
Test *digene*[®] HPV Genotyping PS Istruzioni per l'uso

IVD

Σ 96

Per il rilevamento qualitativo dei tipi di papilloma virus umano (HPV)
16, 18 e 45. Da utilizzare con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.



REF

613615



QIAGEN
19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874
Stati Uniti

www.qiagen.com

EC|REP

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
GERMANIA

1058098IT Rev. 03



Indice

Uso previsto	6
Sommario e spiegazioni	6
Principio della procedura	7
Denaturazione	7
Ibridizzazione	7
Cattura ibrida	7
Rilevamento degli ibridi	8
Lavaggio	8
Amplificazione del segnale	8
Materiali in dotazione	10
Contenuto del kit	10
Materiali necessari ma non in dotazione	11
Apparecchiature e materiali da richiedere a QIAGEN	11
Ulteriori apparecchiature e materiali per la preparazione di campioni in soluzione PreservCyt	13
Avvertenze e precauzioni	13
Avvertenze	13
Precauzioni	16
Conservazione e manipolazione dei reagenti	18
Componenti del kit	18
Reagenti preparati	18
Prelievo e preparazione dei campioni	18
Campioni cervicali in STM	19
Campioni cervicali in soluzione PreservCyt	19
Procedura	20
Preparazione dei reagenti	22
Preparazione del campione	28

Protocollo 1: Denaturazione	29
Protocollo 2: Aggiunta della miscela per sonda	31
Protocollo 3: ibridizzazione e cattura ibrida	35
Protocollo 4: Rilevamento degli ibridi	37
Protocollo 5: Lavaggio	39
Protocollo 6: Amplificazione del segnale	42
Protocollo 7: Misurazione della micropiastra di cattura e generazione dei risultati	43
Interpretazione dei risultati	44
Risultati dei test	44
Guida alla risoluzione dei problemi	44
Controllo di qualità	56
Verifica della calibrazione del dosaggio	56
Controlli di qualità specifici per ogni sonda	59
Limiti della metodica	59
Caratteristiche delle prestazioni	60
Concordanza tra il test <i>digene</i> HPV Genotyping PS e un test convalidato di genotipizzazione dell'HPV con reazione a catena della polimerasi quantitativa (qPCR)	60
Specificità analitica	62
Riproducibilità	62
Recupero del DNA per campioni in STM e in PreservCyt	64
Reattività crociata	64
Effetto del sangue e di altre sostanze sui campioni in STM	66
Effetto del sangue e di altre sostanze sui campioni in soluzione PreservCyt	66
Riferimenti bibliografici	67
Riferimenti citati	67

Simboli	69
Informazioni sui contatti	69
Appendice A: Procedure di valutazione della contaminazione	70
Reagente di rilevamento 2	70
Sistema di lavaggio e/o sorgente d'acqua	71
Lavatore automatico per micropiastre	71
Appendice B: Foglio di lavoro di registrazione dei dati del test	73
Informazioni per gli ordini	74

Uso previsto

Il test *digene* HPV Genotyping PS è un test di secondo livello destinato al rilevamento qualitativo dei tipi di HPV ad alto rischio 16, 18 e 45 a seguito di risultato positivo al test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA (rilevamento qualitativo di 13 tipi ad alto rischio). L'identificazione dei tipi di HPV ad alto rischio 16, 18, e 45 fornisce ulteriori informazioni in ausilio al trattamento clinico di donne nell'ambito di programmi di screening del cancro cervicale.

Fra i campioni cervicali analizzabili con il test *digene* HPV Genotyping PS figurano i seguenti:

- Campioni prelevati con il dispositivo di prelievo *digene* HC2 DNA
- Campioni prelevati utilizzando un dispositivo del tipo a spazzolino o una combinazione di spatola/spazzola e posti nella soluzione PreservCyt®

Sommario e spiegazioni

La presenza di alcuni tipi di HPV nell'apparato genitale femminile si associa a diverse malattie, tra cui il condiloma, la papulosi di tipo Bowen, carcinomi e neoplasie cervicali, vaginali e vulvari intraepiteliali (1–3). Sono principi generalmente accettati che questi virus vengano prevalentemente trasmessi per via sessuale e che i tipi di HPV ad alto rischio costituiscano il principale fattore di rischio riconosciuto per lo sviluppo del cancro della cervice (4–8).

I papilloma virus umani sono composti da una particella virale icosaedrica (virione) contenente una molecola di DNA circolare a doppio filamento da 8000 coppie di basi, circondata da un capsido proteico. In seguito all'infezione delle cellule epiteliali, il DNA virale invade l'intero spessore dell'epitelio, mentre i virioni intatti si riscontrano soltanto negli strati più superficiali del tessuto. Per tale motivo, il DNA virale può essere presente sia sotto forma di virioni, sia di sequenze di HPV episomiale o integrato, a seconda del tipo e della gravità della lesione.

La prova indiretta dell'infezione anogenitale da HPV può essere ottenuta attraverso la visita medica e la presenza delle caratteristiche alterazioni cellulari associate a una replicazione virale nei campioni per il Pap Test o la biopsia. In

alternativa, le biopsie possono essere analizzate mediante ibridazione dell'acido nucleico, per rilevare direttamente la presenza del DNA dell'HPV.

Le donne con citologia normale che risultano contemporaneamente positive all'HPV 16 o 18 hanno una probabilità stimata rispettivamente del 26,7% e del 19,1% di sviluppare una neoplasia cervicale intraepiteliale (CIN) 3 o peggiorare entro 12 anni di follow-up (9). Inoltre, i tipi di HPV 16, 18 e 45 sono risultati i 3 genotipi più comuni osservati nel carcinoma a cellule squamose, nell'adenocarcinoma e nel carcinoma adenosquamoso. I 3 tipi di HPV rappresentano insieme il 75% dei casi di carcinoma a cellule squamose e il 94% dei casi di adenocarcinoma (10). È stato altresì dimostrato che i tumori contenenti HPV 18 o 45 hanno una probabilità oltre 2 volte superiore di causare la morte rispetto ai tumori contenenti altri tipi di HPV (11).

Principio della procedura

Il test *digene* HPV Genotyping PS, basato sulla tecnologia Hybrid Capture® 2 (HC2), è un test in vitro di ibridizzazione degli acidi nucleici che utilizza gli oligoribonucleotidi specifici del tipo, la cattura degli anticorpi e il rilevamento qualitativo di segnali di chemiluminescenza. Il test, eseguito in triplicato per ogni campione cervicale, genotipizza per i 3 tipi ad alto rischio (16, 18 e 45) di DNA dell'HPV nei campioni cervicali.

Denaturazione

I campioni cervicali sono trattati con una soluzione di base, in grado di denaturare i virus e di rilasciare il DNA bersaglio.

Ibridizzazione

Il DNA bersaglio dell'HPV è ibridizzato con sonde specifiche di RNA, creando ibridi DNA-RNA.

Cattura ibrida

Gli anticorpi, specifici degli ibridi DNA-RNA e che rivestono la superficie del pozzetto di una micropiastra, catturano gli ibridi DNA-RNA.

Rilevamento degli ibridi

Con l'aggiunta del reagente di rilevamento 1 (DR1), gli ibridi DNA–RNA immobilizzati reagiscono con anticorpi coniugati con fosfatasi alcalina specifici per gli ibridi DNA–RNA. Ad ogni anticorpo sono coniugate varie molecole di fosfatasi alcalina; più anticorpi si legano a ogni ibrido DNA-RNA immobilizzato, dando luogo a una sostanziale amplificazione del segnale.

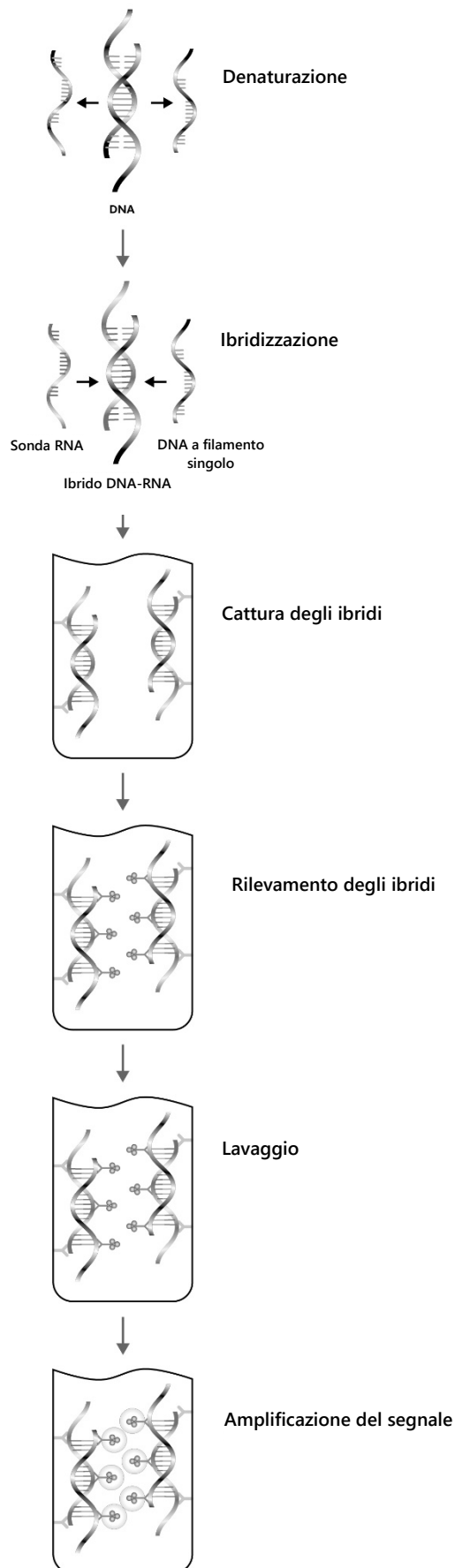
Lavaggio

Il complesso di ibridi DNA–RNA viene lavato per eliminare materiale non legato.

Amplificazione del segnale

Con l'aggiunta del reagente di rilevamento 2 (DR2), si verifica una reazione chemiluminescente quando il substrato viene scisso dalla fosfatasi alcalina legata. La luce emessa è misurata da uno strumento DML e quantificata in unità di luce relative (RLU). L'intensità della luce emessa indica la presenza di DNA bersaglio nel campione.

Diagramma di flusso Hybrid Capture



Materiali in dotazione

Contenuto del kit

<i>digene</i> HPV Genotyping PS Test	(96)
Catalogo n°	613615
Numero di test*	96
HPV Negative Control 1 (Controllo negativo HPV 1)	1 ml
HPV Positive Control 1 (Controllo positivo HPV 1)	1 ml
HPV Negative Control 2 (Controllo negativo HPV 2)	1 ml
HPV Positive Control 2 (Controllo positivo HPV 2)	1 ml
Denaturation Reagent (Reagente di denaturazione)	12 ml
Indicator Dye (Colorante indicatore)	0,35 ml
Probe Diluent (Diluente sonda)	5,5 ml
Detection Reagent 1 (Reagente di rilevamento 1)	12 ml
Detection Reagent 2 (Reagente di rilevamento 2)	12 ml
Wash Buffer x15 (Tampone di lavaggio x15)	2 x 100 ml

* Il numero di risultati dei test varia a seconda del numero di utilizzi per kit, poiché per ogni esecuzione di test sono necessari controlli. Anche il numero di cicli consentiti di congelamento/scongelo dei controlli denaturati può essere un fattore importante nel numero di utilizzi per kit. Per ulteriori informazioni vedere "Punto stop opzionale", pagina 30.

HPV 16 Probe ASR (Sonda HPV 16 ASR)	110 µl
HPV 18 Probe ASR (Sonda HPV 18 ASR)	100 µl
HPV 45 Probe ASR (Sonda HPV 45 ASR)	100 µl
5.5% NP-40 (NP-40 al 5,5%)	2 x 1,5 ml
Capture Microplate (Micropiastra di cattura)	1

Materiali necessari ma non in dotazione

Durante l'uso di sostanze chimiche, indossare sempre un adeguato camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali di protezione. Per maggiori informazioni, consultare le rispettive schede tecniche di sicurezza (SDS), reperibili presso il fornitore.

Apparecchiature e materiali da richiedere a QIAGEN

- Sistema Hybrid Capture 2 *digene* ("sistema HC2 *digene*"), composto da un luminometro approvato da QIAGEN ("strumento DML"), un personal computer e relative periferiche (monitor, tastiera, mouse, stampante e cavo per stampante) approvati da QIAGEN, un software del sistema HC2 *digene* ("software di analisi del test *digene*"), un software per piastre LumiCheck e il Manuale utente del software del sistema HC2 *digene* (*digene HC2 System Software User Manual*)
- Hybrid Capture System Rotary Shaker I
- Hybrid Capture System Automated Plate Washer
- Hybrid Capture System Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 (opzionale)
- Micropiastre per ibridizzazione
- Coperchi per micropiastre
- Puntali extra lunghi per pipette
- Contenitori monouso per reagenti

- Pellicola per sigillare DuraSeal™
- Copripiastra

Apparecchiature e accessori per uso generico di laboratorio

- Agitatore incubatore in grado di mantenere una temperatura di $55 \pm 2^\circ\text{C}$ e di eseguire l'agitazione a 1100 ± 100 giri/min
- Microcentrifuga
- Miscelatore Vortexer con coppetta
- Pipetta a canale singolo; impostazioni variabili per volumi di 20–200 μl e 200–1000 μl
- Pipetta a ripetizione a spostamento positivo, ad esempio Eppendorf® Repeater®
- Pipetta a 8 canali (multicanale); impostazioni variabili per volumi di 25–200 μl
- Contaminuti
- Soluzione di ipoclorito di sodio allo 0,5% v/v
- Pellicola Parafilm® o equivalente
- Puntali monouso con barriera di contenimento dell'aerosol per pipetta a canale singolo (volumi 20–200 μl e 200–1000 μl)
- Puntali monouso per pipetta a ripetizione a spostamento positivo (12,5, 5, 2,5 e 1,25 ml)
- Puntali monouso per pipetta a 8 canali (25–200 μl)
- Salviette KimTowels® o equivalenti salviettine di carta prive di peluria
- Salviette imbevute di alcol
- Copertina monouso per il banco
- Guanti monouso non talcati
- Provette in polipropilene a fondo tondo da 1,5 ml e/o 5 ml
- Rack portaprovette per microcentrifuga flottante

Ulteriori apparecchiature e materiali per la preparazione di campioni in soluzione PreservCyt



Consultare le istruzioni per l'uso del kit *digene* HC2 Sample Conversion.

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico in vitro.

Avvertenze

Durante l'uso di sostanze chimiche, indossare sempre un adeguato camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali di protezione. Per ulteriori informazioni, consultare le appropriate schede di sicurezza (SDS). Le schede SDS, nel pratico e compatto formato PDF, sono disponibili online all'indirizzo www.qiagen.com/safety. Qui è possibile trovare, visualizzare e stampare la scheda SDS per ciascun kit QIAGEN e i relativi componenti.

Campioni



ATTENZIONE: I campioni possono contenere agenti infettivi e devono essere trattati di conseguenza. Tutti i campioni devono essere considerati potenzialmente infettivi.

Nessun metodo di prova conosciuto è in grado garantire con certezza che i campioni non trasmetteranno infezioni. Si raccomanda di trattare i campioni umani secondo le prassi nazionali e locali corrette in materia di biosicurezza. Utilizzare tali prassi per la biosicurezza con materiali contenenti, o che si sospetta contengano, agenti infettivi.

A titolo esemplificativo, fra le precauzioni da adottare figurano le seguenti:

- Non pipettare con la bocca.
- Non fumare, mangiare o bere in aree in cui si utilizzano reagenti o campioni.
- Indossare guanti monouso non talcati quando si utilizzano reagenti o campioni. Lavarsi bene le mani dopo avere eseguito il test.

- Pulire e disinfettare le superfici venute a contatto con i campioni utilizzando un disinfettante tuberculocida, ad esempio ipoclorito di sodio allo 0,5% v/v o altro disinfettante adatto (12, 13).
- Decontaminare e smaltire tutti i campioni, reagenti e altro materiale potenzialmente contaminato in conformità con le normative nazionali e locali.

Dopo la denaturazione e l'incubazione, i campioni non sono più considerati infettivi (14); tuttavia, il personale di laboratorio deve continuare a uniformarsi alle precauzioni nazionali e locali.

Sodio azide

Alcuni reagenti contengono sodio azide. È stato segnalato che la sodio azide si combina con il piombo o il rame nelle tubature dei laboratori. Queste azidi potrebbero esplodere per effetto di percussione, ad esempio colpi di martello. Per evitare la formazione di azidi di rame o piombo, sciacquare gli scarichi abbondantemente con acqua dopo avervi versato soluzioni contenenti sodio azide. Per decontaminare vecchi scarichi in cui si sospetta l'accumulo di azidi, la U.S. Occupational Safety and Health Administration consiglia quanto segue:

1. Travasare i liquidi dal sifone, utilizzando un tubo di gomma o di plastica.
2. Riempirlo con una soluzione di idrossido di sodio al 10% v/v.
3. Lasciare riposare per 16 ore.
4. Risciacquare bene con acqua.

Dichiarazioni di sicurezza e di rischio relative ai componenti

Le seguenti frasi di rischio e di sicurezza si applicano ai componenti del kit per test *digene* HPV Genotyping PS:

5.5% NP-40

Contiene: nonilfenolo etossilato. Attenzione! Provoca una debole irritazione cutanea. Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. Indossare guanti/ indumenti protettivi/ Proteggere gli occhi/ il viso.

Denaturation Reagent



Contiene: idrossido di sodio. Pericolo! Può essere corrosivo per i metalli. Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari. Indossare guanti/ indumenti protettivi/ Proteggere gli occhi/ il viso. IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.

Detection Reagent 1

Contiene: cloruro di zinco. Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. Indossare guanti/ indumenti protettivi/ Proteggere gli occhi/ il viso.

HPV Negative Control 1

Attenzione! Provoca una debole irritazione cutanea. Indossare guanti/ indumenti protettivi/ Proteggere gli occhi/ il viso.

HPV Positive Control 1

Attenzione! Provoca una debole irritazione cutanea. Indossare guanti/ indumenti protettivi/ Proteggere gli occhi/ il viso.

HPV Positive Control 2

Attenzione! Provoca una debole irritazione cutanea. Indossare guanti/ indumenti protettivi/ Proteggere gli occhi/ il viso.

HPV Negative Control 2

Attenzione! Provoca una debole irritazione cutanea. Indossare guanti/ indumenti protettivi/ Proteggere gli occhi/ il viso.

Probe Diluent



Contiene: acido acetico; acido poliacrilico. Pericolo! Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari. Indossare guanti/ indumenti protettivi/ Proteggere gli occhi/ il viso. IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.

Wash Buffer, 15x




Contiene: azoturo di sodio. Attenzione! Nocivo se ingerito. Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. Indossare guanti/ indumenti protettivi/ Proteggere gli occhi/ il viso.

Ulteriori informazioni

Schede di sicurezza: www.qiagen.com/safety

Precauzioni

Durante l'esecuzione del test *digene* HPV Genotyping PS, l'utilizzatore deve sempre uniformarsi alle precauzioni riportate di seguito:

- Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza indicata accanto al simbolo  sull'etichetta della confezione esterna, oppure oltre la data di scadenza dei reagenti preparati.
- L'esecuzione di test al di fuori degli intervalli di tempo e temperatura indicati può dare luogo a risultati non validi. I test che non rientrano negli intervalli di tempo e temperatura stabiliti non sono validi e devono essere ripetuti.
- Per ottenere risultati affidabili, attenersi scrupolosamente alla procedura del test *digene* HPV Genotyping PS, alla calibrazione del dosaggio, al controllo di qualità e all'interpretazione dei risultati.
- È importante pipettare esattamente il volume di reagente indicato e miscelare bene dopo l'aggiunta di ogni reagente. In caso contrario, il risultato del test potrebbe non essere corretto. Verificando se avvengono i cambiamenti di colore descritti si avrà la conferma che le condizioni sopra indicate sono state soddisfatte.
- I componenti del kit sono stati sottoposti a test come insieme. Non sostituirli con componenti provenienti da altre fonti o lotti diversi.
- Gli acidi nucleici sono molto sensibili alla degradazione ambientale delle nucleasi. Le nucleasi sono presenti sulla pelle umana e su superfici o materiali utilizzati dall'uomo. Pulire e coprire le superfici di lavoro con una copertina monouso per il banco e indossare guanti monouso non talcati durante tutte le fasi del test.

- I campioni cervicali possono contenere sangue o altro materiale biologico, che può nascondere i cambiamenti di colore dei campioni. Con campioni che presentano un colore scuro si potrebbe non ottenere il cambiamento di colore descritto. In questi casi, il cambiamento di colore non corretto non influisce sui risultati del test. Verificare la corretta miscelazione osservando il cambiamento di colore dei controlli.
- Durante l'esecuzione del test, prestare attenzione per evitare la contaminazione della micropiastra di cattura e del reagente di rilevamento 2 con fosfatasi alcalina esogena. Fra le sostanze potenzialmente contenenti fosfatasi alcalina figurano il reagente di rilevamento 1, batteri, saliva, capelli e sostanze oleose della pelle. È particolarmente importante coprire la micropiastra di cattura dopo la fase di lavaggio e durante l'incubazione con il reagente di rilevamento 2, in quanto la fosfatasi alcalina esogena potrebbe reagire con tale reagente e dare luogo a falsi positivi.
- Proteggere il reagente di rilevamento 2 dall'esposizione prolungata alla luce diretta. Utilizzare il reagente di rilevamento 2 subito dopo averlo dosato ed evitare la luce solare diretta.
- La pipetta a ripetizione a spostamento positivo deve essere riempita prima di procedere all'erogazione del reagente; è inoltre opportuno eseguire periodicamente un controllo della presenza di grandi bolle d'aria. Quantità eccessive di grandi bolle d'aria, contenute nel puntale della pipetta, possono causare un'erogazione imprecisa e devono essere evitate riempiendo la pipetta, dispensando tutto il liquido e riempiendola nuovamente. Per istruzioni d'uso specifiche, consultare il manuale utente della pipetta.
- Eseguire il pipettamento multicanale utilizzando la tecnica di aspirazione inversa (vedere "Protocollo 4: Rilevamento degli ibridi", pagina 37) per l'erogazione dei reagenti di rilevamento 1 e 2. Controllare il puntale di ogni pipetta multicanale per verificare che sia fissata saldamente e riempita correttamente.
- Verificare che ogni pozzetto per micropiastra sia stato lavato accuratamente (vedere "Protocollo 5: Lavaggio", pagina 39). Un lavaggio inadeguato causa un aumento del rumore di fondo e può dare luogo a risultati falsi positivi. La presenza di residui del tampone di lavaggio nei

pozzetti può dare luogo a una riduzione del segnale o a scarsa riproducibilità.

Conservazione e manipolazione dei reagenti

Componenti del kit

Al ricevimento, conservare il kit a 2–8°C. Se lo si desidera, il tampone di lavaggio x15, il reagente di denaturazione e il colorante indicatore possono essere conservati a temperatura ambiente (15–30°C). Tutti i reagenti sono pronti all'uso, ad eccezione del reagente di denaturazione (DNR), delle miscele per sonde e del tampone di lavaggio.

Reagenti preparati

Una volta preparato, il reagente di denaturazione è stabile per 3 mesi a 2–8°C.

Una volta preparato, il tampone di lavaggio è stabile per 3 mesi a 2–30°C.

Prelievo e preparazione dei campioni

Prelevare e trasportare i campioni cervicali da analizzare con il test *digene* HPV Genotyping PS utilizzando uno dei seguenti dispositivi per il prelievo di campioni:

- Dispositivo di prelievo *digene* HC2 DNA Collection Device [formato da uno spazzolino cervicale e dal Sample Transport Medium (STM)]
- Dispositivo del tipo a spazzolino o una combinazione di spazzolino/spatola inserito nella soluzione PreservCyt

I campioni prelevati utilizzando altri dispositivi di prelievo o trasportati con mezzi diversi da quelli citati non sono convalidati per l'uso con questo test. Le caratteristiche d'esecuzione di questo test sono state stabilite soltanto con i dispositivi di prelievo indicati.

Consultare le istruzioni del dispositivo di prelievo *digene* HC2 DNA Collection Device per l'uso con procedure supplementari di raccolta e manipolazione di campioni.

Campioni cervicali in STM

I campioni cervicali prelevati in STM non richiedono alcuna preparazione prima dell'analisi con il test *digene* HPV Genotyping PS.

Dal momento che il test *digene* HPV Genotyping PS è un test di secondo livello per il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, i campioni in STM saranno stati precedentemente denaturati e sono pronti per procedere al

“Protocollo 2: Aggiunta della miscela per sonda” del test. Per eseguire il test *digene* HPV Genotyping PS, devono essere disponibili almeno 225 µl di ogni campione STM denaturato.

Campioni cervicali in soluzione PreservCyt

I campioni in soluzione PreservCyt richiedono la preparazione prima dell'analisi con il test *digene* HPV Genotyping PS.

Prelevare i campioni secondo la routine e preparare i vetrini del Pap test ThinPrep® seguendo le istruzioni fornite dal produttore. Dopo il prelievo, conservare i campioni in soluzione PreservCyt fino a 3 mesi a 2–30°C prima della preparazione per il test *digene* HPV Genotyping PS. I campioni in soluzione PreservCyt non possono essere congelati.

Il risultato della preparazione dei campioni utilizzando il kit *digene* HC2 Sample Conversion è un campione denaturato pronto per procedere al “Protocollo 2: Aggiunta della miscela per sonda” del test.

Procedura

Cosa fare prima di iniziare

- Attendere almeno 60 minuti che l'agitatore-incubatore si equilibri a $55^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ dopo l'avvio a freddo. Se non si attende questo periodo di riscaldamento, i risultati del test potrebbero essere imprecisi.
- Verificare che la temperatura del bagnomaria sia di 65°C e che vi sia acqua sufficiente per poter immergere l'intero volume di liquido nelle provette.
- Stampare un nuovo "Foglio di lavoro di registrazione dei dati del test" e registrare le seguenti informazioni (vedere "Appendice B: Foglio di lavoro di registrazione dei dati del test", pagina 73):
 - Sede del test
 - Data del test
 - ID operatore
 - Temperatura ambiente
 - Numero di lotto del kit del test *digene* HPV Genotyping PS
- I controlli e in campioni sono analizzati in una configurazione a colonna con 8 pozzetti della micropiastra. Completare il "Foglio di lavoro di registrazione dei dati del test" registrando gli ID di tutti i controlli e i campioni richiesti nelle posizioni dei pozzetti della micropiastra. Per ciascun test, i controlli devono essere analizzati nelle seguenti posizioni sulla micropiastra (vedere la Figura 1 seguente):
 - Replicati controllo negativo 1 (NC1) nei pozzetti micropiastra A1, B1 e C1
 - Replicati controllo positivo 1 (PC1) nei pozzetti micropiastra D1, E1 e F1
 - Controllo negativo 2 (NC2) con miscela per sonda 16 nel pozzetto micropiastra G1
 - NC2 con miscela per sonda 18 nel pozzetto micropiastra H1
 - NC2 con miscela per sonda 45 nel pozzetto micropiastra A2

- Controllo positivo 2 (PC2) con miscela per sonda 16 nel pozzetto micropiastra B2
- PC2 con miscela per sonda 18 nel pozzetto micropiastra C2
- PC2 con miscela per sonda 45 nel pozzetto micropiastra D2

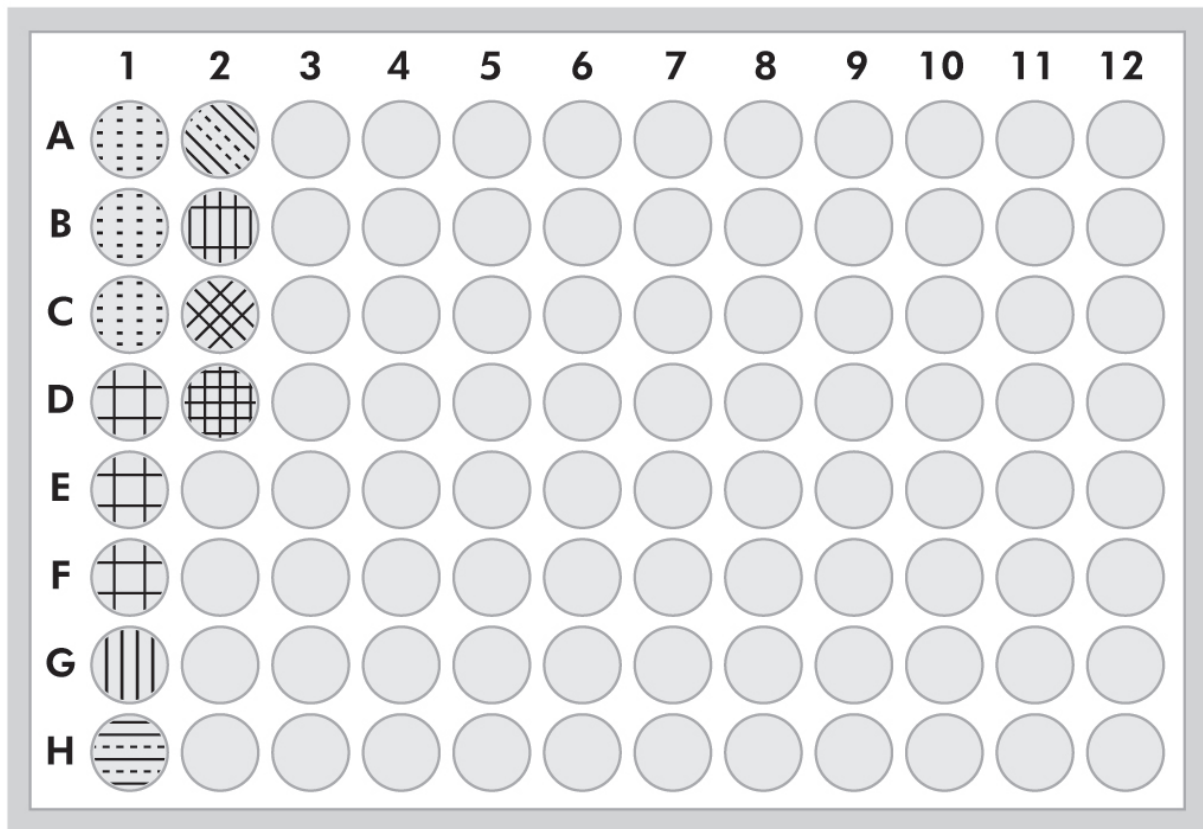


Figura 1. Posizione dei controlli e dei campioni sulla micropiastra.

Preparazione dei reagenti

Punti importanti prima di iniziare

- Preparare i campioni in soluzione PreservCyt prima di equilibrare a temperatura ambiente tutti i campioni denaturati in precedenza e i reagenti.
- Togliere i campioni e tutti i reagenti necessari dal frigorifero prima di iniziare il test. Lasciarli riposare per 15–30 minuti in modo che raggiungano una temperatura di 20–25°C.
- Al termine del test, scartare tutti i reagenti preparati (salvo diversamente specificato) e le aliquote dei reagenti.
- Utilizzare la Tabella 1 seguente per determinare il volume richiesto per ogni reagente in base al numero dei test.

Tabella 1. Volumi richiesti di reagenti preparati e pronti all'uso

Numero di test/strisce*	Miscela	Miscela	Miscela	Tampone di lavaggio	DR1	DR2
	per sonda per HPV 16	per sonda per HPV 18	per sonda per HPV 45			
4/5	0,77 ml	0,56 ml	0,56 ml	>1 litro	2,55 ml	2,55 ml
8/5	0,91 ml	0,70 ml	0,70 ml	>1 litro	3,45 ml	3,45 ml
12/8	1,05 ml	0,84 ml	0,84 ml	>1 litro	4,35 ml	4,35 ml
16/8	1,19 ml	0,98 ml	0,98 ml	>1 litro	5,25 ml	5,25 ml
20/11	1,33 ml	1,12 ml	1,12 ml	>1 litro	6,15 ml	6,15 ml
24/11	1,47 ml	1,26 ml	1,26 ml	>1 litro	7,05 ml	7,05 ml
28/12	1,61 ml	1,40 ml	1,40 ml	>1 litro	7,95 ml	7,95 ml

* Il numero di test/strisce si basa sull'analisi di un solo campione per i tipi di HPV 16, 18 e 45 e include la quantità di reagenti necessaria per i controlli.

Micropiastra di cattura

La micropiastra di cattura contiene 12 strisce di otto pozzetti di cattura su un supporto. Rimuovere dal supporto tutti i pozzetti della micropiastra non utilizzati durante il test, riporli nella busta originale e conservarli per un'eventuale analisi supplementare.

1. Etichettare la micropiastra di cattura con un identificativo appropriato.
2. Determinare il numero di pozzetti della micropiastra di cattura necessari in base al Foglio di lavoro di registrazione dei dati del test completato.
3. Capovolgere la micropiastra di cattura su salviettine KimTowels pulite o equivalenti salviettine di carta prive di peluria.
4. Utilizzando un dito inguantato o il cancellino di una matita, premere le strisce dei pozzetti che non si intendono più utilizzare ed estrarle dal supporto della micropiastra.
5. Riporre le strisce dei pozzetti della micropiastra di cattura nella busta originale, chiudere e conservare.

Nota: La micropiastra di cattura va conservata a 2–8°C.

Reagente di denaturazione

Osservare cautela durante la manipolazione del reagente di denaturazione. Vedere pagina 13 per le avvertenze e le precauzioni.

1. Aggiungere 2 gocce di colorante indicatore nel flacone del reagente di denaturazione.
2. Miscelare accuratamente il reagente di denaturazione.
Il reagente di denaturazione deve presentarsi di un colore viola scuro uniforme.
3. Apporre al reagente di denaturazione l'etichetta con la data di scadenza.

Note:

- Una volta preparato, il reagente di denaturazione è stabile per 3 mesi a 2–8°C.
- Se il colore si attenua, aggiungere un'altra goccia di colorante indicatore e miscelare bene prima dell'uso.

Miscele per sonde

L'analisi di ogni campione per i tipi di HPV 16, 18 e 45 richiede una specifica miscela per sonda per ciascun tipo, per un totale di 3 miscele per campione. È necessaria una quantità supplementare di miscela per sonda HPV 16, poiché è utilizzata per 8 pozzetti della micropiastra di controllo. È necessaria una quantità supplementare di miscela per sonda HPV 18 e HPV 45, poiché ciascuna è utilizzata per 2 pozzetti della micropiastra di controllo.

Preparare ogni miscela per sonda individualmente, come descritto di seguito.

Punti importanti prima di iniziare

- Preparare le miscele per sonde durante il "Protocollo 1: Denaturazione", (vedere pagina 29).
 - Prestare estrema attenzione per evitare la contaminazione da parte delle ribonucleasi. Per pipettare la sonda, servirsi di pipette con puntali dotati di barriera di contenimento dell'aerosol.
 - Il diluente della sonda è denso. Verificare che si formi un vortice visibile durante la preparazione delle miscele per sonde; una miscelazione incompleta può dare luogo a una riduzione del segnale.
1. Per evitare che la sonda rimanga intrappolata nel coperchio della fiala, centrifugare per breve tempo ogni fiala della sonda per portare il liquido sul fondo della stessa.
 2. Picchiettare delicatamente per miscelare.
 3. Determinare i volumi necessari per una diluizione 1:24:10 della sonda:
Diluente sonda: NP-40 al 5,5% per la preparazione della miscela per sonda.
Nota: Per ogni pozzetto di micropiastra sono necessari 35 µl di miscela per sonda.

Raccomandazione: Preparare le miscele per sonde in quantità eccedente, in modo da tenere conto del volume che potrebbe andare perso nei puntali delle pipette o sui lati della fiala. Utilizzare i volumi consigliati (vedere la Tabella 1, pagina 22) che includono il volume eccedente raccomandato.
 4. Etichettare adeguatamente un nuovo contenitore monouso.
A seconda del numero di test, è consigliabile utilizzare un provetta in polipropilene a fondo tondo da 1,5 ml o 5 ml.

5. Pipettare la quantità necessaria di diluente della sonda (vedere la Tabella 2 seguente) nella provetta etichettata.
6. Pipettare la quantità necessaria di sonda nel diluente della sonda (vedere la Tabella 2 seguente), posizionando il puntale della pipetta contro la parete interna della provetta, esattamente al di sopra del menisco, espellendone il contenuto.
Importante: Non immergere il puntale nel diluente della sonda.
7. Pipettare la quantità necessaria di NP-40 al 5,5% (vedere la Tabella 2 seguente) nella provetta etichettata.

Tabella 2. Preparazione della miscela per sonda

Volume necessario della miscela per sonda	Volume del diluente sonda	Volume della sonda	Volume di NP-40 al 5,5%
0,56 ml	384 µl	16 µl	160 µl
0,70 ml	480 µl	20 µl	200 µl
0,77 ml	528 µl	22 µl	220 µl
0,84 ml	576 µl	24 µl	240 µl
0,91 ml	624 µl	26 µl	260 µl
0,98 ml	672 µl	28 µl	280 µl
1,05 ml	720 µl	30 µl	300 µl
1,12 ml	768 µl	32 µl	320 µl
1,19 ml	816 µl	34 µl	340 µl
1,26 ml	864 µl	36 µl	360 µl
1,33 ml	912 µl	38 µl	380 µl
1,40 ml	960 µl	40 µl	400 µl
1,47 ml	1008 µl	42 µl	420 µl
1,61 ml	1056 µl	44 µl	440 µl

8. Agitare per almeno 5 secondi alla velocità massima per ottenere una miscelazione completa.

Deve formarsi un vortice visibile.

Tampone di lavaggio

Punti importanti prima di iniziare

- Preparare il tampone di lavaggio durante il "Protocollo 3: ibridizzazione e cattura ibrida", (vedere pagina 35).
- Per il metodo di lavaggio manuale delle micropiastre, preparare 3 litri di tampone nel sistema di lavaggio.

Raccomandazione: Ogni 3 mesi pulire il sistema di lavaggio e le tubature con soluzione di ipoclorito di sodio allo 0,5%, risciacquando accuratamente con acqua distillata o deionizzata, per evitare la possibile contaminazione da parte della fosfatasi alcalina presente nei batteri e nelle muffe.

- Per l'Automated Plate Washer, preparare il tampone di lavaggio e conservarlo in un contenitore chiuso, oppure prepararne 1 litro per volta e riporlo nell'apposito contenitore di lavaggio dell'Automated Plate Washer.

1. Miscelare bene il tampone di lavaggio x15 e aggiungere il volume necessario di tampone di lavaggio x15 (vedere la Tabella 3 seguente) nel contenitore specificato.
2. Aggiungere il volume necessario di acqua distillata o deionizzata (vedere la Tabella 3 seguente) nel contenitore specificato.

Tabella 3. Preparazione del tampone di lavaggio

Volume di tampone di lavaggio necessario	Volume di tampone di lavaggio x15	Volume di acqua distillata o deionizzata
1 litro	67 ml	933 ml
1,5 litri	100 ml	1.400 ml
2 litri	133 ml	1.867 ml
3 litri	200 ml	2.800 ml

3. Posizionare una salvietta di carta pulita e priva di peluria su tutte le aperture del contenitore e miscelare bene.
4. Sigillare il contenitore o posizionarlo sul rispettivo strumento, a seconda del caso.
5. Apporre al tampone di lavaggio l'etichetta con la data di scadenza.

Nota: Una volta preparato, il tampone di lavaggio è stabile per 3 mesi a 2–30°C.

Preparazione del campione

I campioni in soluzione PreservCyt richiedono la preparazione prima dell'analisi con il test *digene* HPV Genotyping PS. Il test *digene* HPV Genotyping PS richiede 225 µl di campione preparato per l'analisi dei tipi di HPV 16, 18 e 45. Per eseguire tale test si possono utilizzare campioni in soluzione PreservCyt preparati in precedenza e adeguatamente conservati. Nel caso in cui rimanga una quantità insufficiente di campioni preparati in soluzione PreservCyt, per eseguire il test occorre preparare almeno 6 ml di campione in PreservCyt.



Per la preparazione di campioni in soluzione PreservCyt, consultare le istruzioni per l'uso del kit *digene* HC2 Sample Conversion.

Il risultato della preparazione dei campioni utilizzando il kit *digene* HC2 Sample Conversion è un campione denaturato pronto per procedere al "Protocollo 2: Aggiunta della miscela per sonda" del test (vedere pagina 31). Preparare i controlli separatamente secondo il "Protocollo 1: Denaturazione", (vedere pagina 29).

Protocollo 1: Denaturazione

I controlli necessari con il test *digene* HPV Genotyping PS sono denaturati secondo le istruzioni riportate di seguito.

Punti importanti prima di iniziare

- Non denaturare i campioni in STM secondo il “Protocollo 1: Denaturazione”. I campioni in STM sono stati denaturati in precedenza come risultato dell'analisi con il test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA e sono pronti per procedere al “Protocollo 2: Aggiunta della miscela per sonda” del test.
- Non denaturare i campioni in soluzione PreservCyt secondo il “Protocollo 1: Denaturazione”. La denaturazione dei campioni in soluzione PreservCyt viene eseguita come parte della preparazione dei campioni. I campioni in soluzione PreservCyt preparati sono pronti per procedere al “Protocollo 2: Aggiunta della miscela per sonda” del test.
- Fare attenzione a non versare i controlli ed evitare gli spruzzi di reagente di denaturazione durante l'esecuzione di questo protocollo. L'aggiunta di reagente di denaturazione alla provetta del controllo riempie la provetta stessa quasi fino all'orlo. Vedere pagina 13 per le avvertenze e le precauzioni.

Cosa fare prima di iniziare

- Verificare che il livello del bagnomaria sia sufficiente per poter immergere l'intero volume delle provette.
- Per evitare falsi positivi, è di vitale importanza che tutto il materiale di controllo venga a contatto con il reagente di denaturazione.

1. Etichettare i tappi di NC1, PC1, NC2 e PC2.

I tappi possono essere riutilizzati per chiudere le provette dei controlli.

2. Rimuovere i tappi da NC1, PC1, NC2 e PC2, e posizzionarli lontano da un'eventuale contaminazione.

3. Utilizzando una pipetta a canale singolo con un nuovo puntale per ogni aggiunta, pipettare 500 µl di reagente di denaturazione in ciascuna provetta

- di controllo, posizionando il puntale sotto la superficie del liquido ed eseguendo la dispensazione.
4. Riposizionare il tappo su ogni controllo corrispondente e chiudere la provetta. Verificare che i tappi siano ben avvitati per evitare contaminazione o versamenti.
 5. Miscelare accuratamente ogni singola provetta mediante agitazione a impulsi, ad alta velocità e per almeno 30 secondi.
Importante: La miscelazione dopo l'aggiunta di reagente di denaturazione è una fase estremamente importante.
 6. Incubare le provette in un rack portaprovette per microcentrifuga flottante in un bagnomaria a $65 \pm 2^\circ\text{C}$ per 45 ± 5 minuti.
Preparare le necessarie miscele per sonde durante questa incubazione (vedere "Preparazione dei reagenti", pagina 22).
 7. Dopo l'incubazione rimuovere le provette dal bagnomaria.
I controlli denaturati possono essere:
 - Analizzati subito (procedere al "Protocollo 2: Aggiunta della miscela per sonda", pagina 31)
 - Conservati (vedere "Punto stop opzionale", pagina 30)

Punto stop opzionale

Importante: Non conservare o spedire campioni o controlli denaturati su ghiaccio secco.

I controlli denaturati possono essere conservati a $2-8^\circ\text{C}$ fino al giorno dopo oppure a -20°C in conformità con quanto segue:

- È possibile effettuare un massimo di un solo ciclo di congelamento/scongelo per la conservazione fino a 4 settimane.
- È possibile effettuare un massimo di 3 cicli di congelamento/scongelo per la conservazione fino a 9 giorni.

Per ogni ciclo di congelamento/scongelo, è consentito lasciare i materiali a temperatura ambiente per un massimo di 2 ore durante il ciclo di scongelamento.

Protocollo 2: Aggiunta della miscela per sonda

Punti importanti prima di iniziare

- La miscela per sonda è densa. Verificare che la miscela sia accuratamente miscelata e che la necessaria quantità sia completamente dispensata in ogni pozzetto di micropiastra di ibridizzazione.
- Quando si trasferiscono i controlli e i campioni alla micropiastra di ibridizzazione, uniformarsi a quanto segue:
 - Evitare di toccare i lati dei pozzetti della micropiastra di ibridizzazione, poiché possono verificarsi falsi positivi se i campioni non sono trasferiti correttamente.
 - Limitare la formazione di bolle d'aria.
 - Utilizzare un puntale extra lungo pulito per ogni trasferimento al fine di evitare la contaminazione crociata.

Cosa fare prima di iniziare

- Se i controlli o i campioni denaturati sono stati conservati, lasciarli equilibrare a 20–25°C.
- Se i campioni in STM o soluzione PreservCyt sono stati conservati in un rack portacampioni e per la miscelazione sarà utilizzato il Vortexer MST 2, rimuovere ed eliminare i tappi dalle provette.

1. Procurarsi ed etichettare una micropiastra di ibridizzazione.
2. Agitare le provette dei controlli e dei campioni utilizzando uno dei seguenti metodi:

Tutti i tipi di campioni con Vortexer

Agitare ogni singola provetta per almeno 5 secondi alla velocità massima.

Campioni in STM con Vortexer MST 2

- a. Se applicabile, coprire le provette con pellicola per sigillare DuraSeal e fissare il coperchio sul rack portacampioni.
- b. Agitare il rack portacampioni per almeno 5 secondi alla velocità massima.

- c. Posizionare subito il rack portacampioni sul piano di lavoro e sbloccare le clip. Sollevare il coperchio del rack di circa 1 cm e muoverlo delicatamente a sinistra e a destra per sbloccare tutte le provette che potrebbero essersi attaccate alla pellicola per sigillare DuraSeal. Sollevare il coperchio verticalmente fino a togliere il rack portacampioni.
- d. Togliere con cautela la pellicola per sigillare DuraSeal dal coperchio del rack ed eliminarla.

Campioni in soluzione PreservCyt con Vortexer MST 2

- a. Se applicabile, coprire le provette con pellicola per sigillare DuraSeal e fissare il coperchio sul rack portacampioni.
- b. Agitare il rack portacampioni per almeno 10 secondi alla velocità massima.
- c. Posizionare immediatamente il rack portacampioni sul piano di lavoro e sbloccare le clip. Sollevare il coperchio del rack di circa 1 cm e muoverlo delicatamente a sinistra e a destra per sbloccare tutte le provette che potrebbero essersi attaccate alla pellicola per sigillare DuraSeal. Togliere il coperchio del rack sollevandolo verticalmente fino a quando il rack portacampioni risulta visibile.
- d. Togliere con cautela la pellicola per sigillare DuraSeal dal coperchio del rack ed eliminarla.

3. Utilizzando una pipetta a canale singolo con puntali extra lunghi, trasferire 75 µl di ogni controllo o campione sul fondo del pozzetto vuoto della micropiastra di ibridizzazione, secondo quanto indicato nel Foglio di lavoro di registrazione dei dati del test.

Se applicabile, conservare il volume residuo secondo le seguenti istruzioni:

- Chiudere i controlli denaturati con i tappi originali e conservare nel rispetto dei limiti illustrati in "Punto stop opzionale", pagina 30.
- Chiudere i campioni in STM con nuovi tappi a vite per provette di prelievo campioni e conservare secondo quanto indicato nelle istruzioni per l'uso del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.
- Chiudere i campioni in soluzione PreservCyt con un nuovo tappo e conservare secondo quanto indicato nelle istruzioni per l'uso del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

4. Dopo avere trasferito l'ultimo campione, coprire la micropiastra di ibridizzazione con l'apposito coperchio e incubare per 10 minuti a 20–25°C.
5. Agitare accuratamente le miscele per sonde.
6. Pipettare con precisione 35 µl della miscela appropriata in ogni pozzetto della micropiastra di ibridizzazione, utilizzando una pipetta a canale singolo o una pipetta a ripetizione a spostamento positivo, e un puntale nuovo per ogni aggiunta di miscela.

Evitare gli spruzzi e non toccare i lati dei pozzetti della micropiastra di ibridizzazione.

7. Coprire la micropiastra di ibridizzazione con un coperchio o un copripiastra, e agitare sull'agitatore rotante I impostato a 800 ± 100 giri/min per 3 ± 2 minuti.
8. Rimuovere la micropiastra di ibridizzazione dall'agitatore rotante I. Togliere il coperchio della micropiastra e collocarlo su una superficie pulita.

Dopo l'agitazione, i controlli e i campioni in STM dovrebbero assumere una colorazione gialla, mentre i campioni in soluzione PreservCyt dovrebbero diventare rosa.

I campioni che rimangono viola potrebbero non avere ricevuto la quantità corretta di miscela per sonda. Aggiungere altri 35 µl di miscela appropriata

ai campioni rimasti viola e agitare di nuovo per 3 ± 2 minuti sull'agitatore rotante I impostato a 800 ± 100 giri/min.

Se dopo questa procedura vi sono ancora campioni viola, è necessario testarli di nuovo.

9. Procedere a "Protocollo 3: ibridizzazione e cattura ibrida", pagina 35.

Protocollo 3: ibridizzazione e cattura ibrida

1. Posizionare la micropiastra di ibridizzazione accanto alla micropiastra di cattura.
2. Utilizzando una pipetta a 8 canali, trasferire l'intero contenuto (circa 110 μ l) dei pozzetti della micropiastra di ibridizzazione sul fondo dei corrispondenti pozzetti della micropiastra di cattura.

Utilizzare puntali nuovi per ogni trasferimento e svuotare bene tutti i puntali per garantire il trasferimento completo del campione. Se lo si desidera, stabilizzare la pipetta appoggiando la parte mediana dei puntali sul bordo superiore dei pozzetti della micropiastra di cattura (vedere la Figura 2 seguente).

Nota: Se il numero di campioni è ridotto, anziché una pipetta a 8 canali è possibile utilizzare una pipetta a canale singolo con puntali da 20–200 μ l. Utilizzare puntali nuovi per ogni trasferimento.

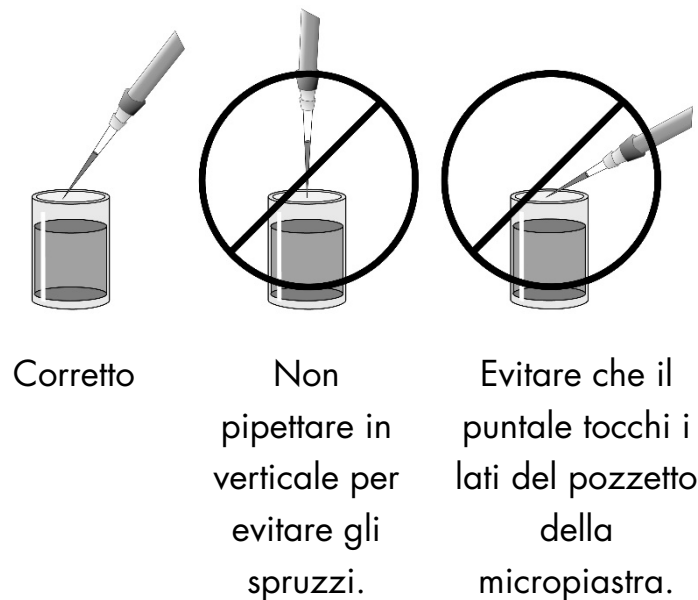


Figura 2. Corretta modalità di pipettamento.

3. Coprire la micropiastra di cattura con un nuovo copripiastra e incubarla per 120 ± 5 minuti a 1100 ± 100 giri/min. nell'agitatore-incubatore equilibrato a $55 \pm 2^\circ\text{C}$.
4. Una volta completata la fase di incubazione, estrarre la micropiastra di cattura dall'agitatore-incubatore e rimuovere con cautela il copripiastra.

5. Eliminare il liquido dai pozzetti versandolo nel lavandino; capovolgere completamente la micropiastra sul lavandino e scuotere con forza con un movimento verso il basso.

Importante: Non capovolgere nuovamente la piastra.

Fare attenzione a non causare spruzzi effettuando il travaso troppo vicino al fondo del lavandino.

6. Asciugare picchettando con decisione per due o tre volte su salviette KimTowels pulite o equivalenti salviette di carta prive di peluria.

Verificare che tutto il liquido sia stato rimosso dai pozzetti e che la parte superiore della micropiastra di cattura sia asciutta.

7. Procedere a "Protocollo 4: Rilevamento degli ibridi", pagina 37.

Protocollo 4: Rilevamento degli ibridi

Punti importanti prima di iniziare

- Effettuare le aggiunte di reagente sulla micropiastra di cattura, procedendo da sinistra verso destra e utilizzando una pipetta a 8 canali. Pulire i puntali sul contenitore monouso per reagenti per rimuovere il reagente in eccesso prima di procedere all'erogazione sulla micropiastra.
 - Se non si utilizza una pipetta a 8 canali, è possibile sostituirla con una pipetta a ripetizione a spostamento positivo. Effettuare i dosaggi del reagente di rilevamento 1 in una provetta di polipropilene di dimensioni sufficienti a contenere il volume necessario.
 - Si consiglia di impiegare la tecnica di aspirazione inversa per erogare il reagente in modo più uniforme. La procedura è descritta qui di seguito.
 - Se lo si desidera, la pipetta può essere stabilizzata appoggiando la parte mediana dei puntali sul bordo superiore dei pozzetti della micropiastra di cattura. Prestare attenzione a non toccare i lati dei pozzetti della micropiastra, in caso contrario potrebbe verificarsi una contaminazione crociata dei campioni (vedere la Figura 2, pagina 35).
1. Miscelare accuratamente il reagente di rilevamento 1 e misurare con precisione il volume appropriato (vedere la Tabella 1, pagina 22) in un contenitore pulito monouso per reagenti.
 2. Pipettare con precisione 75 µl di reagente di rilevamento 1 in ogni pozzetto della micropiastra di cattura secondo la tecnica di aspirazione inversa, procedendo come segue:
 - a. Inserire i puntali su una pipetta a 8 canali, facendo attenzione che siano alloggiati correttamente.
 - b. Spingere lo stantuffo della pipetta oltre il primo arresto fino al secondo arresto.
 - c. Immergere i puntali nel reagente.
 - d. Rilasciare lentamente lo stantuffo e attendere che il reagente riempi i puntali.

- e. Dispensare il reagente nei pozzetti della micropiastra premendo lo stantuffo fino al primo arresto. Non rilasciare lo stantuffo finché i puntali non sono stati reimmersi nel reagente.
- f. Riempire i puntali e ripetere la procedura fino al riempimento completo di tutti i pozzetti.

Verificare che tutti i pozzetti siano stati riempiti osservando l'intensità della colorazione rosa. Tutti i pozzetti dovrebbero presentare più o meno la stessa intensità.

- 3. Coprire la micropiastra di cattura con il coperchio o la pellicola Parafilm pulita (o materiale equivalente) e incubare a 20–25°C per 30–35 minuti.
- 4. Procedere a "Protocollo 5: Lavaggio", pagina 39.

Protocollo 5: Lavaggio

Lavare la micropiastra di cattura seguendo una delle metodiche descritte di seguito.

Metodo con Automated Plate Washer

Tenere sempre acceso l'Automated Plate Washer. Il lavatore automatico per piastre effettua il lavaggio di pulizia di routine. Per ulteriori istruzioni, consultare il *Manuale dell'operatore Automated Plate Washer*.

Cosa fare prima di iniziare

- Verificare che il contenitore per il liquido di lavaggio sia riempito con almeno 1 litro di tampone di lavaggio. In caso contrario, preparare il tampone di lavaggio (vedere "Preparazione dei reagenti", pagina 22).
 - Verificare che il contenitore di risciacquo sia riempito con acqua deionizzata o distillata.
 - Verificare che il contenitore di scarico sia vuoto e che il tappo sia ben chiuso.
 - L'Automated Plate Washer si riempirà automaticamente prima di ogni lavaggio e dopo ogni lavaggio effettuerà un ciclo di risciacquo.
 - L'Automated Plate Washer esegue il lavaggio soltanto di strisce complete e non può saltare pozzetti o strisce. Se si utilizza solo una striscia parziale di pozzetti, prima del lavaggio posizionare dei pozzetti vuoti sul supporto della micropiastra in modo da completare la striscia. Tutte le strisce lavate devono avere pozzetti.
1. Rimuovere il coperchio della micropiastra di cattura o la pellicola Parafilm pulita (o il materiale equivalente) e posizionare la micropiastra sulla piattaforma dell'Automated Plate Washer.
 2. Verificare che il lavatore automatico per piastre sia acceso e che sul display compaia "Digene Wash Ready" (Lavaggio pronto digene) o "P1".
 3. Selezionare il numero di strisce di cui eseguire il lavaggio premendo il tasto "Rows" (File) e "+" o "-" per effettuare la regolazione.
 4. Premere il tasto "Rows" per tornare a "Digene Wash Ready" o "P1".

5. Premere "Start/Stop" (Avvia/Arresta) per iniziare.
Il lavatore automatico per piastre esegue 6 cicli di riempimento e aspirazione, ognuno di circa 10 minuti. Durante il programma vi sarà una breve pausa, quindi non rimuovere la micropiastra di cattura in anticipo.
Quando il lavaggio è terminato, sul display compare "Digene Wash Ready" o "P1".
6. Estrarre la micropiastra di cattura dalla piattaforma del lavatore automatico per piastre al termine dl programma.
I pozzetti della micropiastra devono presentarsi bianchi e non devono contenere nessun residuo di liquido rosa.
7. Procedere a "Protocollo 6: Amplificazione del segnale", pagina 42.

Lavaggio manuale della piastra

Prima di iniziare: Verificare che il sistema di lavaggio sia riempito con almeno 1 litro di tampone di lavaggio.

1. Rimuovere il coperchio della micropiastra di cattura o la pellicola Parafilm pulita (o il materiale equivalente).
2. Porre delle salviettine KimTowels pulite, o equivalenti salviettine di carta prive di peluria, sopra la micropiastra di cattura.
3. Accertarsi che le salviettine di carta siano a contatto con tutta la superficie della micropiastra di cattura, poi capovolgerla con cautela.
4. Lasciare asciugare la micropiastra per 1–2 minuti.
5. Asciugare bene ponendo la micropiastra su salviettine KimTowels pulite, o equivalenti salviettine di carta prive di peluria.
Gettare con cura tutte le salviettine usate per evitare la contaminazione da fosfatasi alcalina.
6. Lavare a mano la micropiastra per 6 volte utilizzando il sistema di lavaggio.
Per eseguire un lavaggio corretto, riempire ogni pozzetto con tampone di lavaggio finché non trabocca. Ciò consente di rimuovere il reagente di rilevamento 1 dalla parte superiore dei pozzetti della micropiastra di cattura. Il lavaggio inizia dal pozzetto A1 e continua a serpentina, procedendo verso destra e verso il basso. Una volta riempiti tutti i pozzetti,

versare il liquido nel lavandino con un movimento deciso verso il basso. Il secondo lavaggio parte dal pozzetto H12 e procede a serpentina verso sinistra e verso l'alto.

Questa sequenza di 2 lavaggi viene ripetuta altre 2 volte per un totale di 6 lavaggi per micropiastra.

7. Dopo il lavaggio, asciugare la micropiastra capovolgendola su salviettine KimTowels pulite, o equivalenti salviettine di carta prive di peluria, picchettando con decisione 3–4 volte. Cambiare le salviettine di carta e asciugare di nuovo.
8. Lasciare la micropiastra capovolta e farla asciugare per 5 minuti. Cambiare le salviettine di carta e asciugare di nuovo.

La micropiastra deve presentarsi bianca e nei pozzetti non devono essere rimaste tracce di liquido rosa residuo.

9. Procedere a “Protocollo 6: Amplificazione del segnale”, pagina 42.

Protocollo 6: Amplificazione del segnale

Punti importanti prima di iniziare

- Utilizzare un nuovo paio di guanti monouso non talcati per il trattamento del reagente di rilevamento 2.
 - Effettuare le aggiunte di reagente sulla micropiastra di cattura, procedendo da sinistra verso destra e utilizzando una pipetta a 8 canali.
 - Se non si utilizza una pipetta a 8 canali, è possibile sostituirla con una pipetta a ripetizione a spostamento positivo. Effettuare i dosaggi del reagente di rilevamento 2 in una provetta di polipropilene di dimensioni sufficienti a contenere il volume necessario.
 - Aggiungere il reagente di rilevamento 2 senza interruzioni. I tempi di incubazione di tutti i pozzetti della micropiastra di cattura devono essere il più possibile identici.
 - Prestare attenzione a non toccare i lati dei pozzetti e ad evitare di spruzzare il reagente sui puntali della pipetta, perché potrebbe verificarsi una contaminazione crociata dei campioni (vedere la Figura 2, pagina 35).
1. Miscelare accuratamente il reagente di rilevamento 2 e misurare con precisione il volume appropriato (vedere la Tabella 1, pagina 22) in un contenitore pulito monouso per reagenti.
 2. Pipettare 75 µl di reagente di rilevamento 2 in ogni pozzetto della micropiastra di cattura secondo la tecnica di aspirazione inversa precedentemente descritta (vedere "Protocollo 4: Rilevamento degli ibridi", pagina 37).

Verificare che tutti i pozzetti siano stati accuratamente riempiti osservando l'intensità della colorazione gialla; tutti i pozzetti dovrebbero presentare più o meno la stessa intensità.
 3. Coprire la micropiastra con il coperchio e incubare a 20–25°C per 15 minuti (non superare i 30 minuti di incubazione).

Evitare la luce del sole diretta.
 4. Procedere a "Protocollo 7: Misurazione della micropiastra di cattura e generazione dei risultati", pagina 43.

Protocollo 7: Misurazione della micropiastra di cattura e generazione dei risultati

1. Quando l'incubazione è terminata, misurare la micropiastra di cattura utilizzando la funzione di misurazione dei dati non elaborati di uno strumento DML.

Consultare il manuale utente del rispettivo software per dettagli sulla misurazione di una micropiastra di cattura.

2. Stampare il referto con dati non elaborati

Importante: Il referto con dati non elaborati va stampato dopo la misurazione. Il referto con dati non elaborati non può essere salvato utilizzando il software d'analisi del test *digene*.

3. Applicare sul referto con dati non elaborati un'etichetta contenente le informazioni specificate sul Foglio di lavoro di registrazione dei dati del test.

4. Se non è stata utilizzata una micropiastra di cattura completa, rimuovere i pozzetti utilizzati dal supporto della micropiastra, sciacquare bene il supporto con acqua distillata o deionizzata, asciugare e tenerlo da parte per il test successivo.

5. Eliminare tutte le aliquote di reagenti e i reagenti preparati, salvo diversamente specificato.

Interpretazione dei risultati

Il valore soglia (CO) del test *digene* HPV Genotyping PS corrisponde a 5.000 copie di plasmidi dell'HPV 16, 18 e 45.

Importante: Prima di interpretare i risultati, completare tutti i requisiti relativi ai controlli di qualità e alla verifica della calibrazione del dosaggio (vedere "Controllo di qualità", pagina 56).

Risultati dei test

Il CO per determinare i campioni positivi è il valore medio di PC1 (controllo positivo 1). Utilizzando il valore medio calcolato di PC1 durante la verifica della calibrazione del dosaggio, determinare il valore RLU/CO per ogni campione. I risultati del test sono determinati come segue:

- I campioni con un valore RLU/CO $\geq 2,0$ sono considerati "positivi" per quel tipo di HPV.
- I campioni con un valore RLU/CO $< 2,0$ sono considerati "negativi" o "nessun DNA dell'HPV rilevato" per quel tipo di HPV. Le sequenze di DNA dell'HPV sono assenti o i livelli del DNA dell'HPV sono al di sotto del limite di rilevamento del test.

Guida alla risoluzione dei problemi

Commenti e suggerimenti

Cambiamento di colore non corretto o non osservato durante la denaturazione dei controlli

- | | |
|--|---|
| a) Preparazione non corretta del reagente di denaturazione | Verificare che il reagente di denaturazione contenga il colorante indicatore e sia di colore viola scuro. |
|--|---|

Commenti e suggerimenti

- b) Il reagente di denaturazione non è stato aggiunto ai controlli
- Verificare che il reagente di denaturazione sia stato aggiunto ai controlli misurando il volume nella micropiastra (deve essere pari a 75 µl).
- Se dal volume si evince che non è stato aggiunto il reagente di denaturazione, aggiungerlo correttamente, miscelare e procedere con il test se si osserva il cambiamento di colore corretto.

I controlli di qualità danno risultati non corretti

- Posizionamento non corretto dei controlli sulla micropiastra
- Regolare la procedura di verifica della calibrazione del dosaggio in modo che corrisponda al "Foglio di lavoro di registrazione dei dati del test".
- Accertarsi che i risultati corrispondano ai criteri adeguati di verifica della calibrazione del dosaggio.

Cambiamento di colore non corretto osservato durante l'aggiunta della miscela per sonda

- a) Miscelazione inadeguata della miscela per sonda con i controlli e/o i campioni, oppure aggiunta del volume non corretto di miscela
- Agitare la micropiastra di ibridizzazione per altri 2 minuti.
- Se vi sono campioni che rimangono viola, aggiungere altri 35 µl di miscela per sonda corretta e miscelare bene agitando per 3 minuti a 800 ± 100 giri/min.
- Se dopo l'aggiunta della miscela e la rimiscelazione non si ottiene il cambiamento di colore corretto e il campione non conteneva sangue o altri materiali, eseguire di nuovo il test sul campione.

Commenti e suggerimenti

- b) Il campione contiene sangue o altri materiali che mascherano il cambiamento di colore
- Con questi campioni non è previsto l'esatto cambiamento di colore descritto; ciò non dovrebbe influire negativamente sui risultati del test.

Il test non è conforme alla verifica di calibrazione del dosaggio; nessun segnale nei controlli o nei campioni

- a) La miscela è stata preparata senza la sonda
- Vedere "Preparazione dei reagenti", pagina 22, per le istruzioni relative alla preparazione della miscela per sonda.
- b) Miscela per sonda contaminata da ribonucleasi durante la preparazione
- Per pipettare la sonda e la miscela, indossare guanti monouso non talcati e servirsi di pipette con puntali dotati di barriera di contenimento dell'aerosol. Preparare la miscela per sonda in contenitori sterili.
- c) Miscelazione inadeguata durante la preparazione della miscela per sonda
- Dopo avere aggiunto la sonda alla miscela, miscelare accuratamente ad alta velocità per almeno 5 secondi. Deve formarsi un vortice visibile.
- d) Tempo o temperatura non corretti durante "Protocollo 3: ibridizzazione e cattura ibrida"
- Testare di nuovo i campioni.
- e) Quantità di reagente di rilevamento 1 non corretta o periodo di incubazione non rispettato
- Pipettare 75 µl di reagente di rilevamento 1 in ogni pozzetto della micropiastra utilizzando una pipetta a 8 canali. Incubare a 20–25°C per 30–35 minuti.

Commenti e suggerimenti

- | | | |
|----|---|---|
| f) | Quantità aggiunta di reagente di rilevamento 2 non corretta o periodo di incubazione non rispettato | Pipettare 75 µl di reagente di rilevamento 2 in ogni pozzetto della micropiastra utilizzando una pipetta a 8 canali.
Incubare a 20–25°C per 15–30 minuti. |
| g) | Malfunzionamento dello strumento DML | Per ulteriori istruzioni, consultare le sezioni di manutenzione, assistenza e risoluzione di problemi nel relativo manuale utente, oppure rivolgersi all'assistenza tecnica QIAGEN. |

Valori RLU elevati (≥ 200 RLU) di controlli e/o campioni; il test potrebbe non essere conforme ai criteri di verifica della calibrazione del dosaggio

- | | | |
|----|---|---|
| a) | Volume di reagente di denaturazione aggiunto non corretto o miscelazione inadeguata | Verificare che la pipetta a ripetizione a spostamento positivo eroghi le quantità corrette prima di aggiungere il reagente di denaturazione. È essenziale utilizzare pipette calibrate.

Aggiungere metà volume di reagente di denaturazione a ogni micropiastra e miscelare bene. Per evitare falsi positivi, accertarsi che il liquido bagni l'intera superficie interna del pozzetto della micropiastra. Dopo l'aggiunta del reagente di denaturazione, i controlli dovrebbero assumere una colorazione viola. |
|----|---|---|

Commenti e suggerimenti

- b) Leggera perdita nello strumento DML
- Controllare la lettura del rumore di fondo (misurazione dei dati non elaborati) dello strumento DML leggendo una micropiastra vuota. Una lettura superiore a 50 RLU indica la probabile esistenza di una lieve perdita.
- Per ulteriori istruzioni, consultare le sezioni di manutenzione, assistenza e risoluzione di problemi nel relativo manuale utente, oppure rivolgersi all'assistenza tecnica QIAGEN.
- c) Contaminazione del reagente di rilevamento 2 o dei controlli negativi con il reagente di rilevamento 1 o fosfatasi alcalina esogena
- Vedere "Appendice A: Procedure di valutazione della contaminazione", pagina 70.
- d) Contaminazione del tampone di lavaggio
- Vedere "Appendice A: Procedure di valutazione della contaminazione", pagina 70.
- e) Contaminazione del lavatore automatico per piastre
- Vedere "Appendice A: Procedure di valutazione della contaminazione", pagina 70.

Commenti e suggerimenti

- f) Lavaggio inadeguato dei pozzetti della micropiastra di cattura dopo l'incubazione del reagente di rilevamento 1
Lavare accuratamente i pozzetti della micropiastra con il tampone di lavaggio per 6 volte, riempiendoli ogni volta fino a farli traboccare o utilizzando il lavatore automatico per piastre. Dopo il lavaggio, nei pozzetti non devono essere presenti tracce visibili di liquido rosa residuo. Per istruzioni relative alla verifica della contaminazione o ai guasti, consultare il *Manuale dell'operatore Automated Plate Washer*.
- g) Contaminazione dei controlli negativi con il reagente di rilevamento 1
Verificare che tutte le superfici siano pulite e asciutte. Utilizzare il reagente di rilevamento 1 con precauzione. Evitare di creare aerosol.
- h) Contaminazione della micropiastra di cattura durante il travaso e l'asciugatura
Asciugare sempre la micropiastra di cattura ponendola su salviettine KimTowels nuove e pulite, o equivalenti salviettine di carta prive di peluria.
Non asciugare la micropiastra di cattura su salviettine già usate in precedenza per evitare l'eventuale contaminazione crociata.
- i) Utilizzo di salviettine non corrette per l'asciugatura
Per l'asciugatura, utilizzare salviettine KimTowels o salviette equivalenti in carta prive di peluria
- j) Materiale PC2 utilizzato come PC1 o test non conforme alla verifica del dosaggio del rapporto PC1/NC1.
Ripetere il test e accertarsi che siano utilizzati i controlli corretti.

Commenti e suggerimenti

Rapporto PC/NC basso o numero elevato (>20%) di campioni debolmente positivi; il test potrebbe non essere conforme ai criteri di verifica della calibratura del dosaggio

- a) Preparazione inadeguata del campione
- Durante la denaturazione, accertarsi che a ogni campione sia aggiunto il volume corretto di reagente di denaturazione. Miscelare bene agitando. Per evitare falsi positivi, accertarsi che il liquido bagni l'intera superficie interna della provetta.
- Durante la preparazione dei campioni in soluzione PreservCyt, verificare che la miscelazione sia corretta e che il precipitato cellulare sia tornato completamente in sospensione prima dell'incubazione per la denaturazione. Per ulteriori informazioni, consultare le istruzioni per l'uso del kit *digene* HC2 Sample Conversion.
- Si dovrebbe osservare un netto cambiamento di colore a viola scuro. Incubare a $65 \pm 2^\circ\text{C}$ per 45 ± 5 minuti.
- b) Denaturazione inadeguata dei controlli
- Verificare che la temperatura del bagnomaria sia precisa e che vi sia acqua sufficiente per poter immergere l'intero volume delle provette.
- Accertarsi che i controlli siano ben miscelati dopo l'aggiunta del reagente di denaturazione.

Commenti e suggerimenti

- c) Miscelazione inadeguata della miscela per sonda o aggiunta insufficiente di miscela ai controlli e/o ai campioni
- Durante la preparazione della miscela, agitare accuratamente e verificare che venga prodotto un vortice visibile. Per assicurare un'erogazione precisa, la miscela per sonda deve essere aggiunta ai pozzetti della micropiastra servendosi di una pipetta a ripetizione a spostamento positivo oppure di una pipetta multicanale.
- Per ulteriori istruzioni vedere "Preparazione dei reagenti", pagina 22.
- d) Aggiunta di un volume inadeguato della miscela per sonda ai controlli e/o ai campioni
- Verificare che la pipetta eroghi le quantità corrette prima di aggiungere la miscela per sonda ai controlli e/o ai campioni.
- e) Perdita di attività da parte del reagente di rilevamento 1
- Conservare il reagente di rilevamento 1 alla temperatura specificata (vedere "Conservazione e manipolazione dei reagenti", pagina 18).
- f) Cattura insufficiente degli ibridi DNA-RNA
- Verificare che l'agitatore-incubatore funzioni correttamente e che sia calibrato.
- g) Lavaggio inadeguato
- Lavare accuratamente i pozzetti della micropiastra con il tampone di lavaggio per 6 volte, riempiendoli ogni volta fino a farli traboccare o utilizzando il lavatore automatico per piastre.
- h) Contaminazione del tampone di lavaggio
- Vedere "Appendice A: Procedure di valutazione della contaminazione", pagina 70.

Commenti e suggerimenti

Serie di campioni positivi con valori RLU pressoché identici

- | | |
|--|--|
| a) Contaminazione dei pozzetti della micropiastra di cattura | Coprire la micropiastra di cattura durante tutte le incubazioni. Evitare di esporre i reagenti e la micropiastra alla contaminazione di aerosol mentre si esegue il test.

Indossare guanti non talcati durante il test. |
| b) Contaminazione del reagente di rilevamento 2 | Prestare attenzione a non contaminare il reagente di rilevamento 2 quando si pipetta il reagente stesso nei pozzetti della micropiastra di cattura. Evitare la contaminazione del reagente di rilevamento 2 con aerosol. |
| c) Guasto del lavatore automatico per piastre | Per istruzioni relative alla verifica della contaminazione o ai guasti, consultare il <i>Manuale dell'operatore Automated Plate Washer</i> . |

Ampio CV dei replicati di controllo

- | | |
|---|---|
| a) Uso scorretto delle pipette durante l'esecuzione del test | Verificare che la pipetta eroghi quantità precise. Calibrare le pipette utilizzate di routine. |
| b) Miscelazione insufficiente durante l'esecuzione del test | Miscelare bene in tutte le fasi, in particolare durante la denaturazione e dopo avere aggiunto la miscela per sonda. |
| c) Trasferimento incompleto del liquido dai pozzetti della micropiastra di ibridizzazione ai pozzetti della micropiastra di cattura | Verificare che il trasferimento del liquido dai pozzetti della micropiastra di ibridizzazione ai pozzetti della micropiastra di cattura sia completo. |

Commenti e suggerimenti

- d) Lavaggio inadeguato dei pozzetti della micropiastra
Lavare accuratamente i pozzetti della micropiastra con il tampone di lavaggio per 6 volte, riempiendoli ogni volta fino a farli traboccare o utilizzando il lavatore automatico per piastre.
Dopo il lavaggio, nei pozzetti non devono essere presenti tracce visibili di liquido rosa residuo.
- e) Contaminazione dei pozzetti della micropiastra con il reagente di rilevamento 1
Verificare che tutte le superfici siano pulite e asciutte. Utilizzare il reagente di rilevamento 1 con precauzione. Evitare di creare aerosol.

Falsi positivi ottenuti da campioni la cui negatività è nota

- a) Preparazione inadeguata del campione
Accertarsi che a ogni controllo e a ogni campione sia aggiunto il volume corretto di reagente di denaturazione. Miscelare bene agitando. Per evitare falsi positivi, accertarsi che il liquido bagni l'intera superficie interna della provetta.
Durante la preparazione dei campioni in soluzione PreservCyt, verificare che la miscelazione sia corretta e che il precipitato cellulare sia tornato completamente in sospensione prima dell'incubazione per la denaturazione. Per ulteriori informazioni, consultare le istruzioni per l'uso del kit *digene* HC2 Sample Conversion.
Si dovrebbe osservare un netto cambiamento di colore a viola scuro.
Incubare a $65 \pm 2^\circ\text{C}$ per 45 ± 5 minuti.

Commenti e suggerimenti

- b) Contaminazione del puntale della pipetta con materiale non denaturato durante il trasferimento del campione al pozzetto della micropiastra di ibridizzazione
- Una miscelazione insufficiente può dare luogo a una denaturazione incompleta degli ibridi DNA–RNA non specifici endogeni ai campioni cervicali
- In particolare, quando si utilizzano campioni in soluzione PreservCyt è probabile che questi ibridi siano presenti sulle pareti della provetta del campione. Per evitare possibili residui di questo materiale cellulare non denaturato, il puntale della pipetta non deve toccare i lati della provetta del campione durante il trasferimento di quest'ultimo nel pozzetto della micropiastra di ibridizzazione.
- c) Contaminazione dei pozzetti della micropiastra con il reagente di rilevamento 1
- Lavare accuratamente i pozzetti della micropiastra con il tampone di lavaggio per 6 volte, riempiendoli ogni volta fino a farli traboccare o utilizzando il lavatore automatico per piastre.
- Dopo il lavaggio, nei pozzetti non devono essere presenti tracce visibili di liquido rosa residuo.
- d) Contaminazione della micropiastra di cattura durante il travaso e l'asciugatura
- Asciugare sempre la micropiastra di cattura ponendola su salviettine KimTowels nuove e pulite, o equivalenti salviettine di carta prive di peluria.
- Non asciugare la micropiastra di cattura su salviettine già usate in precedenza per evitare l'eventuale contaminazione crociata.

Commenti e suggerimenti

- e) Lavaggio inadeguato dei pozzetti della micropiastra di cattura
- Lavare accuratamente i pozzetti della micropiastra con il tampone di lavaggio per 6 volte, riempiendoli ogni volta fino a farli traboccare o utilizzando il lavatore automatico per piastre.
- Dopo il lavaggio, nei pozzetti non devono essere presenti tracce visibili di liquido rosa residuo.
- f) Contaminazione del reagente di rilevamento 2
- Prestare attenzione a non causare la contaminazione crociata dei campioni quando si aggiunge il reagente di rilevamento 2 ai campioni stessi.
- Se si utilizza un kit solo in parte, prima di riempire la pipetta dosare il volume del reagente di rilevamento 2 necessario per il test in un contenitore per reagenti monouso pulito.

Elevati valori RLU del controllo negativo 1 (>150 RLU); il resto del test viene eseguito come previsto

- a) L'incubazione della micropiastra di cattura con il reagente di rilevamento 2 è stata eseguita per una durata e a una temperatura non comprese entro i valori specificati
- I risultati del test non sono validi. Ripetere il test e accertarsi che la micropiastra di cattura sia incubata per la durata corretta e la temperatura specificata.

b) Contaminazione del reagente di rilevamento 2 o del tampone di lavaggio con fosfatasi alcalina o il reagente di rilevamento 1	Vedere "Appendice A: Procedure di valutazione della contaminazione", pagina 70.
---	---

Controllo di qualità

Verifica della calibrazione del dosaggio

La verifica della calibrazione del dosaggio viene eseguita per garantire che i reagenti, i calibratori e i controlli di qualità funzionino correttamente, permettendo una determinazione precisa del valore soglia del dosaggio. Poiché per il test *digene* HPV Genotyping PS è necessaria una calibrazione del dosaggio per ogni test, occorre procedere alla verifica di ciascun test. Questa procedura di verifica della calibrazione del dosaggio non sostituisce i test di controllo di qualità interni. Sono stati stabiliti intervalli accettabili per la verifica della calibrazione del dosaggio soltanto per gli strumenti DML approvati da QIAGEN.

Il test deve soddisfare i criteri specificati di verifiche. Qualora uno dei seguenti criteri risulti non valido, anche i risultati del test non saranno validi.

Controllo negativo 1

Il controllo negativo 1 (NC1) deve essere analizzato in tre replicati per ogni test utilizzando la miscela per sonda HPV 16. Per verificare la calibrazione del dosaggio dei replicati di NC1, procedere come illustrato di seguito.

1. Calcolare la media e il coefficiente di variazione (CV) dei 3 replicati di NC1.

Una media valida di NC1 è ≥ 10 e ≤ 185 RLU, mentre il CV è $\leq 35\%$.

Procedere come segue:

- Se sono soddisfatti i necessari criteri di verifica della calibrazione del dosaggio per NC1, procedere alla verifica del controllo positivo 1.
- In caso contrario, continuare con questa procedura.

Nota: La formula per il calcolo del CV è: (deviazione standard/media) $\times 100 = CV\%$

2. Scartare il replicato di NC1 con il valore RLU che più si allontana dalla media precedentemente calcolata come valore estremo.
3. Calcolare la media e il CV con i 2 replicati rimanenti di NC1.

Se la media e il CV soddisfano i necessari criteri di verifica della calibrazione del dosaggio per NC1, passare alla verifica del controllo positivo 1.

Se non sono soddisfatti i necessari criteri di verifica della calibrazione per il dosaggio di NC1, la calibrazione non è valida e occorre ripetere il test per tutti i campioni. Pertanto, i risultati ottenuti con il test *digene* HPV Genotyping PS non devono essere messi a referto.

Controllo positivo 1

Il controllo positivo 1 (PC1) deve essere analizzato in tre replicati per ogni test utilizzando la miscela per sonda HPV 16. Per verificare la calibrazione del dosaggio dei replicati di PC1, procedere come illustrato di seguito.

1. Calcolare la media e il CV dei 3 replicati di PC1.

Un CV valido di PC1 è $\leq 25\%$. Procedere come segue:

- Se sono soddisfatti i necessari criteri di verifica della calibrazione del dosaggio per PC1, passare alla verifica della media PC1/NC1.
- In caso contrario, proseguire con questa procedura.

2. Scartare il replicato di PC1 con il valore RLU che più si allontana dalla media precedentemente calcolata come valore estremo.

3. Calcolare la media e il CV con i 2 replicati rimanenti di PC1.

Se il CV soddisfa i necessari criteri di verifica della calibrazione del dosaggio di PC1, procedere alla verifica della media di PC1/NC1.

Se non sono soddisfatti i necessari criteri di verifica della calibrazione del dosaggio di PC1, la calibrazione non è valida e occorre ripetere il test per tutti i campioni. Pertanto, i risultati ottenuti con il test *digene* HPV

Genotyping PS non devono essere messi a referto.

Media controllo positivo 1 / media controllo negativo 1

Utilizzando la media di PC1 e la media di NC1 calcolate in precedenza, calcolare il rapporto PC1/NC1.

Un rapporto PC1/NC1 valido è $\geq 2,0$ e $\leq 15,0$. Procedere come segue:

- Se sono soddisfatti i necessari criteri di verifica della calibrazione del dosaggio per il rapporto PC1/NC1, passare alla verifica dei controlli di qualità specifici per ogni sonda.
- In caso contrario, la calibrazione non è valida e occorre ripetere il test per tutti i campioni. Pertanto, i risultati ottenuti con il test *digene* HPV Genotyping PS non devono essere messi a referto.

Controlli di qualità specifici per ogni sonda

I campioni per il controllo di qualità sono forniti con il test *digene* HPV Genotyping PS e devono essere utilizzati per il controllo interno di qualità per ogni test eseguito. I controlli di qualità forniti sono DNA bersaglio clonati dell'HPV e non derivano dall'HPV wild-type. È lo stesso tipo di materie utilizzato per il controllo negativo 1 e il controllo positivo 1. È possibile analizzare altri controlli di qualità nel rispetto delle linee guida o dei requisiti normativi locali o nazionali o di enti di certificazione. I controlli di qualità forniti non funzionano correttamente per l'elaborazione della soluzione PreservCyt.

Perché un dosaggio possa essere considerato valido, il valore RLU/CO di ogni controllo di qualità deve rientrare nei criteri definiti, secondo quanto specificato nella Tabella 4 seguente.

Se i controlli di qualità non rientrano in questi intervalli, il test non è valido e deve essere ripetuto per tutti i campioni. Pertanto, i risultati ottenuti con il test *digene* HPV Genotyping PS non devono essere messi a referto.

Tabella 4. Criteri di validità del dosaggio dei controlli di qualità

Controllo di qualità	Minimo (RLU/CO)	Massimo (RLU/CO)
NC2	0,001	0,999
PC2	2,0	10,0

Limiti della metodica

- Il rilevamento dell'HPV utilizzando il test *digene* HPV Genotyping PS non esclude la possibilità di infezione con più di un tipo di HPV.
- Il dosaggio rileva soltanto i tipi di HPV ad alto rischio 16, 18 e 45. Nei campioni possono essere presenti altri tipi di HPV ad alto e a basso rischio.

- In caso di campioni contenenti più di 1,25% (v/v) di sangue, si possono ottenere falsi negativi.
- L'infezione da HPV non è un indice certo della presenza di neoplasia cervicale grave, né implica in tutti i casi lo sviluppo di una neoplasia cervicale grave o cancro.

Caratteristiche delle prestazioni

Concordanza tra il test *digene* HPV Genotyping PS e un test convalidato di genotipizzazione dell'HPV con reazione a catena della polimerasi quantitativa (qPCR)

Presso QIAGEN è stata condotta una valutazione delle prestazioni per determinare la concordanza dei risultati del test per l'identificazione dei tipi di HPV 16, 18 e 45 utilizzando il test *digene* HPV Genotyping PS a confronto con un test convalidato qPCR.

Sono stati analizzati in totale 287 campioni cervicali in PreservCyt e 290 in STM archiviati, ottenuti da una popolazione sottoposta a screening periodico. Prima dell'inclusione nello studio è stato determinato il risultato del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA per ogni campione. I risultati del test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA sono stati i seguenti:

- 238 campioni in STM positivi
- 52 campioni in STM negativi
- 237 campioni in PreservCyt positivi
- 50 campioni in PreservCyt negativi

Per ogni tipo di HPV (16, 18 e 45), ciascun campione è stato analizzato in tre replicati sia con il test *digene* HPV Genotyping PS, sia con il metodo d'analisi qPCR, per il rilevamento dei rispettivi tipi di HPV per un totale di 1731 risultati del test per ciascun metodo. In seguito a risoluzione discrepante, sono rimasti 11 risultati discrepanti (vedere la Tabella 5 seguente).

La concordanza tra il test *digene* HPV Genotyping PS e il test qPCR è stata del 99,4% (1720/1731) con un intervallo di confidenza (CI) al 95% pari al 98,9–99,6%.

Tabella 5. Concordezza tra i risultati del test *digene* HPV Genotyping PS e del test qPCR

		Risultato del test <i>digene</i> HPV Genotyping PS	
		+	-
Risultato del test qPCR	+	110	4
	-	7	1610

Concordezza nel rilevamento di genotipi specifici dell'HPV

La concordezza tra i risultati del test *digene* HPV Genotyping PS e del test qPCR è stata determinata in base al genotipo dell'HPV (vedere la Tabella 6 seguente).

Tabella 6. Concordezza tra i risultati del test *digene* HPV Genotyping PS e del test qPCR per il genotipo dell'HPV

Genotipo	Concordezza (%) (n/N) CI 95%
HPV 16	99,1 (572/577) 98,0-99,6
HPV 18	99,7 (575/577) 98,7-99,9
HPV 45	99,3 (573/577) 98,2-99,7

Concordanza tra i risultati del test in base al tipo di campione

La concordanza tra i risultati del test *digene* HPV Genotyping PS e del test qPCR è stata determinata in base al tipo di campione (vedere la Tabella 7 seguente).

Tabella 7. Concordanza tra i risultati del test *digene* HPV Genotyping PS e del test qPCR per tipo di campione

Tipo di campione	Concordanza (%) (n/N) CI 95%
Campioni in STM	99,8 (868/870) 99,2–99,9
Campioni in PreservCyt	99,0 (852/861) 98,0–99,4%

Specificità analitica

È stato sottoposto a test un pannello non clinico di DNA plasmidico dell'HPV clonato a una concentrazione di 1E+7 copie per dosaggio con ognuna delle 3 miscele per sonda dell'HPV (16, 18 e 45) utilizzate nel test *digene* HPV Genotyping PS. I test hanno determinato l'assenza di reattività crociata tra le 3 miscele di sonde dell'HPV e il seguente DNA plasmidico dell'HPV:

- Tipi di HPV ad alto rischio 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 e 82
- Tipi di HPV a basso rischio 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 11, 13, 30, 34, 34, 40, 42, 43, 44, 67, 69, 70 e 71

Riproducibilità

È stata determinata la riproducibilità globale del *digene* HPV Genotyping PS. I test sono stati eseguiti presso gli stabilimenti di QIAGEN utilizzando 3 diversi

lotti dei kit e 3 diversi operatori, che hanno condotto i test in 3 diversi laboratori. Ogni operatore ha analizzato gli stessi elementi del pannello in tre replicati per un minimo di 5 giorni.

Riproducibilità dei campioni in STM

Il pannello per la riproducibilità dei campioni in STM ha previsto soluzioni plasmidiche per ciascun tipo di HPV analizzato (HPV 16, 18 e 45) alle seguenti concentrazioni:

- 0 pg/ml (negativo)
- 0,5 pg/ml (negativo alto)
- 1,5 pg/ml (positivo basso)
- 10 pg/ml (positivo alto)

I risultati del test osservati concordano al 100% con i risultati previsti. In base ai risultati delle analisi di riproducibilità di STM, il test *digene* HPV Genotyping PS è altamente riproducibile con campioni in STM.

Riproducibilità dei campioni in PreservCyt

Il pannello per la riproducibilità dei campioni in PreservCyt ha previsto cellule SiHa positive all'HPV 16 alle seguenti concentrazioni:

- 0 cellule/dosaggio (negativo)
- 250–750 cellule/dosaggio (negativo alto)
- 1000–5000 cellule/dosaggio (positivo basso)
- >5000 cellule/dosaggio (positivo alto)

I risultati del test osservati concordano al 95,3% (103/108) con i risultati previsti. In base ai risultati delle analisi di riproducibilità di campioni in PreservCyt, il test *digene* HPV Genotyping PS è altamente riproducibile con campioni in PreservCyt.

Recupero del DNA per campioni in STM e in PreservCyt

È stato esaminato il recupero del DNA dell'HPV 16 per campioni in STM e in PreservCyt. Sono state aggiunte cellule SiHa a STM e soluzione di PreservCyt alle seguenti concentrazioni:

- 500 cellule/dosaggio (negativo alto)
- 2000 cellule/dosaggio (positivo basso)
- 5000 cellule/dosaggio (positivo alto)

Ogni tipo di campione è stato elaborato secondo le rispettive procedure di preparazione e denaturazione, come descritto nelle istruzioni per l'uso applicabili, e analizzato con il test *digene* HPV Genotyping PS utilizzando la miscela di sonde per l'HPV 16.

I risultati hanno evidenziato che il recupero del DNA dell'HPV 16 da cellule di carcinoma umano è equivalente per i 2 mesi e che la preparazione dei campioni in PreservCyt non influisce sulla sensibilità analitica del test *digene* HPV Genotyping PS.

Reattività crociata

Pannello di reattività crociata

È stato analizzato un pannello di organismi normalmente presenti nel tratto anogenitale femminile, al fine di determinare se si sarebbe verificata una reattività crociata con il test *digene* HPV Genotyping PS. Tutti i microrganismi sono stati analizzati a concentrazioni comprese tra 10^5 e 10^7 organismi per ml.

Sono stati analizzati i seguenti organismi, che non hanno presentato nessuna reattività crociata con il test *digene* HPV Genotyping PS:

- *Acinetobacter anitratus* (ATCC 49139)
- *Acinetobacter lwoffii* (ATCC 17925)
- *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285)
- *Bacteroides melaninogenicus* (ATCC 25845)
- *Candida albicans* (ATCC 10231)
- *Chlamydia trachomatis* (ATCC VR-878)

- *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047)
- *Escherichia coli* HB101 (ATCC 33694)
- *Escherichia coli* (ATCC 25922)
- *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586)
- *Gardnerella vaginalis* (ATCC 49145)
- *Haemophilus ducreyi* (ATCC 700724)
- *Klebsiella pneumonia* (ATCC 13883)
- *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356)
- *Mobiluncus curtisii* (ATCC 35241)
- *Mobiluncus mulieris* (ATCC 35243)

Reattività crociata determinata per analisi delle sequenze

Per verificare che nessuna sequenza di sovrapposizione avrebbe presentato una reattività crociata con gli oligonucleotidi utilizzati nelle miscele per sonda del test *digene* HPV Genotyping PS, è stata condotta un'analisi delle sequenze (blast) per i seguenti virus:

- Adenovirus 2
- Citomegalovirus
- Virus di Epstein-Barr
- Antigene di superficie del virus dell'epatite B
- Herpes simplex 1
- Herpes simplex 2
- Virus dell'immunodeficienza umana (HIV, DNA RT)
- pBR322
- Simian virus 40 (SV40)

I risultati dell'analisi delle sequenze hanno evidenziato una bassa probabilità che le miscele di sonde del test *digene* HPV Genotyping PS possano presentare ibridizzazione crociata con i virus elencati e dare luogo a falsi positivi.

Effetto del sangue e di altre sostanze sui campioni in STM

È stato valutato l'effetto del sangue e di altre sostanze potenzialmente interferenti sul test *digene* HPV Genotyping PS. Sangue intero, gel contraccettivi, spermicidi, lubrificanti, anestetici per emorroidi, oli per il corpo, pomate antifungine e lavande vaginali (agenti che sovente vengono riscontrati nei campioni cervicali) sono stati aggiunti a campioni in STM a concentrazioni riscontrabili nei campioni cervicali.

Non sono stati osservati falsi positivi con nessuno degli agenti a qualsiasi concentrazione. È tuttavia possibile ottenere un falso negativo se si esegue l'analisi su campioni contenenti sangue alla minima concentrazione target immessa di 2 pg/ml. Con la concentrazione target di 2 pg/ml, è stata osservata un'interferenza del rilevamento a concentrazioni di sangue uguali o superiori a 17,5 µl/ml (1,75% v/v). Nessuna interferenza è stata osservata con concentrazioni di sangue pari a 12,5 µl/ml (1,25% v/v). Non sono stati osservati falsi negativi con nessuno degli altri agenti analizzati.

Effetto del sangue e di altre sostanze sui campioni in soluzione PreservCyt

È stato valutato l'effetto del sangue e di altre sostanze potenzialmente interferenti sul test *digene* HPV Genotyping PS. Sangue intero, gel contraccettivi, spermicidi, lubrificanti, anestetici per emorroidi, oli per il corpo, pomate antifungine e lavande vaginali (agenti che sovente vengono riscontrati nei campioni cervicali) sono stati aggiunti a campioni in soluzione PreservCyt a concentrazioni riscontrabili nei campioni cervicali. Non sono stati osservati falsi positivi o negativi con nessuno degli agenti a qualsiasi concentrazione analizzata.

Riferimenti bibliografici

QIAGEN possiede un'ampia banca dati online continuamente aggiornata con le pubblicazioni scientifiche riguardanti i prodotti QIAGEN. Le opzioni di ricerca specifiche consentono di trovare gli articoli necessari sia tramite parole chiave sia specificando l'applicazione, l'area di ricerca, il titolo ecc.

Per un elenco bibliografico completo, visitare il sito QIAGEN Reference Database all'indirizzo www.qiagen.com/RefDB/search.asp oppure contattare il centro di assistenza tecnica QIAGEN o il distributore locale.

Riferimenti citati









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(2), 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. Kjaer, S.K., Frederiksen, K., Munk, C., and Iftner, T. (2010) Long-term absolute risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse following human papillomavirus infection: role of persistence. *J. Natl. Cancer Inst.* 102, 1478.
10. de Sanjose, S. et al. (2010) Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol.* 11, 1048.
11. Wright J.D. et al. (2005) Human papillomavirus type and tobacco use as predictors of survival in early stage cervical carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 98(1), 84.
12. Centers for Disease Control (1987) Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 36(Suppl 2), 3S.
13. Schulster, 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(5), 762
14. 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(2), 400.

Simboli

Nelle presenti istruzioni per l'uso sono utilizzati i seguenti simboli:

Simbolo	Definizione
	Contenuto sufficiente per < n > test
	Dispositivo medico per diagnostica in vitro
	Numero di catalogo
	Global Trade Item Number
	Produttore
	Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea
	Data di scadenza
	Fare riferimento alle informazioni riportate nel manuale

Informazioni sui contatti

Per ricevere assistenza tecnica e ulteriori informazioni, potete consultare il nostro sito www.qiagen.com/Support o contattare il servizio assistenza tecnica QIAGEN o il distributore locale (consultate il retro della copertina o il sito www.qiagen.com).

Appendice A: Procedure di valutazione della contaminazione

Nel caso in cui il test non produca i risultati previsti, la causa potrebbe essere la contaminazione. Per verificare la presenza di una possibile contaminazione, eseguire il seguente processo di valutazione per ciascun reagente.

Reagente di rilevamento 2

Note:

- Per evitare di contaminare il reagente di rilevamento 2, indossare guanti monouso non talcati ed evitare che i puntali delle pipette tocchino qualsiasi superficie di lavoro.
- Quando si lavora con il reagente di rilevamento 2, evitare la luce solare diretta.

1. Procurarsi una striscia di pozzetti puliti per micropiastra di cattura e collocarla su un supporto.
2. Pipettare 75 µl della fiala dosata, residua o originale, del reagente di rilevamento 2 in un pozzetto.

Nota: Analizzare il reagente di rilevamento 2 in replicati di 3 per ottenere la valutazione ottimale delle prestazioni.

3. Incubare a 20–25°C per 15 minuti. Evitare la luce del sole diretta.
4. Misurare la micropiastra di cattura utilizzando uno strumento DML.
Il controllo del reagente di rilevamento 2 deve essere <50 RLU.

Se i valori del reagente di rilevamento 2 sono <50 RLU, il reagente può essere utilizzato per ripetere il test.

Se il reagente di rilevamento 2 è contaminato(>50 RLU), richiedere un nuovo kit e ripetere il test.

Sistema di lavaggio e/o sorgente d'acqua

1. Procurarsi una striscia di pozzetti puliti per micropiastra di cattura e collocarla su un supporto.
2. Etichettare i pozzetti 1–4. Pipettare 75 µl del reagente di rilevamento 2 in 4 pozzetti per micropiastra di cattura separati.
Il pozzetto 1 serve per il controllo del reagente di rilevamento 2.
3. Pipettare 10 µl di tampone di lavaggio dal flacone di lavaggio nel pozzetto 2.
4. Lasciare scorrere il tampone di lavaggio attraverso la tubazione del lavatore. Pipettare 10 µl di tampone di lavaggio dalla tubazione nel pozzetto 3.
5. Procurarsi un dosaggio dell'acqua utilizzata per preparare il tampone di lavaggio. Pipettare 10 µl di acqua nel pozzetto 4.
6. Incubare a 20–25°C per 15 minuti. Evitare la luce del sole diretta.
7. Misurare la micropiastra di cattura utilizzando uno strumento DML.

Il controllo del reagente di rilevamento 2 (pozzetto 1) deve essere <50 RLU.

Confrontare il valore RLU derivato dai pozzetti 2, 3 e 4 con il valore RLU del controllo del reagente di rilevamento 2. I singoli valori RLU dei pozzetti 2, 3 e 4 non devono superare di 50 RLU il valore RLU del controllo del reagente di rilevamento 2.

I valori che superano di 50 RLU il controllo del reagente di rilevamento 2 indicano contaminazione. Vedere “Tampone di lavaggio”, pagina 26, per le istruzioni relative alla pulizia e alla manutenzione del sistema di lavaggio.

Lavatore automatico per micropiastre

1. Procurarsi una striscia di pozzetti puliti per micropiastra di cattura e collocarla su un supporto.
2. Etichettare i pozzetti 1–5. Pipettare 75 µl del reagente di rilevamento 2 in 5 pozzetti per micropiastra di cattura.
Il pozzetto 1 serve per il controllo del reagente di rilevamento 2.
3. Pipettare 10 µl di tampone di lavaggio dal flacone di lavaggio del lavatore automatico per micropiastre nel pozzetto 2.

4. Pipettare 10 µl di liquido di risciacquo dal flacone di lavaggio del lavatore automatico per micropiastre nel pozzetto 3.
5. Premere il tasto "Prime" (Riempi) sulla tastiera del lavatore per micropiastre, lasciando scorrere il tampone di lavaggio attraverso i tubi. Pipettare 10 µl di tampone di lavaggio dal canale nel pozzetto 4.
6. Premere il tasto "Rinse" (Risciacqua) sulla tastiera del lavatore per micropiastre, lasciando scorrere il liquido di risciacquo attraverso i tubi. Pipettare 10 µl di tampone di lavaggio dal canale nel pozzetto 5.
7. Coprire e incubare a 20–25°C per 15 minuti. Evitare la luce del sole diretta.
8. Misurare la micropiastro di cattura utilizzando uno strumento DML.

Il controllo del reagente di rilevamento 2 (pozzetto 1) deve essere <50 RLU.

Confrontare il valore RLU derivato dai pozzetti 2, 3, 4 e 5 con il valore RLU del controllo del reagente di rilevamento 2. I singoli valori RLU dei pozzetti 2, 3, 4 e 5 non devono superare di 50 RLU il valore RLU del controllo del reagente di rilevamento 2.

I valori che superano di 50 RLU il controllo del reagente di rilevamento 2 indicano la contaminazione del lavatore per micropiastre.

Per la procedura di decontaminazione, consultare il *Manuale dell'operatore Automated Plate Washer*.

Appendice B: Foglio di lavoro di registrazione dei dati del test

Sede del test:		Data del test:						ID operatore:					
Temperatura ambiente: °C		Numero di lotto del test <i>digene</i> HPV Genotyping PS:											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	NC1	NC2 (45)											
B	NC1	PC2 (16)											
C	NC1	PC2 (18)											
D	PC1	PC2 (45)											
E	PC1												
F	PC1												
G	NC2 (16)												
H	NC2 (18)												

Informazioni per gli ordini

Prodotto	Contenuto	N. cat.
<i>digene</i> HPV Genotyping PS Test	Per 96 reazioni: reagenti, tamponi, 4 controlli e micropiastra di cattura	613615
Sistema modulare Hybrid Capture 2		
DML 2000	Luminometro per micropiastre, 240 V	5000-1020
DML 3000	Luminometro per micropiastre, 120V/240 V	5000-00031
LumiCheck Plate User Package	Piastra e software per l'uso con DML 2000 o DML 3000	6000-5023
Rotary Shaker I	Agitatore rotante, 240 V	6000-2240E
Automated Plate Washer	Lavatore per piastre a 96 pozzetti, 240 V	6000-00175
MST Vortexer 2	Vortexer per provette multicampione, 240 V	6000-5022
Accessori		
Hybridization Microplates	Micropiastre trasparenti a 96 pozzetti in polisterene (100)	6000-1203
Microplate Lids	Coperchi per micropiastre trasparenti in polisterene (100)	6000-5001
Extra-long Pipet Tips	Puntali per pipette, 6 scatole/confezione	5075-1011

Disposable Reagent Reservoirs	Unità per stoccaggio reagenti in plastica, capacità 25 ml (100)	5090-1010
DuraSeal tube sealer film	Pellicola sigillante	6000-5003
Plate sealers	Copripiastra adesive (100)	5070-1010
Preparazione del campione		
<i>digene</i> HC2 Sample Conversion Kit	Per la conversione di max. 250 campioni in soluzione PreservCyt: tampone di conversione campioni, mezzo di trasporto campioni, reagente di denaturazione e colorante indicatore	5127-1220

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i disclaimer specifici dei prodotti consultare le istruzioni per l'uso o il manuale utente specifici del kit QIAGEN. Le istruzioni per l'uso e i manuali utente dei kit QIAGEN sono disponibili all'indirizzo www.qiagen.com oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza tecnica QIAGEN o al proprio distributore locale.

Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente

Questa pagina è stata lasciata in bianco intenzionalmente

Marchi commerciali: QIAGEN®, *digene*®, Hybrid Capture®, (QIAGEN); DuraSeal™ (Diversified Biotech); Eppendorf®, Repeater® (Eppendorf AG); KimTowels® (Kimberly-Clark Corporation); Parafilm® (BEMIS Company, Inc.); ThinPrep®, PreservCyt® (Hologic, Inc.).

Contratto di Licenza Limitato

L'uso di questo prodotto implica l'accettazione da parte dell'acquirente o dell'utente del test *digene* HPV Genotyping PS alle seguenti condizioni:

1. Il test *digene* HPV Genotyping PS può essere utilizzato esclusivamente secondo le istruzioni per l'uso, componenti inclusi, contenute nel test *digene* HPV Genotyping PS. QIAGEN non concede alcuna licenza, in relazione a qualunque proprietà intellettuale, di utilizzare o aggiungere componenti inclusi nel presente test *digene* HPV Genotyping PS ad altri componenti non contenuti in questo test *digene* HPV Genotyping PS, ad eccezione di quanto descritto nelle istruzioni per l'uso del test *digene* HPV Genotyping PS e nei protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com.
2. Se non espressamente dichiarato nelle licenze, QIAGEN non garantisce in alcun modo che questo test *digene* HPV Genotyping PS e/o il relativo impiego non violino i diritti di terze parti.
3. Il test *digene* HPV Genotyping PS ed i relativi componenti sono concessi in licenza per l'impiego monouso e non possono essere riutilizzati, ripristinati o rivenduti.
4. QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del test *digene* HPV Genotyping PS concordano nel non compiere e nel non consentire ad altri di compiere o contribuire a compiere azioni illecite. QIAGEN può imporre presso qualunque tribunale i divieti previsti dal presente Contratto di Licenza Limitato, e recupererà tutte le spese di indagine e spese legali, comprese le parcelle degli avvocati, in qualunque azione per imporre il presente Contratto di Licenza Limitato o qualsiasi diritto di proprietà intellettuale correlato al test *digene* HPV Genotyping PS e/o ai suoi componenti.

Per le condizioni di licenza aggiornate, consultare il sito www.qiagen.com.

© 2012 – 2018 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com