

I to studier hvor det fantes data til å sammenligne selvinnsamlede versus legeinnsamlede prøver, viser resultatene høy sensitivitet for CIN2+ for begge metoder (42, 45), 81–85 % for selvinnsamlede prøver vs. 96–100 % for legeinnsamlede prøver. Spesifisitetsresultater var i samme område for CIN2+ for begge metoder (42, 45), 81–82 % for selvinnsamlede vs. 83–85 % for legeinnsamlede prøver. I andre studier hvor bare selvinnsamlede ytelsesdata var

tilgjengelige, var ytelsen til *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testsensitiviteten for CIN2+ 3,4 ganger høyere enn cytologi (43) og 98 % sensitivitet før justering for verifiseringskjevhet (44).

Analytisk sensitivitet

Et ikke-klinisk panel med klonet HPV-plasmid-DNA ble testet for å bestemme om hver av de 13 HPV-typene er påviselige med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen og for å bestemme den analytiske sensitiviteten til analysen for hver av HPV-typene. Hver HPV-målkonsentrasjon (100 pg/ml, 10 pg/ml, 2,5 pg/ml, 1,0 pg/ml, 0,5 pg/ml og 0,2 pg/ml) for hver av de 13 HPV-DNA-typene (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 og 68) ble kjørt i triplikat. Gjennomsnittlig RLU for hver konsentrasjon av hver HPV-type ble beregnet og sammenlignet med den positive kalibratoren.

Den påviselige grensen for hver HPV-type i STM ble bestemt (se tabell 22, under). De påviselige grensene var i området 0,62 pg/ml til 1,39 pg/ml, avhengig av testet HPV-type. Gjennomsnittlig påviselig grense for alle 13 HPV-DNA-typer var 1,08 pg/ml med et standardavvik på 0,05 pg/ml.

Tabell 22. Sammendrag av påviselige sensitivitetsgrenser for hver HPV-DNA-type i STM

HPV-DNA-type	Påviselig HPV-DNA-konsentrasjon (pg/ml)	Standard avvik	95 % CI
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
Gjennomsnitt (alle typer)	1.08	0.05	0.95–1.25

Ekvivalens mellom prøvetyper

Ekvivalens mellom STM- og PreservCyt-prøver

Ekvivalens mellom STM- og PreservCyt-prøver ble undersøkt for lik gjenoppretting av HPV 18-DNA. Ca. 10^6 positive HeLa-celler som inneholdt integrerte HPV 18-genomer ble tilsatt i STM og i en negativ PreservCyt-cellepool. Hver prøvetype ble behandlet i samsvar med dens respektive prosedyrer for prøveklargjøring og denaturering, som beskrevet i den relevante bruksanvisningen, og testet med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen. Resultatene demonstrerte at gjenoppretting av HPV 18-DNA fra humane karsinomceller er tilsvarende for de to mediene, og at prøveklargjøring av PreservCyt-løsning ikke påvirker den analytiske sensitiviteten til *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen.

Ekvivalens mellom manuell prøveklargjøring av PreservCyt-prøver og prøveklargjøring av PreservCyt-prøver ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet.

Studier ble utført ved bruk av PreservCyt-prøver tatt fra en underpopulasjon av kvinner med normal cytologi (n=1276) og en underpopulasjon av kvinner med en cytologi på ASC-US eller over ASC-US (n=402). Manuell prøveklargjøring og prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet ble utført for hver prøve, etterfulgt av RCS-automatisert testing med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen (se tabell 23, under).

Tabell 23. Overensstemmelse av PreservCyt-prøveresultater mellom manuell prøveklargjøring and prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet (n=1678)

Positiv overensstemmelse (%) (n/N) 95 % CI		Negativ overensstemmelse (%) (n/N) 95 % CI	
Alle positive	Sterkt positiv region (RLU/CO $\geq 2,5$)	Alle negative	Sterkt negativ region (RLU/CO $< 0,8$)
96.0 (409/426) 93.7–97.5	97.6 (372/381) 95.6–98.8	96.2 (1204/1252) 95.0–97.1	99.1 (1173/1184) 98.3–99.5

Den relative analysesensitiviteten og -spesifisiteten av PreservCyt-prøver klargjort ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet henger sterkt sammen med resultatene fra den manuelle prøveklargjøringsmetoden, som påvist av den nedre grensen på 95 % CI for både positiv og negativ overensstemmelse.

Ekvivalens mellom manuell prøveklargjøring av PreservCyt-prøver og prøveklargjøring av PreservCyt-prøver ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet.

Studier ble utført ved bruk av PreservCyt-prøver tatt fra en underpopulasjon av kvinner fra 30 år med normal cytologi (n=1901) og en underpopulasjon av kvinner med ASC-US-cytologi (n=398). Manuel prøveklargjøring og prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet ble utført for hver prøve, etterfulgt av testing med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen (se tabell 24, under).

Tabell 24. Overensstemmelse av PreservCyt-prøveresultater mellom manuell prøveklargjøring and prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet (n=2299)

Positiv overensstemmelse (%)		Negativ overensstemmelse (%)	
(n/N)		(n/N)	
95 % CI		95 % CI	
Alle positive	Sterkt positiv region (RLU/CO \geq 2,5)	Alle negative	Sterkt negativ region (RLU/CO $<$ 0,8)
92.7	96.5	99.1	99.9
(281/303)	(245/254)	(1978/1996)	(1967/1969)
89.3–95.2	93.4–98.1	98.6–99.4	99.6–100.0

Den relative analysesensitiviteten og -spesifisiteten av PreservCyt-prøver klargjort ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet henger sterkt sammen med resultatene fra den manuelle prøveklargjøringsmetoden, som påvist av den nedre grensen på 95 % CI for både positiv og negativ overensstemmelse.

Ekvivalens mellom STM og manuell prøveklargjøring av SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet

En tofasert klinisk evaluering ble utført ved 6 prøvetakingsentre og 3 testklinikker i USA. Pasienter som oppsøkte en STD-klinikk, obstetrisk/gynekologisk klinikk, kolposkopiklinikk, sykehus eller fertilitetscenter var kvalifisert til påmelding i samsvar med forhåndsbestemte inklusjons- og eksklusjonskriterier. Gjennomførbarhetsfasen, beregnet på å bestemme en relevant CO-verdi for *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen for bruk med SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet, inkluderte ca. 400 pasienter. Den kliniske valideringsfasen, som inkluderte ca. 1500 pasienter for å validere den valgte CO-verdien, begynte etter at en midlertidig analyse av gjennomførbarhetsfasen demonstrerte at en CO på 1,0 RLU/CO ved bruk av SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet produserte akseptabel overensstemmelse med STM-prøveresultater

I begge evalueringsfaser ble cervikale SurePath- og STM-prøver tatt parvis fra hver frivillige kvinnelige deltaker. SurePath-prøven ble deretter sendt til et cytologilaboratorium for klargjøring av objektglass. Etter cytologisk klargjøring ble de gjenværende SurePath-prøvene med post-gradient-cellepellet og den tilsvarende STM-prøven testet med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen ved bruk av en CO på 1,0 RLU/CO (se tabell 25 nedenfor).

Tabell 25. Overensstemmelse mellom resultater for SurePath-prøve med post-gradient-cellepellet og resultater for STM-prøve (alle aldre og cytologiske klassifikasjoner) (n=1490)

Positiv overensstemmelse (%) (n/N) 95 % CI		Negativ overensstemmelse (%) (n/N) 95 % CI	
Alle positive	Sterkt positiv region (RLU/CO \geq 2,5)	Alle negative	Sterkt negativ region (RLU/CO $<$ 0,80)
93.5	96.4	95.3	96.0
(401/429)	(378/392)	(1011/1061)	(1002/1044)
90.7–95.6	94.1–98.0	93.8–96.5	94.6–97.1

Den relative analysesensitiviteten og -spesifisiteten for testing av SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet henger sterkt sammen med resultatene fra testing av STM-prøver, som påvist av den nedre grensen på 95 % CI for både positiv og negativ overensstemmelse.

Ekvivalens mellom manuell prøveklargjøring av SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet og prøveklargjøring av SurePath-prøver ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet

Studier ble utført ved bruk av SurePath-prøver samlet inn fra følgende underpopulasjoner:

- Kvinner med normal cytologi (n=1189)
- Kvinner med en cytologi på ASC-US eller høyere enn ASC-US (n=199)

For hver SurePath-prøve ble det utført prøveklargjøring av SurePath-prøven med QIASymphony DSP HPV Media-settet og manuell prøveklargjøring av prøven med post-gradient-cellepellet. RCS-automatisert testing med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen (se tabell 26 nedenfor) ble utført for hver av de klargjorte prøvene.

Tabell 26. Overensstemmelse i resultater mellom manuell prøveklargjøring av SurePath-prøver og prøveklargjøring av SurePath-prøver ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet (n=1388)

Positiv overensstemmelse (%)		Negativ overensstemmelse (%)	
(n/N)		(n/N)	
95 % CI		95 % CI	
Alle positive	Sterkt positiv region (RLU/CO $\geq 2,5$)	Alle negative	Sterkt negativ region (RLU/CO $< 0,8$)
91.7	97.5	99.0	99.7
(222/242)	(192/197)	(1134/1146)	(1124/1127)
87.6–94.6	94.2–98.9	98.2–99.4	99.2–99.9

Den relative analysesensitiviteten og -spesifisiteten av SurePath-prøver klargjort ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet henger sterkt sammen med resultatene fra den manuelle prøveklargjøringsmetoden, som påvist av den nedre grensen på 95 % CI for både positiv og negativ overensstemmelse.

Ekvivalens mellom manuell prøveklargjøring av SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet og prøveklargjøring av SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet

Studier ble utført ved bruk av SurePath-prøver samlet inn fra følgende underpopulasjoner:

- Kvinner med normal cytologi (n=1200)
- Kvinner med en cytologi på ASC-US eller høyere enn ASC-US (n=183)

Manuell prøveklargjøring og prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet ble utført for hver SurePath-prøve med post-gradient-cellepellet, etterfulgt av RCS-automatisert testing med digene HC2 High-Risk HPV DNA-testen (se tabell 27 nedenfor).

Tabell 27. Overensstemmelse i resultater av SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet mellom manuell prøveklargjøring og prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet (n=1383)

Positiv overensstemmelse (%)		Negativ overensstemmelse (%)	
(n/N)		(n/N)	
95 % CI		95 % CI	
Alle positive	Sterkt positivt område RLU/CO $\geq 2,5$	Alle negative	Sterkt negativt område RLU/CO $< 0,8$
92.6	97.4	94.4	99.3
(188/203)	(147/151)	(1114/1180)	(1078/1086)
88.2–95.5	93.4–99.0	92.9–95.6	98.6–99.6

Den relative analysesensitiviteten og -spesifisiteten av SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet klargjort ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet henger sterkt sammen med resultatene fra den manuelle prøveklargjøringsmetoden, som påvist av den nedre grensen på 95 % CI for både positiv og negativ overensstemmelse

Overensstemmelse mellom testmetoder

En multisenterstudie (n=2270) ble utført for å evaluere de kliniske testresultatene med RCS sammenlignet med testresultatene ved bruk av den manuelle metoden. Testing ble utført ved 3 sentre, utenfor QIAGEN, med pasientprøver tatt fra 5 prøvetakingssentre. Datasettet besto av 1269 cervikale prøver tatt i PreservCyt-løsning, og 1001 prøver tatt i STM.

Statistiske overensstemmelser mellom matchede prøver testet med RCS og med den manuelle testen ble beregnet for denne pasientpopulasjonen (se tabell 28 og 29, under).

Tabell 28. Sammendrag av overensstemmelse mellom RCS-automatisert og manuell testing – STM-prøver (n=1001)

Cytologisk klassifikasjon	HPV-forekomst (%)	Positiv overensstemmelse (%)		Negativ overensstemmelse (%)	
		(n/N) 95 % CI		(n/N) 95 % CI	
		Alle positive	Sterkt positiv region (RLU/CO >2,5)	Alle negative	Sterkt negativ region (RLU/CO >0,8)
WNL* <30 år	21	99.3 (139/140) 96.1–100.0	99.1 (112/113) 95.2–100.0	99.3 (538/542) 98.1–99.8	100.0 (531/531) 99.3–100.0
WNL ≥30 år	15	92.0 (23/25) 74.0–99.0	93.8 (15/16) 69.8–99.8	100.0 (143/143) 97.5–100.0	100.0 (142/142) 97.4–100.0
ASC-US	65	98.1 (51/52) 89.7–100.0	100.0 (47/47) 92.4–100.0	96.4 (27/28) 81.7–99.9	100.0 (26/26) 86.8–100.0
LSIL+	96	100.0 (65/65) 94.5–100.0	100.0 (62/62) 94.2–100.0	66.7 (2/3) 9.4–99.2	66.7 (2/3) 9.4–99.2
Annet	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-prøver	28	98.6 (279/283) 96.4–99.6	99.2 (237/239) 97.0–99.9	99.2 (712/718) 98.2–99.7	99.9 (703/704) 99.2–100.0

* WNL = Within Normal Limits (Innenfor normale grenser)

Tabell 29. Sammendrag av overensstemmelse mellom RCS-automatisert og manuell testing – PreservCyt-prøver (n=1269)

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

*WNL = Within Normal Limits (Innenfor normale grenser)

† Cytologidata utilgjengelig fra 4 pasienter.

En supplerende klinisk studie ble utført ved bruk av arkiverte gjenværende PreservCyt-prøver tatt fra en underpopulasjon av kvinner fra 30 år med normal cytologi (se tabell 30, under) med en HPV-forekomst på 4,8 %.

Tabell 30. Sammendrag av overensstemmelse mellom RCS-automatisert og manuell testing – WNL-kvinner fra 30 år (n=2077)

Positiv overensstemmelse (%)		Negativ overensstemmelse (%)	
(n/N)		(n/N)	
95 % CI		95 % CI	
Alle positive	Sterkt positiv region (RLU/CO >2,5)	Alle negative	Sterkt negativ region (RLU/CO >0,8)
92.0	91.8	99.3	99.7
(92/100)	(78/85)	(1964/1977)	(1944/1949)
84.84–96.48	83.77–96.62	98.88–99.65	99.40–99.92

automatiserte testresultatene i den sterkt positive regionen. De initielle resultatene fra den manuelle testingen for disse 7 prøvene var utenfor den anbefalte algoritmen for omtesting av PreservCyt-prøver, men siden studieutformingen forutsetter at alle prøver testes i tripliket, var gjentatte resultater tilgjengelige for å løse uoverensstemmelsene.

Data fra gjentatt testing for hver av de 7 uoverensstemmende prøvene antyder at alle uoverensstemmende prøver er negative for HPV-DNA (se tabell 31, under). Basert på de gjentatte negative resultatene oppnådd for begge replikater, var hver av de initielt positive manuelle testresultatene sannsynligvis falskt positive.

Tabell 31. Uoverensstemmende PreservCyt-prøver for WNL-kvinner fra 30 år (n=7)

Prøve	Senter	Manuell testing (RLU/CO)			RCS-automatisert testing (RLU/CO)		
		Initiell	Gjentatt 1	Gjentatt 2	Initiell	Gjentatt 1	Gjentatt 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

Resultater fra denne kliniske studien indikerer en total overensstemmelse mellom RCS-automatisert og manuell testing ved bruk av enten STM- eller PreservCyt-prøver

Reproduserbarhet

Total reproduserbarhet av manuell testing

En reproduserbarhetsstudie ved flere sentre ble utført for å bestemme reproduserbarhet mellom dager og sentre samt total reproduserbarhet for *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen ved bruk av et panel med HPV-DNA-mål og HPV-positive og HPV-negative kliniske STM-prøver.

Tre eksterne laboratorier utførte testingen med samme parti *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testsett på 3 ulike dager med et identisk reproduserbarhetspanel. Reproduserbarhetspanelet inkluderte følgende prøver:

- 12 denaturerte kliniske STM-prøvepooler
- 3 udenaturerte kliniske PreservCyt-prøvepooler
- Negativ kalibrator
- Positiv høyrisiko-HPV-kalibrator ved konsentrasjoner på 0,5 pg/ml, 1 pg/ml, 2,5 pg/ml, 5 pg/ml og 10 pg/ml.

Alle panelmedlemmer ble testet hver dag i triplikat ved bruk av *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen. Resultatene indikerer at reproduserbarhet av *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen med kliniske prøver er svært god (se tabell 32, under).

Tabell 32. Total reproduserbarhet – reproduserbarhet ved flere sentre (alle kjøringene ved alle sentre)

Statistisk måling	Resultat
Forventede positive prøver med et observert positivt resultat (95 % CI)	100.0% (99.0–100.0)
Forventede negative prøver med et observert negativt resultat (95 % CI)	99.0% (97.49–99.73)
Overensstemmelse (95 % CI)	99.5% (98.70–99.86)
Kappa	0.990

Reproduserbarhet med kliniske STM-prøver

Manuell testing

En studie ble utført for å evaluere reproduserbarheten av manuell testing for kliniske STM-prøveS med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen. Et panel med 20 medlemmer bestående av kliniske

pooler (10 positive og 10 negative) ble klargjort ved å kombinere tidligere testede STM-prøver. Prøver ble testet i replikater på 4 på hver av 5 dager, i totalt 20 replikater per prøve. Testing ble utført ved bruk av en kombinert probeblanding bestående av høyrisiko-HPV-proben og lavrisiko-HPV-proben. Reproduserbarheten til testen forventes ikke å variere ved bruk av kun probeblandingen i *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen. Gjennomsnittlig RLU/CO og 95 % CI for gjennomsnittet ble beregnet (se tabell 33, under).

Tabell 33. Reproduserbarhet av STM-prøver – manuell testing (avtakende rekkefølge etter gjennomsnittlig RLU/CO)

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

For the 5 specimens with a mean RLU/CO at 20% or more above the CO, 100 of 100 replicates (100.0%) were positive. For the 5 specimens with a mean RLU/CO within 20% above or below the CO, 60 of 100 (60%; 95% CI = 49.7–69.6) of the replicates were positive and 40 of 100 (40%) were negative. For the 10 specimens with the mean RLU/CO at 20% or more below the CO, 200 of 200 replicates (100%) were negative.

For de 5 prøvene med gjennomsnittlig RLU/CO på 20 % eller mer over CO, var 100 av 100 replikater (100,0 %) positive. For de 5 prøvene med gjennomsnittlig RLU/CO innen 20 % over eller under CO, var 60 av 100 (60 %, 95 % CI = 49,7–69,6) av replikatene positive og 40 av 100 (40 %) negative. For de 10 prøvene med gjennomsnittlig RLU/CO på 20 % eller mer under CO, var 200 av 200 replikater (100 %) negative.

Resultatene indikerte at prøver ved 20 % eller mer unna CO kan forventes å gi konsekvente resultater. Prøver nær CO ga omtrent likt antall positive og negative resultater. Disse data demonstrerte at manuell testing ved STM-prøver med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen gir reproducerbare resultater.

RCS-automatisert testing

En studie ble utført for å evaluere reproducerbarhet innen kjøring, dag til dag og mellom laboratorier for RCS-automatisert testing av STM-prøver med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen. Et panel med 16 medlemmer bestående av poolede kliniske prøver (se tabell 34, under) ble testet ved bruk av et enkelt parti reagenser, to ganger daglig på 3 ulike dager. Hvert panelmedlem ble testet i kvadruplikat.

Tabell 34. Reproduserbarhet av STM-prøver – sammensetning av RCS-automatisert testpanel

Panelmedlem	Omtrentlig RLU/CO	Forventet testresultat
1N	<0.4	Negativ
2N	0.4–0.8	Negativ
3P	0.8–1.2	Høyt negativt/lavt positivt
4P	0.8–1.2	Høyt negativt/lavt positivt
5P	0.8–1.2	Høyt negativt/lavt positivt
6P	1.2–2.0	Lavt positivt
7P	1.2–2.0	Lavt positivt
8P	1.2–2.0	Lavt positivt
9P	2.0–5.0	Lavt positivt
10P	5.0–10.0	Middels positivt
11N	<0.4	Negativ
12N	<0.4	Negativ
13N	<0.4	Negativ
14XR	Lavrisiko-HPV-DNA-positivt klinisk materiale i klinisk negativ STM-pool	Høyt negativt/lavt positivt
15XR	Lavrisiko-HPV-DNA-plasmid i klinisk negativ STM-pool	Høyt negativt/lavt positivt
16XR	Plasmidvektor-DNA-kontroll i klinisk negativ STM-pool	Høyt negativt/lavt positivt

To panelmedlemmer (14XR og 15XR) ble inkludert for å evaluere risikoen for krysshybridisering av *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testens probeblanding med prøver som kun inneholdt lavrisiko-HPV-DNA-type 6, 11, 42, 43 og 44. Panelmedlem 16XR besto av pGEM® DNA ved en konsentrasjon på 1,49 ng/ml, og fungerte som en vektorkontroll for panelmedlem 15XR. Resultatene av denne testingen indikerte ingen falskt positive testresultater grunnet forekomst av lavrisiko-HPV-DNA-typer i kliniske prøver. Disse resultatene er konsekvente med manuell testing.

Reproduserbarheten ble beregnet i samsvar med metoden beskrevet av NCCLS E5-A* (se tabell 35, under). Denne metoden krever beregning av varianskomponenter for hver av variabilitetskildene: Laboratorium, dag, kjøring og feil (definert som variasjon mellom analyser).

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

Tabell 35. Reproduerbarhet av STM-prøver – RCS-automatisert testing; kvantitativ reproduerbarhet

Panelmedlem	n	Gj.sn. RLU/CO	Standardavvik				Totalt	Total CV (%)
			Innen kjøring	Mellom kjøringer	Mellom dager	Mellom laboratorier		
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

[†] Negative varianskomponenter er nullstilt.

[‡] To ugyldige replikater for panelmedlem 8P forhindret varianskomponentanalyse grunnet ulike størrelsesgrupper under sammenligningen.

[§] N/A: Variansanalyse ikke mulig grunnet færre replikater enn andre panelmedlemmer..

Reproduerbarhet for kliniske PreservCyt-prøver

Manuell testing

Reproduerbarheten for manuell testing av PreservCyt-prøver med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen ble bestemt i en studie som brukte 24 simulerte prøver ved ulike HPV-DNA-konsentrasjoner. Prøver besto av PreservCyt-løsning og hvite blodceller, med og uten HPV 16-plasmidholdige bakterier.

Prøver ble testet i replikater på 4 på hver av 5 dager, i totalt 20 replikater per prøve. På hver av de 5 dagene av studien ble en 8 ml prøve fra hver prøve klargjort i samsvar med bruksanvisningen for *digene* HC2 Sample Conversion-settet og testet. Gjennomsnittet og 95 % CI ble beregnet (se tabell 36, under).

Tabell 36. Reproduserbarhet av PreservCyt-prøver – manuell testing med manuell prøveklargjøring; kvalitativ reproduserbarhet (avtakende rekkefølge etter gjennomsnittlig RLU/CO)

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

For de 6 prøvene med gjennomsnittlig RLU/CO på 20 % eller mer over CO, var 114 av 120 replikater (95,0%) positive. For de 7 prøvene med gjennomsnittlig RLU/CO innen 20 % over eller under CO, var 88 av 139 (63,3%, 95 % CI = 54,3–70,9) av replikatene positive og 51 av 139 (36,7%) negative. For de 4 prøvene innen 10 % over eller under CO var 41 av 79 (51,9 %) av replikatene positive og 38 av 79 (48,1 %) negative. For de 11 prøvene med gjennomsnittlig RLU/CO på 20 % eller mer under CO, var 220 av 220 replikater (100 %) negative.

Resultatene indikerte at prøver ved 20 % eller mer unna CO kan forventes å gi konsekvente resultater. Prøver nær CO ga omtrent likt antall positive og negative resultater. Disse data

demonstrerte at manuell testing ved PreservCyt-prøver med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen gir reproduerbare resultater.

RCS-automatisert testing med manuell prøveklargjøring

En intern studie av RCS-automatisert testing ble utført ved bruk av PreservCyt-prøver tatt hovedsakelig fra kvinner med et cytologieresultat på ASC-US eller mer enn ASC-US (HPV-forekomst 57 %). Prøver ble delt inn i 2 alikvoter; hver alikvot ble deretter behandlet enkeltvis ved bruk av *digene* HC2 Sample Conversion-settet og testet i duplikat med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen.

I likhet med andre kvalitative IVD-tester er variasjon innen *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testresultatene fra kliniske prøver hovedsakelig forbundet med en av, eller en kombinasjon av, følgende: Prøvetaking, prøveklargjøring og testprosedyren. Siden testresultatene som ble sammenlignet ble oppnådd fra samme kliniske prøve, kontrollerte den eksperimentelle utformingen for variasjon grunnet prøvetaking. Repeterbarheten av resultater oppnådd fra 2 individuelt klargjorte prøvealiquoter fra samme kliniske prøve (omtalt under som "mellom klargjorte alikvoter") reflekterer variasjon grunnet kombinasjonen av prøveklargjøring og testprosedyren. Repeterbarheten av resultater oppnådd fra samme prøvealiquot (omtalt under som "innen klargjort alikvot") reflekterer variasjon fra testprosedyren (se tabell 37, under).

Tabell 37. Reproduerbarhet av PreservCyt-prøver – RCS-automatisert testing med manuell prøveklargjøring; kvalitativ reproduerbarhet

Analysering	Positiv overensstemmelse (%)	Negativ overensstemmelse (%)	Totalt overensstemmelse (%)	
	(n/N) 95 % CI	(n/N) 95 % CI	(n/N) 95 % CI	
Innen klargjort aliquot	Alle data	99.62 (261/262)	94.7 (160/169)	97.7 (421/431)
		97.9–100.0	90.1–97.5	95.8–98.9
	Sterkt positive og sterkt negative regioner	100.0 (249/249)	98.2 (160/163)	99.3 (409/412)
	98.5–100.0	94.7–99.6	97.9–99.9	
Mellom klargjorte aliquoter	Alle data	99.6 (264/265)	98.2 (163/166)	99.1 (427/431)
		97.9–100.0	94.8–99.6	97.6–99.8
	Sterkt positive og sterkt negative regioner	100.0 (249/249)	99.4 (161/162)	99.8 (410/411)
	98.5–100.0	96.6–100.0	98.7–100.0	

En ytterligere studie ble utført for å evaluere den kvantitative reproduserbarheten av resultater oppnådd med RCS-automatisert testing av simulerte PreservCyt-prøver. Tre kliniske sentre, inkludert QIAGEN, deltok i studien.

Hvert testlaboratorium utførte både RCS-automatisert og manuell testing av *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen to ganger daglig på 5 ulike dager med et medfølgende reproduserbarhetspanel med 6 medlemmer. Hvert panelmedlem besto av dyrkede celler tilsatt i PreservCyt-løsning beregnet på å gi en omtrentlig RLU/CO-verdi (se tabell 38, under).

De HPV-DNA-positive panelmedlemmene ble klargjort ved å tilsette forskjellige mengder HPV-DNA-positive SiHa-celler (fra en laboratoriecellelinje). Det negative panelmedlemmet besto av HPV-negative Jurkat-celler (fra en ulik laboratoriecellelinje). Den cellulære sluttkonsentrasjonen for alle 6 panelmedlemmer var ca. 5×10^4 celler/ml.

Tabell 38. Reproduserbarhet av PreservCyt-prøver – RCS-automatisert testing med manuell prøveklargjøring; panelmedlemmer for kvantitativ reproduserbarhet

Panelmedlem	Cellestype	Omtrentlig RLU/CO	Forventet resultat
1N	Jurkat	<1.0	Negativ
2N	Jurkat	<1.0	Negativ
3P	SiHa og Jurkat	5.0–8.0	Lavt positivt
4P	SiHa og Jurkat	5.0–8.0	Lavt positivt
5P	SiHa	30.0–50.0	Middels positivt
6P	SiHa	200.0	Høyt positivt

Reproduserbarheten ble beregnet i samsvar med metoden beskrevet av NCCLS E5-A* (se tabell 39, under). Denne metoden krever beregning av varianskomponenter for hver av variabilitetskildene: laboratorium, dag, kjøring og feil (definert som variasjon mellom analyser). Hver av de 6 panelmedlemmene ble testet i kvadruplikat i hver av de 10 kjøringene (2 kjøring per dag over 5 dagers testing) ved hver av de 3 testlaboratoriene.

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

Tabell 39. Reproduserbarhet av PreservCyt-prøver – RCS-automatisert testing med manuell prøveklargjøring; kvantitativ reproduserbarhet

Panelmedlem	n	Gj.sn. RLU/CO	Standardavvik				Totalt	Total CV (%)
			Innen kjøring	Mellom kjøringer	Mellom dager	Mellom laboratorier		
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

† Negative varianskomponenter er nullstilt..

svært nær analysens cutoff, ble en ytterligere presisjonsstudie utført på et senter utenfor QIAGEN ved bruk av RCS.

Panelet besto av 1 negativ, 2 negative eller lavt positive og 2 lavt positive medlemmer. Hvert panelmedlem ble klargjort ved å tilsette dyrkede Jurkat- og SiHa-celler i PreservCyt-løsning for å gi RLU/CO-målværdiene (se tabell 40, under).

Dette eksterne senteret fullførte RCS-automatisert testing ved bruk av et enkelt parti *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testreagenser for hver testkjøring, og utfører testen 2 ganger daglig på 3 ulike dager med et medfølgende 5-medlemspanel bestående av simulerte PreservCyt-prøver. Hvert panelmedlem ble delt inn i 4 prøver, og alle 4 prøver ble testet på samme mikroplate (se tabell 41, under).

Tabell 40. Reproduserbarhet av PreservCyt-prøver – RCS-automatisert testing med manuell prøveklargjøring; panelmedlemmer for kvantitativ reproduserbarhet nær analysens CO

Panelmedlem	Omtrentlig RLU/CO value	Forventet resultat
1N	0.2	Negativ
2N	0.8–1.2	Høyt negativt/lavt positivt
3P	0.8–1.2	Høyt negativt/lavt positivt
4P	1.2–2.0	Lavt positivt
5P	1.2–2.0	Lavt positivt

Tabell 41. Reproduserbarhet av PreservCyt-prøver – RCS-automatisert testing med manuell prøveklargjøring; kvantitativ reproduserbarhet nær analysens CO

Panel-medlem	n	Gj.sn. RLU/CO	Standardavvik			Totalt	CV (%)
			Innen kjøring	Mellom kjøring	Mellom dager		
1N	24	0.14	0.01	0*	0.02	0.02	15.12
2N	24	1.39	0.14	0.15	0*	0.21	14.84
3P	24	1.31	0.16	0*	0.11	0.19	14.70
4P	24	1.74	0.13	0.21	0.18	0.31	17.73
5P	24	1.63	0.24	0.20	0.26	0.40	24.63

* Negative varianskomponenter er nullstilt.

Prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet

En intern studie av prøveklargjøringsmetoden ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet ble utført ved bruk av kliniske PreservCyt-prøver tatt fra kvinner med en av de to følgende cytologiresultatene:

- ASC-US eller høyere enn ASC-US
- negative for intraepitelial lesjon eller malignitet (NILM)

To prøver ble fjernet fra hver prøve. Hver prøve ble klargjort enkeltvis ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet, og resultatene ble bestemt av RCS-automatisert testing med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen.

I likhet med andre kvalitative IVD-tester er variasjon innen *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testresultatene fra kliniske prøver hovedsakelig forbundet med en av, eller en kombinasjon av, følgende: Prøvetaking, prøveklargjøring og testprosedyren. Siden testresultatene som ble sammenlignet ble oppnådd fra samme kliniske prøve (omtalt som "mellom prøver"), kontrollerte den eksperimentelle utformingen for variasjon grunnet prøvetaking. Reproduserbarheten av resultater (se tabell 42, under), oppnådd fra 2 individuelt klargjorte prøver fra samme kliniske prøve, reflekterer variasjon grunnet prøveklargjøring og testprosedyren

Tabell 42. Reproduerbarhet av PreservCyt-prøver – prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet; kvalitativ reproduerbarhet mellom prøver

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

En ytterligere studie ble utført for å evaluere reproduerbarheten av resultater ved bruk av simulerte PreservCyt-prøver. Prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet ble etterfulgt av RCS-automatisert testing med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen. De 8 positive panelmedlemmene ble klargjort ved å tilsette enten HPV DNA-positive SiHa- eller HeLa-celler til HPV DNA-negative C-33 A-celler i PreservCyt-løsning, mens de 2 HPV DNA-negative panelmedlemmene kun inneholdt HPV DNA-negative C-33 A-celler.

Tre ulike brukere utførte testingen på en enkel dag ved bruk av tre ulike QIASymphony SP-instrumenter og tre ulike QIASymphony DSP HPV Media Kit-partier med panelmedlem 2N, 3E, 5P, 7P og 9P. Panelmedlem 2N, 3E, 5P og 7P ble testet med 18 replikater over 3 ulike kjøring, og ga 54 datapunkter for hvert panelmedlem. Panelmedlem 9P ble testet med 16 replikater over 3 ulike kjøring, og ga 48 datapunkter.

Én bruker utførte *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen på tre ulike dager ved bruk av tre ulike QIASymphony SP-instrumenter og ett QIASymphony DSP HPV Media Kit-parti med panelmedlem 1N, 4E, 6P, 8P og 10P. Panelmedlem 1N, 4E, 6P og 8P ble testet med 18 replikater over 8 ulike kjøring, og ga 144 datapunkter for hvert panelmedlem. Panelmedlem 10P ble testet med 16 replikater over 8 ulike kjøring, og ga 128 datapunkter.

For panelmedlemmer med gjennomsnittlig RLU/CO på 20 % eller mer over CO, var 572 av 572 (100,0 %) positive. For panelmedlemmer med gjennomsnittlig RLU/CO innen 20 % over eller under CO, var 98 av 198 (49,5 %) positive og 100 av 198 (50,5 %) negative. For panelmedlemmer med gjennomsnittlig RLU/CO på 20 % eller mer under CO, var 198 av 198 (100,0 %) negative (se tabell 43, under).

Tabell 43. Reproduserbarhet av PreservCyt-prøver – prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet; kvalitativ reproduserbarhet

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

Resultatene indikerte at prøver ved 20 % eller mer unna CO kan forventes å gi konsekvente resultater. Prøver nær CO ga omtrent like antall positive og negative resultater. Disse data viser at AXpH-prøveklargjøring av PreservCyt-prøver ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet, etterfulgt av testing med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen, gir reproduserbare resultater.

Resultater fra den interne studien ble også brukt til å evaluere den kvantitative reproduserbarheten av resultater fra prøveklargjøring av PreservCyt-prøver ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet (se tabell 44 og tabell 45, under).

Tabell 44. Reproduserbarhet av PreservCyt-prøver – prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet; kvantitativ reproduserbarhet med samme bruker

Panel-medlem	n	Gj.sn. RLU/CO	Standardavvik			Anslått totalt standardavvik	Anslått total CV (%)
			Innen kjøring	Mellom kjøring	Mellom kombinasjoner*		
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

* Mellom kombinasjoner av QIASymphony SP-instrumenter og ulike dager

Tabell 45. Reproduserbarhet av PreservCyt-prøver – prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet; kvantitativ reproduserbarhet på samme dag

Panel-medlem	n	Gj.sn. RLU/CO	Standardavvik			Anslått total CV (%)
			Innen kjøring	Mellom kjøring [†]	Anslått totalt standardavvik	
2N	54	0.41	0.04	0.05	0.06	15.86
3E	54	0.81	0.08	0.08	0.12	14.48
5P	54	3.17	0.38	0.33	0.50	15.72
7P	54	6.77	0.92	0.38	1.00	14.73
9P	48	13.72	2.64	1.15	2.88	21.01

[†] En kjøring består av en kombinasjon av et QIASymphony DSP HPV Media-sett, et QIASymphony SP-instrument, og en bruker.

Den kvantitative reproduserbarheten er svært høy, indikert av at alle CV-verdier blir værende under 25 %. Standardavvik mellom kjøring er sammenlignbare med den tilsvarende verdien innen kjøring, hvilket indikerer konsekvente resultater uavhengig av det anvendte instrumentet eller settpartiet.

Prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet

En intern studie av prøveklargjøringsmetoden ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet ble utført ved bruk av kliniske PreservCyt-prøver tatt fra kvinner med cytologi på enten ASC-US eller NILM. To prøver ble fjernet fra hver prøve. Hver prøve ble klargjort enkeltvis ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet, og resultatene ble bestemt av RCS-automatisert testing med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen.

I likhet med andre kvalitative IVD-tester er variasjon innen *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testresultatene fra kliniske prøver hovedsakelig forbundet med en av, eller en kombinasjon av, følgende: Prøvetaking, prøveklargjøring og testprosedyren. Siden testresultatene som ble sammenlignet ble oppnådd fra samme kliniske prøve (omtalt som "mellom prøver"), kontrollerte den eksperimentelle utformingen for variasjon grunnet prøvetaking. Reproduserbarheten av resultater (se tabell 46, under), oppnådd fra 2 individuelt klargjorte prøver fra samme kliniske prøve, reflekterer variasjon grunnet prøveklargjøring og testprosedyren.

Tabell 46. Reproduserbarhet av PreservCyt-prøver – prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet; kvalitativ reproduserbarhet mellom prøver

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

En ytterligere studie ble utført for å evaluere reproduserbarheten av resultater ved bruk av simulerte PreservCyt-prøver. Prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet ble etterfulgt av RCS-automatisert testing med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen.

Tre ulike operatører utførte *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen på ulike dager ved bruk av ulike instrumenter og ulike reagenspartier med et panel med 9- medlemmer. Hvert panelmedlem ble testet i duplikat over 24 ulike kjøring, og ga 48 datapunkter for hvert panelmedlem. De 8 positive panelmedlemmene ble klargjort ved å tilsette enten HPV DNA-positive SiHa- eller HeLa-celler til HPV DNA-negative H9-celler i PreservCyt-løsning, mens det HPV DNA-negative panelmedlemmet kun inneholdt HPV DNA-negative H9-celler.

For panelmedlemmer med gjennomsnittlig RLU/CO på 20 % eller mer over CO, var 237 av 240 (98,8 %) positive. For panelmedlemmer med gjennomsnittlig RLU/CO innen 20 % over eller under CO, var 95 av 144 (66,0 %) positive og 49 av 144 (34,0 %) negative. For panelmedlemmer med gjennomsnittlig RLU/CO på 20 % eller mer under CO, var 48 av 48 (100,0 %) negative (se tabell 47, under).

Tabell 47. Reproduserbarhet av PreservCyt-prøver – prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet; kvalitativ reproduserbarhet

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

Resultatene indikerte at prøver ved 20 % eller mer unna CO kan forventes å gi konsekvente resultater. Prøver nær CO ga omtrent like antall positive og negative resultater. Disse data viser at AXpH-prøveklargjøring av PreservCyt-prøver ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet, etterfulgt av testing med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen, gir reproducerbare resultater.

Resultater fra den interne studien ble også brukt til å evaluere den kvantitative reproducerbarheten av resultater fra prøveklargjøring av PreservCyt-prøver ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet (se tabell 48, under).

Tabell 48. Reproducerbarhet av PreservCyt-prøver – prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet; kvantitativ reproducerbarhet

Panel-medlem	n	Gj.sn. RLU/CO	Standardavvik			Anslått totalt standardavvik	Anslått total CV (%)
			Innen kjøring	Mellom kjøring	Mellom kombinasjoner*		
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

*Mellom kombinasjoner av *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testsett, QIASymphony DSP AXpH DNA-sett, anvendt RCS, anvendt QIASymphony SP, og bruker.

Reproducerbarhet av kliniske SurePath-prøver

Manuell testing

Reproducerbarheten av manuell testing av SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen ble bestemt i en studie ved bruk av 3 ulike laboratorier. Panelmedlemmer ble testet ved bruk av en CO på 1,0 RLU/CO på ulike dager og med ulike kjøring ved bruk av et identisk sett panelmedlemmer med kjent positiv eller negativ HPV-status. Prøvepanelet besto av 5 positive, 2 høyt negative/lavt positive og 5 negative medlemmer

Hvert panelmedlem ble klargjort ved å kombinere unike kliniske prøver samlet inn i SurePath-konservingsmiddel med kjent negativ og positiv HPV-status for å oppnå ønskede RLU/CO-

målverdier. Hvert panelmedlem ble testet i duplikat, to ganger daglig, over en periode på 5 dager ved hver av de 3 laboratoriene som deltok i studien (se tabell 49, under).

Tabell 49. Reproduserbarhet av SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet – manuell testing; kvalitativ reproduserbarhet

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

RCS-automatisert testing

Reproduserbarheten av resultater fra SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet med RCS-automatisert testing ble sammenlignet med resultatene fra manuell testing. To separate alikvoter fra samme behandlede SurePath-prøve med post-gradient-cellepellet (fra samme prøve) ble testet (se tabell 50, under).

Tabell 50. Reproduserbarhet av SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet – RCS-automatisert testing; overensstemmelse av resultater mellom RCS-automatisert og manuell testing

Positiv overensstemmelse (%) (n/N) 95 % CI		Negativ overensstemmelse (%) (n/N) 95 % CI	
Alle positive	Sterkt positiv region (RLU/CO $\geq 2,5$)	Alle negative	Sterkt negativ region (RLU/CO $< 0,80$)
99.0 (417/421) 97.6–99.7	100.0 (375/375) 99.0–100.0	97.7 (1057/1079) 96.9–98.75	98.7 (1050/1064) 97.8–99.28

Prøveklargjøring av SurePath-prøver ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet.

En studie ble utført for å evaluere reproduserbarheten av resultater ved bruk av simulerte SurePath-prøver. Prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet ble etterfulgt av RCS-automatisert testing med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen. De 4 positive panelmedlemmene ble klargjort ved å tilsette enten HPV DNA-positive SiHa-celler til HPV DNA-negative H9-celler i SurePath-konserveringsmiddel, mens det HPV DNA-negative panelmedlemmet kun inneholdt HPV DNA-negative H9-celler i SurePath-konserveringsmiddel.

Tre ulike brukere utførte testingen på 6 ulike dager ved bruk av 3 ulike QIASymphony SP-instrumenter og 3 ulike QIASymphony DSP HPV Media Kit-partier med panelmedlem 1N, 2E, 3P, 4P og 5P. Panelmedlem 1N, 2E, 3P og 4P ble testet med 18 replikater over 37 ulike kjøring, og ga 666 datapunkter for panelmedlem 2E og 3P og 665 datapunkter for panelmedlem 1N og 4P. Panelmedlem 5P ble testet med 16 replikater over 37 ulike kjøring, og ga 590 datapunkter. Fire datapunkter ble ekskludert grunnet utilstrekkelig volum, som flagget av QIASymphony SP under prøveklargjøring.

For panelmedlemmer med gjennomsnittlig RLU/CO på 20 % eller mer over CO, var 1921 av 1921 (100,0 %) positive. For panelmedlemmer med gjennomsnittlig RLU/CO innen 20 % over eller under CO, var 410 av 666 (61,6 %) positive og 256 av 666 (38,4 %) negative. For panelmedlemmer med gjennomsnittlig RLU/CO på 20 % eller mer under CO, var 664 av 665 (99,8 %) negative (se tabell 51, under).

Tabell 51. Reproduserbarhet av SurePath-prøver – prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet; kvalitativ reproduserbarhet

Panelmedlem	Cellotype	Gj.sn. RLU/CO	Standardavvik	Positivt testresultat (%) (n/N)
1N	H-9	0.38	0.06	0.2 (1/665)
2E	SiHa og H-9	1.06	0.17	61.6 (410/666)
3P	SiHa og H-9	4.51	0.78	100.0 (666/666)
4P	SiHa og H-9	8.34	1.57	100.0 (665/665)
5P	SiHa og H-9	24.69	5.12	100.0 (590/590)

Resultatene indikerte at SurePath-prøver ved 20 % eller mer unna CO kan forventes å gi konsekvente resultater. SurePath-prøver nær CO ga omtrent like antall positive og negative resultater. Disse data viser at AXpH-prøveklargjøring av SurePath-prøver ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet, etterfulgt av testing med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen, gir reproduserbare resultater.

Resultater fra den interne studien ble også brukt til å evaluere den kvantitative reproduserbarheten av resultater fra prøveklargjøring av SurePath-prøver ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet (se tabell 51, under).

Tre ulike brukere utførte testingen på 6 ulike dager ved bruk av 3 ulike QIASymphony SP-instrumenter og 3 ulike QIASymphony DSP HPV Media Kit-partier med panelmedlem 1N, 2E, 3P, 4P og 5P. Panelmedlem 1N, 2E, 3P og 4P ble testet med 18 replikater, og ga 162 datapunkter for hvert panelmedlem. Panelmedlem 5P ble testet med 16 replikater, og ga 144 datapunkter (se tabell 52, under).

Tabell 52. Reproduserbarhet av SurePath-prøver – prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet; kvantitativ reproduserbarhet

Panel-medlem	n	Gj.sn. RLU/CO	Standardavvik			Anslått totalt standardavvik	Anslått total CV (%)
			Innen kjøring	Mellom dager	Mellom kombinasjoner*		
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

* En kjøring består av en kombinasjon av et QIASymphony DSP HPV Media-sett, et QIASymphony SP-instrument, og en bruker på en bestemt dag

Den kvantitative reproduserbarheten er svært høy, indikert av at alle CV-verdier blir værende under 26 %. Standardavvik mellom kjøring er sammenlignbare med den tilsvarende verdien innen kjøring, hvilket indikerer konsekvente resultater uavhengig av det anvendte instrumentet eller settpartiet.

Prøveklargjøring av SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet

En studie ble utført for å evaluere reproduserbarheten av resultater ved bruk av simulerte SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet. Prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet ble etterfulgt av RCS-automatisert testing med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen. Cellekulturmateriale i 70 % SurePath-konserveringsmiddel ble brukt til å etterligne SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet. De 4 positive panelmedlemmene ble klargjort ved å tilsette enten HPV DNA-positive SiHa-celler til HPV DNA-negative H9-celler i SurePath-konserveringsmiddel, mens det HPV DNA-negative panelmedlemmet kun inneholdt HPV DNA-negative H9-celler i SurePath-konserveringsmiddel.

Fire ulike brukere utførte testingen på 6 ulike dager ved bruk av 3 ulike QIASymphony SP-instrumenter og 3 ulike QIASymphony DSP HPV Media Kit-partier med panelmedlem 1, 2, 3, 4 og 5. Panelmedlemmene 1, 2, 3 og 4 ble testet med 18 replikater over 37 ulike kjøring, og ga 666 datapunkter for panelmedlem 1 og 3 og 665 datapunkter for panelmedlem 2 and 4. To datapunkter ble ekskludert grunnet utilstrekkelig volum, som flagget av QIASymphony SP under prøveklargjøring. Panelmedlem 5 ble testet med 16 replikater over 37 ulike kjøring, og ga 592 datapunkter.

For panelmedlemmer med gjennomsnittlig RLU/CO på 20 % eller mer over CO, var 1923 av 1923 (100,0%) positive. For panelmedlemmer med gjennomsnittlig RLU/CO innen 20 % over eller under CO, var 416 av 665 (62,6 %) positive og 249 av 665 (37,4 %) negative. For panelmedlemmer med gjennomsnittlig RLU/CO på 20 % eller mer under CO, var 666 av 666 (100 %) negative (se tabell 53, under).

Tabell 53. Reproduserbarhet av SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet – prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet; kvalitativ reproduserbarhet

Panelmedlem	Celletype	Gj.sn. RLU/CO	Standardavvik	CV (%)	Positivt testresultat (%) (n/N)
1	H-9	0.12	0.02	18.77	0.0 (0/666)
2	SiHa og H-9	0.96	0.11	11.15	62.6 (416/665)
3	SiHa og H-9	4.72	0.56	11.89	100.0 (666/666)
4	SiHa og H-9	9.34	0.98	10.46	100.0 (665/665)
5	SiHa og H-9	24.9	3.37	13.55	100.0 (592/592)

gi konsekvente resultater. SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet nær CO ga omtrent like antall positive og negative resultater. Disse dataene viser at prøveklargjøring av SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet, etterfulgt av testing med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen, gir reproduserbare resultater.

Resultater fra den interne studien ble også brukt til å evaluere den kvantitative reproduserbarheten av resultater fra prøveklargjøring av SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet.

Fire ulike brukere utførte testingen på 6 ulike dager ved bruk av 3 ulike QIASymphony SP-instrumenter og 3 ulike QIASymphony DSP HPV Media Kit-partier med panelmedlem 1, 2, 3, 4 og 5. Panelmedlemmene 1, 2, 3 og 4 ble testet med 18 replikater og ga 162 datapunkter for hvert panelmedlem. Panelmedlem 5 ble testet med 16 replikater og ga 144 datapunkter (se tabell 54, under).

Tabell 54. Reproduerbarhet av SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet – prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet; kvantitativ reproduerbarhet

Panelmedlem	n	Gj.sn. RLU/CO	Standardavvik				Anslått totalt standardavvik	Anslått total CV (%)
			Innen kjøringer	Mellom dager	Mellom kombinasjoner*			
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	

* Mellom kombinasjoner av ulike dager, brukere, QIASymphony DSP HPV Media-settpartier og QIASymphony SP-instrumenter.

Den kvantitative reproduerbarheten er svært høy, indikert av at alle CV-verdier blir værende under 20%. Standardavvik mellom kjøring er sammenlignbare med den tilsvarende verdien innen kjøring, hvilket indikerer konsekvente resultater uavhengig av det anvendte instrumentet eller settpartiet.

Kryssreaktivitet

Et batteri av bakterier, virus og plasmider som ofte finnes i den kvinnelige anogenitale kanalen, samt en samling av kutaneotrope HPV-typer der kloner var tilgjengelige, ble analysert for å bestemme om kryssreaktivitet ville oppstå med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen. Alle mikroorganismer ble analysert ved konsentrasjoner på 1×10^5 og 1×10^7 organismer per ml. Renset DNA for virus og plasmider ble analysert ved en konsentrasjon på 4 ng/ml.

Følgende bakterier ble testet, og alle testet negativt i *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen:

- *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)*

* Både *E. coli*-stammen brukt til å dyrke plasmider (HB101) og et klinisk isolat av *E. coli* ble analysert.

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

Følgende virus- eller plasmid-DNA eller humant serum ble testet, og alle testet negativt i *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen:

- Adenovirus 2
- Cytomegalovirus
- Epstein-Barr-virus
- Hepatitt B-overflateantigen-positivt serum
- Herpes simplex I
- Herpes simplex II

- Humant immunsveiktvirus (HIV, RT DNA)
- HPV-typer 1, 2, 3, 4, 5, 8, 13 og 30
- Simian-virustype 40 (SV40)

Det eneste plasmidet som viste kryssreaktivitet i *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen var pBR322. Kryssreaktivitet mellom pBR322 og probeblandingen er ikke uventet siden det er vanskelig å fjerne alt vektor-pBR322-DNA ved isolasjon av HPV-innlegget. Forekomsten av homologe pBR322-sekvenser er rapportert i humane genitalprøver, og falskt positive resultater kan oppstå hvis det finnes høye nivåer av bakterieplasmid. 298 kliniske prøver som testet positivt med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen hadde imidlertid ikke positive resultater grunnet pBR322 ved testing med en pBR322-probe. Sannsynligheten for et falskt positivt *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testresultat grunnet homologe pBR322-sekvenser i kliniske prøver viste seg derfor å være lav.

Krysshybridisering

Atten ulike HPV-typer (høyrisiko og lavrisiko) ble testet med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen ved konsentrasjoner på 4 ng/ml av HPV-DNA. Alle høyrisiko-HPV-målene var positive. Denne studien viste også at det finnes en liten mengde krysshybridisering mellom HPV-type 6 og 42 og *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen. Pasientprøver med høye nivåer (4 ng/ml eller høyere) av HPV-type 6 eller 42 kan ha falskt positive *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testresultater. Den kliniske signifikansen av dette er at pasienter med 4 ng/ml eller høyere av HPV-type 6 eller 42 kan henvises unødvendig til kolposkopi.

digene HC2 High-Risk HPV DNA-testen er også påvist å kryssreagere med HPV-type 40, 53 og 66. Disse typene er sjeldne, og det finnes utilstrekkelige holdepunkter for å fastslå den nøyaktige sammenhengen mellom infeksjon med disse typene og utvikling av høygradig sykdom (15). Det er også rapportert i litteratur at komplekse prober som ligner den brukt i denne testen kan forårsake falskt positive resultater grunnet krysshybridisering med HPV-type 11, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 eller MM9 (35). Selv om flere av disse HPV-typene er sjeldne eller nye typer som ikke ofte forekommer ved høygradig sykdom, kan pasienter med prøver som inneholder høye nivåer av disse HPV-DNA-typene henvises feilaktig til kolposkopi.

Effekt av blod og andre substanser på STM-prøver

Effekten av blod og andre potensielt forstyrrende definerte eller udefinerte substanser ble evaluert i *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen. Fullblod, skyllemiddel, soppdrepende krem og sæddrepende gel (midler som ofte finnes i cervikale prøver) ble tilsatt i STM-negative og STM-

positive prøver (kliniske prøvepooler og ikke-kliniske prøver) ved konsentrasjoner som kan finnes i cervikale prøver.

Ingen falskt positive resultater ble observert med noen av de fire midlene ved noen konsentrasjon. Et falskt negativt resultat kan imidlertid rapporteres i kliniske prøver med HPV-DNA-nivåer nær CO for testen (1 pg/ml) hvis det finnes høye konsentrasjoner av soppdrepende krem eller sæddrepende gel. Det er imidlertid svært usannsynlig at en klinisk prøve vil bestå nesten utelukkende av en av disse substansene, siden cervix renses rutinemessig før det tas prøver til Pap- og HPV-testing.

Effekt av blod og andre substanser på PreservCyt-prøver

Manuell prøveklargjøring

Effekten av blod og andre potensielt forstyrrende definerte eller udefinerte substanser som kan finnes i PreservCyt-prøver ble evaluert i *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen. Fullblod, skyllemiddel, soppdrepende krem og sæddrepende gel (midler som ofte finnes i cervikale prøver) ble tilsatt i negative og positive kliniske PreservCyt-prøvepooler ved konsentrasjoner som kan finnes i cervikale prøver. Ingen falskt positive eller falskt negative resultater ble observert med noen av de 4 midlene ved noen konsentrasjon. Substanser som finnes naturlig i enkelte kliniske prøver hemmer ikke deteksjonen av HPV-DNA av *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen.

Prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet.

Effektene av blod og andre potensielt forstyrrende substanser i PreservCyt-prøver ble evaluert ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet for prøveklargjøring og RCS-automatisert testing ved bruk av *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen. Effektene av følgende potensielt forstyrrende substanser ble testet:

- Soppdrepende krem
- Antiinflammatorisk krem
- Blod
- Sæddrepende gel
- Skyllemiddel
- Intern intimdeodorant for kvinner
- Smøregel
- Sæddrepende midler

Hver substans ble tilsatt i negative og positive kliniske pooler. Ingen falskt positive eller falskt negative resultater ble observert med noen av substansene ved en konsentrasjon som kan finnes i cervikale prøver. Et falskt negativt resultat kan imidlertid rapporteres i kliniske prøver med HPV-DNA-nivåer nær CO for testen hvis det finnes høye konsentrasjoner av soppdrepende krem, vaginalt smøremiddel eller blod. Det er imidlertid svært usannsynlig at en klinisk prøve vil bestå nesten utelukkende av en av disse substansene, siden cervix renses rutinemessig før det tas prøver til Pap- og HPV-testing.

Prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet.

Effekten av fullblod i PreservCyt-prøver ble evaluert ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet for prøveklargjøring og *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen for testing. Kliniske prøver med synlig blod ble valgt og testet ved bruk av både manuell prøveklargjøringsmetode og automatisert prøveklargjøringsmetode ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet. Resultater ble sammenlignet for 238 prøver og ga en total overensstemmelse på 94,12 % og en McNemars p-verdi på 0,2850, hvilket indikerer ingen statistisk signifikant forskjell i klinisk ytelse mellom den manuelle prøveklargjøringsmetoden og den automatiserte prøveklargjøringsmetoden ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet.

Effektene av følgende potensielt forstyrrende substanser ble testet:

- Skylemiddel
- Soppdrepende krem
- Sæddrepende gel
- Mononukleære celler i perifert blod (PBMC)
- Smøregel
- Kvinnelig intimspray
- Sæddrepende midler
- Magnetpartikler
- TopElute-væske

Hver substans ble tilsatt i negative og positive cellepooler ved konsentrasjoner som kan finnes i cervikale prøver, eller kan tilsettes under prøveklargjøring. Ingen falskt positive resultater ble observert med noen av substansene ved noen konsentrasjon. Ingen falskt negative resultater ble observert bortsett fra med sæddrepende gel. Ikke ta en PreservCyt cervical prøve for automatisert prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony DSP AXpH DNA-settet hvis det finnes sæddrepende gel.

Effekt av blod og andre substanser på SurePath-prøver

Prøveklargjøring av SurePath-prøver ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet

Effektene av blod og andre potensielt forstyrrende substanser i SurePath-prøver ble evaluert ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet for prøveklargjøring og RCS-automatisert testing ved bruk av *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen.

Effektene av følgende potensielt forstyrrende substanser ble testet:

- Soppdrepende krem
- Antiinflammatorisk krem
- Blod
- Sæddrepende gel
- Skyblemiddel
- Intern intimdeodorant for kvinner
- Smøregel
- Sæddrepende midler

positive resultater ble observert med noen av substansene ved en konsentrasjon som kan finnes i cervikale prøver.

Ingen falskt negative resultater ble observert bortsett fra med følgende substanser:

- Sæddrepende gel forårsaket falskt negative resultater ved en svært lav konsentrasjon.
- Hvis en høy konsentrasjon av soppdrepende krem finnes i prøven, kan et falskt negativt resultat rapporteres i kliniske prøver med HPV-DNA-nivåer nær CO for testen. Det er imidlertid svært usannsynlig at en klinisk prøve vil bestå nesten utelukkende av soppdrepende krem, siden cervix renses rutinemessig før det tas prøver til Pap- og HPV-testing.

Ikke ta en cervical SurePath-prøve for automatisert prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony HPV Media-settet hvis det finnes soppdrepende krem eller sæddrepende gel.

Prøveklargjøring av SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet

Effektene av blod og andre potensielt forstyrrende substanser i SurePath-prøver med post-gradient-cellepellet ble evaluert ved bruk av QIASymphony DSP HPV Media-settet for prøveklargjøring og RCS-automatisert testing ved bruk av *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen.

Effektene av følgende potensielt forstyrrende substanser ble testet:

- Soppdrepende krem
- Antiinflammatorisk krem
- Blod
- Sæddrepende gel
- Skyllmiddel
- Intern intimdeodorant for kvinner
- Smøregel
- Sæddrepende midler

Hver substans ble tilsatt i negative og positive kliniske pooler og ble deretter prosessert i BD PrepMate-systemet for å etterligne en SurePath-prøve med post-gradient-cellepellet. Det ble observert ett falskt positivt resultat for både blod og soppdrepende krem. Statistisk analyse viste derimot ingen vesentlig forstyrrelse. Ingen falskt positive resultater ble observert med noen av de andre substansene ved en konsentrasjon som kan finnes i cervikale prøver.

Det ble observert falske negative resultater for soppdrepende krem, antiinflammatorisk krem og sæddrepende gel. Ikke ta en cervical SurePath-prøve for automatisert prøveklargjøring ved bruk av QIASymphony HPV Media-settet hvis det finnes soppdrepende krem, antiinflammatorisk krem eller sæddrepende gel.

Overføring

RCS ble utformet for å minimere prøvekontaminasjon eller -overføring av resterende alkalisk fosfatase ved bruk av pipettespisser til engangsbruk for reagens- og prøveaspirasjon. For å bekrefte denne utformingsegenskapen utførte QIAGEN en rekke studier for å evaluere om bruk av RCS økte risikoen for overføring eller krysskontaminasjon av prøver sammenlignet med den manuelle metoden. En rekke RCS-instrumenter ble brukt for å evaluere overføringsrisiko fra system til system.

I én studie ble 2 ng og 20 ng HPV-DNA-plasmid tilsatt i negativt kontrollmateriale for å klagjøre høyt positive STM-prøver. Konsentrasjonen på 20 ng/ml gir RLU-verdier på ca. 3–5 ganger mer enn de for den høyeste positive kliniske prøven som forventes observert under rutinemessig klinisk testing. Disse simulerte høyt positive prøvene ble plassert over hele mikroplaten i et sjakkemønster vekselvis med brønner som inneholdt kun negativ kontroll (testbrønner). Denne utformingen tar i betraktning potensielt additive effekter av sekvensielle høyt positive prøver. Mikroplater ble deretter testet ved bruk av både manuell og RCS-automatisert testmetode. Etter behandling ble antallet falskt positive testbrønner sammenlignet. RCS-automatisert testing produserte ikke flere

falskt positive testbrønner enn manuell testing med disse simulerte STM-prøvene, selv når mikroplaten inneholdt en ekstremt høy sekvens av positive prøver.

I en andre overføringsevaluering ble HPV-positive PreservCyt-pasientprøver kombinert for å opprette et prøvepanel med ulike nivåer kjemiluminescens for å gi RLU/CO-verdier som representerte det forventede området under rutinemessig klinisk RCS-automatisert testing. De positive prøvene var i et område på ca. 200–1800 RLU/CO. For å evaluere risikoen for overføring, deriblant de potensielle additive effektene av sekvensielle høyt positive prøver, ble disse positive panelmedlemmene plassert på mikroplater i et sjakkmønster ved siden av de negative kontrollbrønnene. Disse platene ble deretter testet ved bruk av den RCS-automatiserte testmetoden.

Resultatene fra denne overføringsevalueringen, ved bruk av poolede pasientprøver, antyder en potensielt falskt positiv rate på 0,3 % grunnet overføringseffekter når man utfører en RCS-automatisert testing med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen.

QIAGENs erfaring med å utføre tester med poolede PreservCyt-prøver antyder at pooling av PreservCyt-prøver skaper prøver som ikke har de samme egenskapene som enkelte pasientprøver. Selv om effektene av denne pooling på overføringsrisikoen til RCS-automatisert testing er ukjent, indikerte ytterligere preklinisk testing av RCS-automatisert testing ingen økt risiko for falskt positive resultater grunnet overføring. Disse evalueringene ble utført ved bruk av kunstige plasmidprøver med DNA-konsentrasjoner på nesten 5 ganger mer enn de observert i den kliniske innstillingen.

En tredje overføringsevaluering skapte testprøver ved å tilsette et fluorescent fargestoff i konsentrasjoner som representerte det dynamiske RLU-området for analysen til bakgrunnsmatrisene som anslo viskositeten til kliniske prøver og *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testreagenser. Disse testprøvene ble deretter behandlet ved bruk av 3 separate RCS-instrumenter, og overføringsrisikoen for hvert av følgende viktige prosedyremessige RCS-trinn ble evaluert:

- Prøveoverføring
- Plate-til-plate-overføring
- Probetilsetning
- Mikroplaterysting
- Mikroplatevasking

Den resulterende fluorescensen ble målt ved en eksitasjonsbølgelengde på 485 nm og en strålingsbølgelengde på 535 nm, og var følsom nok til å påvise en overføringshendelse med forholdet 1:20.000, hvilket tilsvarer et falskt positivt resultat med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testen (dvs. 1 pg i 20 ng). Resultatene fra denne evalueringen demonstrerte ingen

overføringshendelse under noen av de viktige prosedyremessige RCS-trinnene som vil føre til et falskt positivt *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testresultat.

Reagensstabilitet lastet på systemet

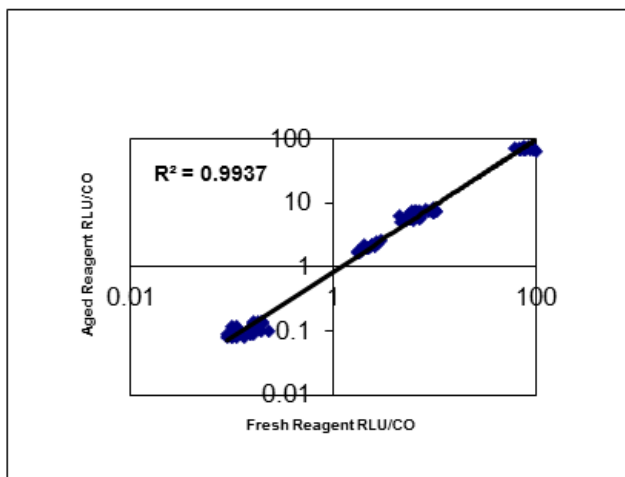
QIAGEN evaluerte ytelseegenskapene til RCS-automatisert testing ved bruk av reagenser som hadde vært lastet på systemplattformen i lange perioder. Reagensene som mest sannsynlig vil oppholde seg på systemet i lang tid inkluderer probeblandingen, DR1, DR2 og oppfangingsmikroplaten.

Testytelsen ble evaluert ved bruk av både nylig klagjorte reagenser og reagenser som har vært lastet på RCS-instrumentet ved romtemperatur i en periode på 16 timer (for å simulere 2 arbeidsskift i et laboratorium). Testing av simulerte kliniske prøver ble utført ved bruk av 2 RCS-instrumenter på hver av de 2 testdagene med en definert reagensmatrise (se tabell 55, under).

Tabell 55. Studieutforming for reagensstabilitet lastet på instrumentet

RCS-instrument	Dag 1	Dag 2
1	Gamle reagenser	Ferske reagenser
2	Ferske reagenser	Gamle reagenser

Et diagram over alle RLU/CO-datapunkter vises i figur 3, under. Diagrammet og regresjonsanalysen for gamle kontra ferske reagenser viser overensstemmelse mellom de gamle og ferske reagensene.



Figur 3. Spredningsdiagram sammenligner analysekalibrator og kontrollverdier ved bruk av aldrede og ferske reagenser

Ytterligere undersøkelse av overensstemmelsesresultatene viser at ingen kvalitative resultater ble endret ved bruk av gamle reagenser (se tabell 56, under).

Tabell 56. Overenstemmelse av ferske kontra gamle reagenser

Statistisk måling	Resultat
Total overensstemmelse (%)	100.0%
(n/N)	(96/96)
95 % CI	97.97–100.0
Positiv overensstemmelse (%)	100.0%
(n/N)	(64/64)
95 % CI	97.97–100.0
Negativ overensstemmelse (%)	100.0%
(n/N)	(32/32)
95 % CI	97.97–100.0
R ²	0.9937
Helning	0.97
Skjæringspunkt	0.47
Kappa	1.0

Dataanalysen viser at resultatene er statistisk identiske for ferske og aldrede reagenser, noe som antyder at reagensene er tilstrekkelig stabile når de plasseres ombord instrumentet i en periode på inntil 16 timer.

Referanser

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

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










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

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

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

Symboler

Symbolene i følgende tabell er benyttet i denne bruksanvisningen.

Symbol	Symboldefinisjon
	Inneholder tilstrekkelig for 96 tester
	Inneholder tilstrekkelig for 384 tester
	Medisinsk enhet til in vitro-diagnostikk
	Katalognummer
	Industri teknikk
	Autorisert representant i EU
	Brukes før
	Se bruksanvisningen
	GTIN-artikkelnummer

Feilsøkingeveiledning

Kommentarer og forslag

Gale eller ingen fargeendringer observert under denaturering

- | | |
|--|--|
| a) DNR ikke riktig klargjort | Kontroller at DNR inneholder indikatorfargestoffet og har en mørkelilla farge. |
| b) DNR ikke tilsatt | Kontroller at DNR ble tilsatt i prøven ved å måle prøvolumet (1,5 ml forventes). Hvis volumet angir at DNR ikke ble tilsatt, må du utføre den korrekte tilsetningen, blande, og fortsette med testen hvis riktig fargeendring nå observeres. |
| c) Prøven inneholder blod eller andre materialer som maskerer fargeendringen | Den nøyaktige fargeendringen som beskrives forventes ikke med disse prøvetypene, og testresultatene skal ikke bli negativt påvirket. |
| d) Prøvens pH kan være unormalt sur | Hvis ingen av de andre årsakene ligger bak, kan prøven være unormalt sur, og den forventede fargeendringen vil ikke inntreffe. Ta en ny prøve før du påfører eddiksyre på cervix, siden feil prøve-pH vil ha en negativ påvirkning på testresultatene. |

Kvalitetskontroller gir feilaktige resultater.

- | | |
|---|---|
| a) Feil analyseprotokoll valgt for testen | Hvis analyseprotokollen er feil for testen som utføres, må du lese mikroplaten på nytt med riktig analyseprotokoll innen 30 minutter etter tilsetning av DR2. |
| b) Omvendt plassering av QC1-LR og QC2-HR | Test prøver på nytt. |
| c) Omvendt plassering av HRC og QC2-HR | Test prøver på nytt. |

Kommentarer og forslag

Feil fargeendring observert under hybridisering.

- | | |
|--|---|
| a) Feil blanding av probeblanding med denaturerte kalibratører, kvalitetskontroller og/eller prøver, eller probeblanding ikke tilsatt, eller feil reagensvolum tilsatt | Ryst hybridiseringsmikroplaten eller mikrorørstativet som inneholder mikrorør i 2 ekstra minutter. Hvis noen mikrorør eller mikroplatebrønner fremdeles er lilla, må du tilsette 25 µl til av den korrekte probeblandingen og blande godt. Hvis du tilsetter probeblandingen og blander den på nytt, men riktig fargeendring ikke inntreffer, og prøven ikke inneholdt blod eller andre materialer, må prøven testes på nytt. |
| b) Prøven inneholder blod eller andre materialer som maskerer fargeendringen | Den nøyaktige fargeendringen som beskrives forventes ikke med disse prøvetyperne, og testresultatene skal ikke bli negativt påvirket. |
| c) Prøven hadde <1000 µl STM | Kontroller volumet i originalprøven. Volumet skal være 1425 µl ± 20 µl (etter fjerning av 75 µl alikvot for testing). Hvis volumet er <1425 µl, inneholdt originalprøven <1000 µl STM. Ta en ny prøve. |

Testens analysevalidering mislykkes. Ingen signaler observert i positive kalibratører, kvalitetskontroller eller prøver.

- | | |
|---|---|
| a) Ingen probe tilsatt i probefortynneren | Klargjør probeblanding som beskrevet i denne bruksanvisningen. Merk rørene nøye. |
| b) Probe kontaminert med RNase under klargjøring | Bruk pipettespisser med aerosolbarriere når du pipetterer prober, og bruk hansker. Klargjør probeblanding i steril beholder. Bruk kun rene, nye reagensbeholdere til engangsbruk. |
| c) Utilstrekkelig blanding av probeblanding | Etter tilsetning av proben i probefortynneren, må du blande svært grundig ved å rotere i høy hastighet i minst 5 sekunder. En synlig vorteks må produseres. |
| d) Utilstrekkelig blanding av probeblanding og denaturert prøve | Etter tilsetning av probeblanding og prøve i hver hybridiseringsmikroplatebrønn eller hvert hybridiseringsmikrorør, må du ryste på Rotary Shaker I stilt inn ved 1100 ± 100 rpm i 3 ± 2 minutter. Kontroller fargeendring fra lilla til gul i hvert mikroplatebrønn eller mikrorør. |
| e) Feil tid eller temperatur | Hybridiser i 60 ± 5 minutter ved 65 ± 2 °C. Kontroller temperaturen til Microplate Heater I eller vannbad. Påse |

Kommentarer og forslag

- | | |
|--|---|
| under hybridiseringstrinn | at Microplate Heater I eller vannbadet er stilt til å varme opp prøver til riktig temperatur og er forhåndsvarmet i 60 minutter før bruk. Påse at vannivået er tilstrekkelig til å varme opp prøver til riktig temperatur. Vannbad skal kalibreres ved jevne mellomrom. |
| f) Utilstrekkelig blanding under oppfangingsstrinnet | Ryst med en Rotary Shaker I i 60 ± 5 minutter ved 20–25 °C som beskrevet i denne bruksanvisningen. Bekreft hastigheten til Rotary Shaker I ved bruk av kalibrering. (Se Brukerhåndboken for Rotary Shaker I (<i>Rotary Shaker I User Manual</i>)). |
| g) Kunne ikke tilsette riktig mengde DR1 eller inkubere i angitt tid | Pipetter 75 µl DR1 i hver mikroplatebrønn ved bruk av en 8-kanals pipette. Inkuber ved 20–25 °C i 30–45 minutter. |
| h) Kunne ikke tilsette riktig mengde DR2 eller inkubere i angitt tid | Pipetter 75 µl DR2 i hver mikroplatebrønn ved bruk av en 8-kanals pipette. Inkuber ved 20–25 °C i 15–30 minutter. |
| i) Svikt i DML-instrument eller feil programmering | Se håndboken for det relevante DML-instrumentet og brukerhåndboken for programvaren for ytterligere instruksjoner, eller kontakt QIAGENs tekniske serviceavdeling. |

Forhøyede RLU-verdier i kalibratorer, kvalitetskontroller og/eller prøver (≥ 200 RLU i mange av eller alle mikroplatebrønnene). Testens analysevalidering kan mislykkes.

- | | |
|---|---|
| a) DNR ikke tilsatt, eller feil reagensvolum tilsatt, eller utilstrekkelig blanding av DNR med prøver, kalibratorer eller kvalitetskontroller | Påse at tilførselen til repetisjonspipetten er nøyaktig før tilsetning av DNR. Kalibrerte pipetter er avgjørende. Tilsett et halvt volum av DNR i hvert rør, og bland godt. For å unngå falskt positive resultater må du påse at væsken vasker over hele innsiden av røret. Kalibratorer, kvalitetskontroller og prøver skal bli lilla etter tilsetning av DNR. |
| b) Lett lekkasje i DML-instrumentet, dør ikke forsegle, forsegling rundt dør brutt | Kontroller bakgrunnsavlesningen (rådatamåling) til DML-instrumentet ved å lese en tom mikroplate. En avlesning på mer enn 50 RLU indikerer at det finnes en lett lekkasje. Se brukerhåndboken for det aktuelle DML-instrumentet for instruksjoner, eller kontakt QIAGENs tekniske serviceavdeling. |
| c) DR2 eller oppfangingsmikroplatebrønner kontaminert av DR1 | Se "Kontaminasjonskontroll av DR2", side 125. |

Kommentarer og forslag

-
- eller eksogen alkalisk fosfatase
- d) Kontaminert vaskebuffer Se "Kontaminasjonskontroll av vaskeapparat og/eller vannkilde", side 125.
- e) Kontaminert Automated Plate Washer Se "Kontaminasjonskontroll av vaskeapparat og/eller vannkilde", side 125.
- f) Utilstrekkelig vasking av oppfangingsmikroplatebrønner etter DR1-inkubasjon Vask oppfangingsmikroplatebrønner grundig med vaskebuffer 6 ganger, enten ved å oversvømme brønnene eller ved bruk av Automated Plate Washer. Ingen resterende rosa væske skal være synlig i mikroplatebrønnene etter vasking. Se Håndboken for Automated Plate Washer (*Automated Plate Washer User Manual*) for instruksjoner om testing for kontaminasjon eller funksjonssvikt.
- g) DR1-kontaminasjon av mikroplatebrønner Påse at alle arbeidsflater er rene og tørre. Vær forsiktig ved bruk av DR1. Unngå aerosoler.
- h) Tørket hybridiseringsløsning på samme område på Kimtowels-servietter eller tilsvarende lofrie papirservietter. Ikke tørk på nytt med brukte Kimtowels-servietter eller tilsvarende lofrie papirservietter.
- i) Brukte feil tørkeservietter Bruk Kimtowels-servietter eller tilsvarende lofrie papirservietter til absorpsjon.

Lave PC/NC-forhold eller høye antall lavt positive prøver med forholdene $<2,0$ (>20 %). Testens analysevalidering kan mislykkes.

- a) Utilstrekkelig prøveklargjøring Tilsett korrekt volum DNR, og bland grundig ved å rotere. For å unngå falskt positive resultater må du påse at væsken vasker over hele innsiden av røret.
- For PreservCyt-prøver må du sørge for at riktig blanding og resuspensjon av cellepelletten fullføres før denatureringsinkubasjon.
- En tydelig fargeendring fra gjennomsiktig til mørkelilla skal observeres. Inkuber i 45 ± 5 minutter ved 65 ± 2 °C.
- b) Probeblanding utilstrekkelig blandet eller utilstrekkelig probeblanding tilsatt Klargjør probeblanding som beskrevet. Bland grundig ved å rotere, og kontroller at en synlig vorteks produseres. Probeblanding må tilsettes i rørene med en pipette med positiv fortregning eller en flerkanalspipette for å sikre

Kommentarer og forslag

- | | |
|--|--|
| | nøyaktig tilførsel. |
| c) Utilstrekkelig volum av probeblanding tilsatt i hver hybridiseringsmikrorør eller mikroplatebrønn | Påse at tilførselen til den 8-kanals pipetten er nøyaktig før tilsetning av probeblanding. Tilsett 25 µl probeblanding i hvert mikrorør eller mikroplatebrønn som inneholder denaturerte kalibratorer, kvalitetskontroller og prøver. Fargeendringen skal være fra mørkelilla til gul etter tilsetning og grundig blanding. PreservCyt-prøver skal bli rosa i stedet for gule. |
| d) Tap av DR1-aktivitet | Oppbevar DR1 ved 2–8 °C. Bruk før utløpsdatoen. |
| e) Utilstrekkelig oppfangning | Oppfangningstrinnet skal utføres ved bruk av en Rotary Shaker I innstilt ved 1100 ± 100 rpm. Valider ristehastighet med kalibrering. |
| f) Utilstrekkelig vasking | Vask mikroplatebrønner grundig med vaskebuffer 6 ganger, enten ved å oversvømme brønnene eller ved bruk av Automated Plate Washer. |
| g) Kontaminert vaskebuffer | Se "Kontaminasjonskontroll av vaskeapparat og/eller vannkilde", side 125. |

Serier med positive prøver med omtrent like RLU-verdier.

- | | |
|---|---|
| a) Kontaminasjon av oppfangingsmikroplatebrønner under test | Dekk til oppfangingsmikroplaten under alle inkubasjoner. Unngå å eksponere rør for aerosolkontaminasjon mens du utfører analysen. Bruk puddefrie hansker under manipuleringer. |
| b) DR2-kontaminasjon | Pass på å ikke kontaminere løsningen når du pipetterer DR2 inn i oppfangingsmikroplatebrønner. Unngå at DR2 kontamineres av aerosoler fra DR1 eller fra støv i laboratoriet osv. |
| c) Funksjonssvikt i Automated Plate Washer | Se "Kontaminasjonskontroll av vaskeapparat og/eller vannkilde", side 125, eller se <i>håndboken for Automated Plate Washer</i> for instruksjoner om testing for kontaminasjon eller funksjonssvikt. |

Brede CVer mellom replikater.

- | | |
|----------------------------|--|
| a) Unøyaktig pipettering | Kontroller pipetten for å sikre at reproduerbare volum tilføres. Kalibrer pipetter rutinemessig. |
| b) Utilstrekkelig blanding | Bland grundig ved alle trinn. Roter før og etter denatureringsinkubasjon og etter tilsetning av |

Kommentarer og forslag

- probeblending. Påse at en synlig vorteks produseres.
- c) Ufullstendig overføring av væske fra hybridiseringsmikrorør eller hybridiseringsmikroplatebrønner til oppfangingsmikroplatebrønner
- Under overføringstrinnet fra hybridiseringsmikroplaten eller hybridiseringsmikrorørene til oppfangingsmikroplatebrønnene må du påse at det overføres reproducerbare volum.
- d) Uegnete vaskeforhold
- Vask mikroplatebrønner grundig med vaskebuffer 6 ganger, enten ved å oversvømme brønnene eller ved bruk av Automated Plate Washer.
- e) DR1-kontaminasjon av mikroplatebrønner
- Påse at alle arbeidsflater er rene og tørre. Vær forsiktig ved bruk av DR1. Unngå aerosoler.

Falskt positive resultater oppnådd fra kjente negative prøver.

- a) DR2 kontaminert
- Pass på å ikke krysskontaminere prøver når du alikvoterer DR2 mellom prøver. Hvis du kun bruker en del av et sett, må du alikvotere det nødvendige volumet for testen inn i en ren reagensbeholder til engangsbruk før fylling av pipetten.
- b) DR1-kontaminasjon av mikroplatebrønner
- Vask mikroplatebrønner grundig med vaskebuffer 6 ganger, enten ved å oversvømme brønnene eller ved bruk av Automated Plate Washer. Ingen resterende rosa væske skal være synlig i mikroplatebrønnene etter vasking.
- c) Tørking på samme område på Kimtowels-servietter eller tilsvarende lofrie papirservietter over flere rader.
- Ikke tørk på et område som allerede er brukt.
- d) Utilstrekkelig prøveklargjøring
- Tilsett korrekt volum DNR, og bland grundig ved å rotere. For å unngå falskt positive resultater må du påse at væsken vasker over hele innsiden av røret.

Ved manuell klargjøring av PreservCyt-prøver må du sørge for at riktig blanding og resuspensjon av cellepelleten fullføres før denatureringsinkubering. Se bruksanvisningen

Kommentarer og forslag

for *digene* HC2 Sample Conversion-settet.

En tydelig fargeendring fra gjennomsiktig til mørkelilla skal observeres. Inkuber i 45 ± 5 minutter ved 65 ± 2 °C. Ved manuell klargjøring av SurePath-prøver må du påse at prøvene inkuberes i 90 ± 5 minutter ved 65 ± 2 °C.

- e) Uegnede vaskeforhold Vask mikroplatebrønner grundig med vaskebuffer 6 ganger, enten ved å oversvømme brønnene eller ved bruk av Automated Plate Washer.
- f) Kontaminasjon av pipettespissen med udenaturert materiale under overføring av denaturert prøve til hybridiseringsmikrorør eller hybridiseringsmikroplatebrønn Denatureringstrinnet i prøvebehandlingsprosedyren må utføres som anvist i denne bruksanvisningen. Feil rotering, vending og rysting av prøver kan føre til ufullstendig denaturering av ikke-spesifikke RNA–DNA-hybrider som er endogene for cervikale prøver. For PreservCyt- eller SurePath-prøver spesielt, vil disse hybridene sannsynligvis forekomme på de innvendige veggene av prøvedenatureringsrøret. For å forhindre overføring av dette ikke-denaturerte cellematerialet, må pipettespissen ikke berøre sidene av prøvedenatureringsrøret under overføring av den denaturerte prøven til hybridiseringsmikrorøret eller hybridiseringsmikroplatebrønnen.

Forhøyede NC-RLU-verdier (>200 RLU). Resten av testen utføres som forventet.

- a) DR2 ble inkubert ved en temperatur på mer enn 20–25 °C. Kjør testen på nytt og påse at oppfangings- og deteksjonstrinnene er inkubert ved 20–25 °C.
- b) DR2 ble inkubert i over 30 minutter. Les mikroplaten etter 15 minutters inkubasjon (senest etter 30 minutters inkubasjon) ved 20–25 °C.
- c) DR2 eller vaskebuffer ble kontaminert med alkalisk fosfatase eller DR1. Se "Kontaminasjonskontroll av DR2," side 125 eller "Kontaminasjonskontroll av vaskeapparat og/eller vannkilde", side 125.

Kommentarer og forslag

Testens analysevalidering mislykkes. Forhøyet $\overline{PCX}/\overline{NCX}$.

Omvendt plassering av HRC og QC2-HR Test prøver på nytt. Les etikettene nøye på kalibratoren og kvalitetskontrollglassene for å forhindre at plasseringen av disse reagensene reverseres.

Kontaminasjonskontroll av DR2

1. Pipetter 75 µl av det alikvoterte, resterende eller opprinnelige hetteglasset med DR2 inn i den tom oppfangingsmikrobrønnen.

Merk: Testing av DR2 i replikater på 3 gir optimal evaluering av ytelsen.

2. Inkuber ved 20–25 °C i 15 minutter. Unngå direkte sollys.
3. Mål mikroplaten ved bruk av et DML-instrument.

DR2-kontrollen skal være <50 RLU.

Hvis DR2-verdier er <50 RLU, kan DR2 brukes til å gjenta testen.

Ved kontaminasjon (>50 RLU) må du skaffe deg et nytt sett og utføre testen på nytt.

Kontaminasjonskontroll av vaskeapparat og/eller vannkilde

1. Merk brønn 1–4. Pipetter 75 µl DR2 inn i 4 separate oppfangingsmikroplatebrønner. Brønn 1 tjener som DR2-kontrollen.
2. Pipetter 10 µl vaskebuffer fra vaskeflasken inn i mikroplatebrønn 2.
3. La vaskebuffer strøme gjennom vaskeslangen. Pipetter 10 µl vaskebuffer fra slangen inn i mikroplatebrønn 3.
4. Skaff tilveie en alikvot av vannet brukt til å klargjøre vaskebufferen. Pipetter 10 µl av vannet inn i mikroplatebrønn 4.
5. Inkuber ved 20–25 °C i 15 minutter. Unngå direkte sollys.
6. Mål mikroplaten ved bruk av et DML-instrument.

DR2-kontrollen (brønn 1) skal være <50 RLU.

Sammenlign RLU fra brønn 2, 3 og 4 med DR2-kontrollens RLU. Individuelle RLU for brønn 2, 3 og 4 skal ikke overskride 50 RLU for DR2-kontrollens RLU.

Verdier over 50 RLU for DR2-kontrollen indikerer kontaminasjon. Se "Manuell vaskemetode", side 55, for instruksjoner om rengjøring og vedlikehold av vaskeapparatet.

Kontaminasjonskontroll av Automated Plate Washer

1. Merk brønn 1–5. Pipetter 75 µl DR2 inn i 5 separate oppfangingsmikroplatebrønner.
Brønn 1 tjener som DR2-kontrollen.
2. Pipetter 10 µl vaskebuffer fra platervaskerens vaskeflaske inn i mikroplatebrønn 2.
3. Trykk på **Prime**-knappen (Prim) på platevaskerens tastatur slik at vaskebufferen kan strømme gjennom slangene. Pipetter 10 µl vaskebuffer fra karet inn i mikroplatebrønn 4.
4. Trykk på **Rinse**-knappen på platevaskerens tastatur slik at skyllevæsken kan strømme gjennom slangene. Pipetter 10 µl vaskebuffer fra karet inn i mikroplatebrønn 5.
5. Trykk på tasten "Rinse" (Skyll) på platevaskeapparatets tastatur slik at skyllevæsken strømmer gjennom slangene. Pipetter 10 µl vaskebuffer fra karet inn i mikroplatebrønn 5.
6. Dekk og inkuber i 15 minutter ved 20–25 °C. Unngå direkte sollys.
7. Mål mikroplaten ved bruk av et DML-instrument.

DR2-kontrollen (brønn 1) skal være <50 RLU.

Sammenlign RLU fra brønn 2, 3, 4 og 5 med DR2-kontrollens RLU. Individuelle RLU for brønn 2, 3, 4 og 5 skal ikke overskride 50 RLU for DR2-kontrollens RLU.

Verdier over 50 RLU for DR2-kontrollen indikerer kontaminasjon av platevaskeren.

Se håndboken for Automated Plate Washer (Automated Plate Washer User Manual) for dekontaminasjonsprosedyren.

Kontaktinformasjon

Bruk kontaktinformasjonsarket fra QIAGEN som følger med testsettet for å kontakte din lokale QIAGEN-representant.

Varemerker: QIAGEN[®], Sample to Insight[®], *digene*[®], Hybrid Capture[®], QIA Symphony[®], 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.).

Registrerte navn, varemerker osv. brukt i dette dokumentet, selv når de ikke er spesifikt merket som slike, skal ikke anses som ubeskyttet av loven.

Dette produktet og dets bruksområder er dekt av en eller flere av følgende patenter:

Hybrid Capture-teknologi er dekt av europeisk patentnr. 0 667 918 registrert i Østerrike, Belgia, Sveits, Liechtenstein, Tyskland, Danmark, Spania, Frankrike, Storbritannia, Hellas, Irland, Italia, Luxembourg, Nederland og Sverige.

Amerikansk Hybrid Capture-patent

6,228,578B1

Amerikanske HPV-patenter

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

© 2012–2015 QIAGEN, med enerett.

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