

Bruksanvisning för *digene*[®] HC2 HPV DNA-test

IVD

 96

En in vitro-nukleinsyrahybridiseringsanalys med signalförstärkning och kemiluminescens på mikrotiterplatta för kvalitativ detektion av 18 lågrisk- och högrisktyper av humant papillomvirus (HPV)-DNA i cervixprover

För användning med:

digene HC2 DNA Collection Device (provtagningsanordning)

digene Specimen Transport Medium (provtransportmedium)

Hologic PreservCyt[®]-lösning

BD SurePath[®]-konserveringsvätska



REF

5196-1330



QIAGEN

19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874
USA

EC REP

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
TYSKLAND

L2126sv Rev. 4



INNEHÅLLSFÖRTECKNING

NAMN OCH ANVÄNDNINGSSOMRÅDE	1
SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING	2
PRINCIP FÖR PROCEDUREN	3
MEDFÖLJANDE REAGENS OCH MATERIAL	4
NÖDVÄNDIGA TILLBEHÖR SOM EJ MEDFÖLJER	5
VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHET	6
SÄKERHETSFÖRESKRIFTER.....	6
SKYDDS- OCH RISKFRASER FÖR KOMPONENTER.....	6
ANVÄNDNINGSFÖRESKRIFTER.....	8
REAGENSPREPARATION OCH FÖRVARING	9
PROVTAGNING OCH PROVHANTERING	12
CERVIXPROVER I STM.....	12
CERVIXBIOPSIER.....	12
CERVIXPROVER I PRESERVCYT-LÖSNING.....	12
CERVIXPROVER I SUREPATH-KONSERVERINGSVÄTSKA.....	13
TESTFÖRFARANDE	14
TESTNING AV STORA PROVVOLYMER MED RAPID CAPTURE SYSTEM.....	14
MANUELL METOD.....	14
DENATURERING:.....	15
VORTEXBLANDNING OCH DENATURERING.....	18
HYBRIDISERING: KOMBINERAD PROBBLANDNING (CPC) OCH DUBBELPROBSMETODEN.....	21
HYBRIDINFÅNGNING.....	23
HYBRIDDETEKTION.....	24
TVÄTTNING.....	24
SIGNALFÖRSTÄRKNING.....	25
KRITERIER FÖR ANALYSKALIBRERINGSVERIFIERING	27
CUTOFF-BERÄKNING	30
KVALITETSKONTROLL	31
TOLKNING AV PROVRESULTAT	32
PRESTANDAEGENSKAPER	33
DATA SOM STÖDER INDIKATIONEN LÅGRISK OCH HÖGRISK HPV.....	33
DATA SOM STÖDER INDIKATIONEN PRIMÄR SCREENING FÖR HÖGRISK-HPV.....	37
ANALYTISK KÄNSLIGHET.....	39
PRESTANDA FÖR KOMBINERAD PROBBLANDNING (CPC).....	40
EKVIVALENS MELLAN STM- OCH PRESERVCYT-LÖSNINGSPROVER.....	40
KORRELATION MELLAN RESULTAT AV SUREPATH-PROVER OCH STM-PROVER I EN KLINISK POPULATION.....	40
REPRODUCERBARHET.....	41
HÖGRISK-HPV-PROB.....	42
KORSREAKTIVITET	43
KORSREAKTIVITETSPANEL.....	43
KORSHYBRIDISERING.....	44
EFFEKT AV BLOD OCH ANDRA SUBSTANSER PÅ STM-PROVER.....	44
EFFEKT AV BLOD OCH ANDRA SUBSTANSER PÅ PRESERVCYT-LÖSNINGSPROVER.....	44
REPRODUCERBARHETEN FÖR <i>DIGENE</i> HC2 HPV DNA-TESTET MED KLINISKA PROVER INSAMLADE I STM.....	44
RLU/CO.....	45
REPRODUCERBARHETEN FÖR <i>DIGENE</i> HC2 HPV DNA-TEST MED KLINISKA PROVER INSAMLADE MED PRESERVCYT-LÖSNING.....	45
RLU/CO.....	46
REPRODUCERBARHETEN FÖR <i>DIGENE</i> HC2 HIGH-RISK HPV DNA-TEST MED PROVER INSAMLADE MED SUREPATH-KONSERVERINGSVÄTSKA.....	46
REPRODUCERBARHET FÖR SUREPATH-RESULTAT NÄR RAPID CAPTURE SYSTEM ANVÄNDS FÖR ANALYSBEARBETNING.....	47

PROCEDURENS BEGRÄNSNINGAR	48
LITTERATURHÄNVISNINGAR.....	49
FELSÖKNINGSHANDBOK.....	52
KONTAMINATIONSKONTROLL	56
KONTAKTINFORMATION	58

NAMN OCH ANVÄNDNINGSSOMRÅDE

För in vitro-diagnostisk användning.

digene HC2 HPV DNA-testet som baseras på Hybrid Capture[®] 2 (HC2)-teknik är en nukleinsyrahybridiseringsanalys med signalförstärkning som använder kemiluminescens på mikrotiterplatta för kvalitativ detektion av 18 lågrisk- och högrisktyper av HPV-DNA i cervixprover.

Cervixprover som kan testas med *digene* HC2 HPV DNA-testet inkluderar följande:

- Prover som tagits med *digene* HC2 DNA Collection Device
- Prover som tagits med en provtagningsanordning av borsttyp eller kombinerad borste/spatel och sedan placerats i PreservCyt-lösning (se bruksanvisningen till *digene* HC2 Sample Conversion-kitet för fullständig information)
- Prover som samlats in i SurePath-konserveringsvätska (ENDAST för High-Risk HPV DNA-test)
- Biopsier som samlats in i *digene* Specimen Transport Medium (STM, provtransportmedium)

När lågrisk- och högrisk-HPV-proberna används är användningen av detta test indicerat:

- För att underlätta diagnostiseringen av sexuellt överförbara HPV-infektioner med HPV-typ 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 och 68.
- För att skilja mellan två HPV-DNA-grupper: lågrisk-HPV-typ 6, 11, 42, 43 och 44 och högrisk-HPV-typ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 och 68. De specifika HPV-typerna som är närvarande kan däremot inte fastställas.

Indikationen för högrisk-HPV-proben är:

- för detektionen av högrisk-HPV-typerna 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 och 68 vilka har visats vara den primära orsaksfaktorn för utveckling av cervixcancer.
- som ett inledande allmänt screeningtest av befolkningen, för användning med eller utan pap smear, för att identifiera kvinnor med ökad risk för att utveckla cervixcancer eller befintlig höggradig cervixsjukdom. HPV-diagnos är i allt högre grad indikativ för cervixsjukdom med stigande ålder.
- som ett uppföljningstest för patienter med avvikande resultat på pap smear eller cervixsjukdom för att fastställa behovet av remiss till kolposkopi eller andra uppföljningsåtgärder.
- som ett uppföljningstest för patienter med pap smear-resultat som visar på LSIL (låggradig skvamös intraepitellesion) eller HSIL (höggradig skvamös intraepitellesion) före kolposkopi. För dessa patienter är ett *digene* HC2 HPV DNA-testresultat till hjälp för läkaren i patientvården genom att underlätta riskbedömningen av kvinnor för att utesluta höggradig sjukdom.

digene HC2 HPV DNA-testet ska användas tillsammans med klinisk information som härrör från andra diagnostiska test och screeningtest, kroppsundersökningar och fullständig anamnes i enlighet med lämpliga tillvägagångssätt i patientvården. Resultat från *digene* HC2 HPV DNA-testet **får inte** utgöra det enda grundvalet vid klinisk bedömning och behandling av patienter.

SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

Förekomsten av vissa HPV-typer i kvinnans slida är associerad med ett flertal sjukdomar, inklusive kondylom, Bowenoid papulos samt cervikal, vaginal och vulvår intraepitelial neoplasi och karcinom.¹⁻³ Det är allmänt vedertaget att dessa virus företrädesvis överförs sexuellt och att högrisktyperna av HPV är den största identifierade riskfaktorn för utveckling av cervixcancer.⁴⁻⁸

Humana papillomvirus består av en ikosahedral viruspartikel (virion) som innehåller en dubbelsträngad, cirkulär DNA-molekyl med 8 000 baspar, omgiven av ett kapsidprotein. När epitelceller infekterats etableras virus-DNA i hela epitelet, men intakta virioner återfinns endast i de övre vävnadsskikten. Därför kan virus-DNA hittas antingen i virioner eller som episomala eller integrerade HPV-sekvenser, beroende på lesionstyp och -grad.

Hittills har det inte gått att odla HPV in vitro, och immunologiska tester är otillräckliga när det gäller att fastställa förekomsten av HPV-infektion i cervix. Indirekt evidens för anogenital HPV-infektion kan erhållas via kroppsundersökning och genom förekomsten av karakteristiska cellförändringar som associeras med virusreplikation i pap smear eller biopsiprover. Alternativt kan biopsier analyseras med nukleinsyrahybridisering för att direkt detektera förekomsten av HPV-DNA.

Historiskt sett har HPV-typ 16 och 18 betraktats som HPV-typer förenade med hög risk för cancer och HPV-typ 6 och 11 som HPV-typer förenade med låg risk för cancer.⁸⁻¹⁰ HPV-typ 31, 33 och 35 har visats ha en intermediär association med cancer.^{2,11-14} Trots denna användbara begreppsmässiga ram, står dessa 7 HPV-typer endast för cirka 70 % av cervikala neoplasmer.⁹⁻¹¹ Ytterligare HPV-typer, däribland 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 och 68, har identifierats som de huvudsakliga HPV-typerna som kan detekteras i de återstående lesionerna.^{15-20,32-36} Dessa HPV-typer kan också kategoriseras i lågrisk-, intermediära och högriskgrupper baserat på deras relativa fördelning i olika histopatologiska diagnoskategorier.^{21, 32-37}

HPV-DNA har visats förekomma hos cirka 10 % av alla kvinnor med normalt cervixepitel men den faktiska prevalensen i specifika grupper av kvinnor påverkas starkt av ålder och andra demografiska variabler.^{2,10,21,31} Prospektiva studier har visat att 15-28 % av kvinnor som testats positiva för HPV-DNA utvecklade skvamös intraepitelial neoplasi (SIL) inom 2 år jämfört med endast 1-3 % av kvinnor som testats negativa för HPV-DNA.^{22,23} I synnerhet var risken större för progression för HPV-typ 16 och 18 (cirka 40 %) än för andra HPV-typer.²²

PRINCIP FÖR PROCEDUREN

digene HC2 HPV DNA-testet, med användning av HC2-teknik, är en hybridiseringsanalys med antikroppsinfångning och signalförstärkning som använder kemiluminescens på mikrotiterplatta för detektion. Prover som innehåller mål-DNA hybridiserar med en specifik HPV RNA-prob. De resulterande RNA:DNA-hybriderna binder till en brunn täckt med antikroppar specifika för RNA:DNA-hybrider. De immobiliserade hybriderna får därefter reagera med alkaliskt fosfataskonjugerade antikroppar specifika för RNA:DNA-hybriderna och detekteras med ett kemiluminescenssubstrat. Flera molekyler av alkaliskt fosfataskonjugeras till varje antikropp. Åtskilliga konjugerade antikroppar binds till varje infångad hybrid vilket leder till avsevärd signalförstärkning. När substratet klyvs av det bundna alkaliska fosfataset emitteras ljus som mäts såsom relativa ljusenheter (RLU) med en luminometer. Ljusets emitterade intensitet anger frånvaro eller närvaro av mål-DNA i provet.

RLU-mått lika med eller större än cutoff-värdet visar närvaro av HPV DNA i provet. Ett RLU-mått under cutoff-värdet visar frånvaro av de specifika HPV DNA-sekvenser som testas eller indikerar HPV DNA-nivåer under analysens detektionsgräns.

Det går att testa stora provvolymmer med *digene* HC2 HPV DNA-testet med användning av Rapid Capture[®] System (RCS). Instrumentet kan behandla upp till 352 prover på åtta timmar. För att möjliggöra högkapacitetstestning utförs analysens samtliga steg med RCS med undantag av denaturering av prover, kemiluminescent signaldetektion och resultatrapportering.

MEDFÖLJANDE REAGENS OCH MATERIAL

Det finns 96 tester i ett digene HC2 HPV DNA Test-kit (kat.nr 5196-1330). Antalet patientresultat varierar beroende på hur många gånger satsen används:

1 användning = 40 patientresultat (lågriksk och högrisksk)

2 användningar = 32 patientresultat (lågriksk och högrisksk)

- 1 x 0,35 ml **Indikatorfärg**
Innehåller 0,05 % vikt/vol natriumazid.
- 1 x 50 ml **Denatureringsreagens**
Spädd natriumhydroxidlösning (NaOH).
- 1 x 5 ml **Probspädningsvätska**
Buffertlösning med 0,05 % vikt/vol natriumazid.
- 1 x 150 µl **Lågriksk-HPV-prob**
HPV 6/11/42/43/44 RNA-prob i buffertlösning (grön kapsyl).
- 1 x 100 µl **Högrisksk-HPV-prob**
HPV 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68 RNA-prob i buffertlösning (röd kapsyl).
- 1 x 1 ml **Lågriksk-HPV-kvalitetskontroll**
5 pg/ml (500 000 kopior/ml) klonat HPV 6 DNA och bärar-DNA i transportmedium för prover med 0,05 % vikt/vol natriumazid.
- 1 x 1 ml **Högrisksk-HPV-kvalitetskontroll**
5 pg/ml (500 000 kopior/ml) klonat HPV 16-DNA och bärar-DNA i transportmedium med 0,05 % vikt/vol natriumazid.
- 1 x 2,0 ml **Negativ kalibrator**
Bärar-DNA i transportmedium för prover med 0,05 % vikt/vol natriumazid.
- 1 x 1,0 ml **Lågriksk-HPV-kalibrator**
1 pg/ml klonat HPV 11 DNA och bärar-DNA i transportmedium för prover med 0,05 % vikt/vol natriumazid.
- 1 x 1,0 ml **Högrisksk-HPV-kalibrator**
1 pg/ml klonat HPV 16 DNA och bärar-DNA i transportmedium för prover med 0,05 % vikt/vol natriumazid.
- 1 x 1 **Infångningsmikrotiterplatta**
Belagd med anti-RNA:DNA-hybridantikroppar.
- 1 x 12 ml **Detektionsreagens 1**
Alkaliskt fosfataskonjugerade antikroppar för RNA:DNA-hybrider i buffertlösning med 0,05 % vikt/vol natriumazid.
- 1 x 12 ml **Detektionsreagens 2**
CDP-Star[®] med Emerald II (kemiluminiscenssubstrat)
- 1 x 100 ml **Tvättbuffertkoncentrat**
Innehåller 1,5 % vikt/vol natriumazid.

NÖDVÄNDIGA TILLBEHÖR SOM EJ MEDFÖLJER

Hybrid Capture System *In vitro*-diagnostisk utrustning och tillbehör^A

digene Hybrid Capture 2 System ("digene HC2 System"), bestående av en QIAGEN-godkänd luminometer ("DML-instrument"), en QIAGEN-godkänd persondator med tillbehör (bildskärm, tangentbord, mus, skrivare och skrivarkabel), programvara till *digene* HC2 System ("digene analysprogramvara"), analysprotokoll för HPV till *digene* HC2 System, LumiCheck Plate-programvara och *digene* användarhandbok till HC2 System-programvaran (*HC2 System Software User Manual*)

Hybrid Capture System Rotary Shaker I

Hybrid Capture System Microplate Heater I

Hybrid Capture System Automated Plate Washer

Hybrid Capture System Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 (tillval)^B

Konversionsställ och ställlock (tillval)

digene provställ och ställlock (tillval)

EXPAND-4-pipett och ställ (tillval)^C

digene HC2 DNA Collection Device^D

Rörförslutardispenser och skärinstrument (tillval, används med MST Vortexer 2)

Rapid Capture System (tillval för testning av stora provvolymen)^E

Tvättanordning

Mikrotiterplattor för hybridisering

Lock för mikrotiterplattor

Tomma mikrotiterplattor med remsor (tillgängliga från Costart, modellnr 2581), tillval vid användning med Automated Plate Washer

Extra långa pipettspetsar för uttagning av prover

Provtagningsrör

Ställ till provtagningsrör

Skruvlock för provtagningsrör

Reagensbehållare för engångsbruk

DuraSealTM rörförseglingsfilm

Mikrorör för hybridisering

Mikrorörsställ

Plattlock

Utrustning och tillbehör för allmänt laboratoriebruk

65 ± 2 °C vattenbad som rymmer antingen 1 konversionsställ (36 x 21 x 9 cm) eller provrörsställ

Mikrocentrifug (tillval för centrifugering av probflaskor för maximal probvolym)

Vortexblandare med fäste för bägare

Enkanalsmikropipett; variabel inställning för volymer om 20–200 µl och 200–1 000 µl

Repetrande volymetriska pipetter, t.ex. Eppendorf[®] Repeater[®]-pipett eller motsvarande

8-kanalspipett; variabla inställningar för volymer om 25–200 µl

Timer

Natriumhypokloritlösning, 5 % vol/vol (eller hushållsblekmedel) Parafilm[®] eller motsvarande

Pipettspetsar för engångsbruk med aerosolbarriär för enkanalspipett (20–200 µl och 200–1 000 µl)

Engångsspetsar till Eppendorf Repeater-pipett (25 och 500 µl)

Engångsspetsar för 8-kanalspipett (25 till 200 µl)

Kimtowels[®]-torkar eller luddfria pappershanddukar

Bänkskydd för engångsbruk

Puderfria handskar

5 ml och/eller 15 ml rundbottnade polypropylenrör med snäpplock (för spädning av prob)

2,0 ml polypropylenrör med lock för mikrocentrifug

Ytterligare utrustning och tillbehör för provbehandling med Surepath-konservingsvätska

"Swinging bucket"-centrifug som kan uppnå 800 ± 15 x g och rymmer koniska centrifugrör på 15 ml av polypropylen

digene HC2 Sample Conversion-rör (15 ml koniska rör)^F

7 ml överföringspipetter med standardspetsar eller likvärdigt

QIAGEN transportmedium för prover

Engångsspetsar till Eppendorf Repeater-pipett (100 µl)

Extra utrustning och tillbehör för behandling av prover i PreservCyt-lösning

"Swinging bucket"-centrifug som kan uppnå 2 900 ± 150 x g och rymmer koniska centrifugrör på 10 ml eller 15 ml av polypropylen

5 ml serologiska pipetter eller överföringspipetter

digene HC2 Sample Conversion-kit^A

Engångsspetsar till Eppendorf Repeater-pipett (50 och 100 µl)

För manuellt blandningsförfarande:

digene HC2 Sample Conversion-rör (15 ml koniska rör)^F,

Sarstedt 10 ml koniska rör med lock eller VWR[®] eller

Corning[®] 15 ml koniska, polypropylencentrifugrör med lock

Rörställ för koniska rör på 10 eller 15 ml

För Multi-Specimen Tube Vortexer 2-förfarande

digene HC2 Sample Conversion-rör (15 ml koniska rör)^F

Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2

Konversionsställ och lock (specifikt för 15 ml koniska rör)

Rörförslutardispenser och avskärningsanordning

DuraSeal rörförslutarfilm (används med MST Vortexer 2)

^A Endast utrustning och tillbehör som är validerade med *digene* HC2 HPV DNA-tester är tillgängliga från QIAGEN.

^B Krävs även för användning när det halvautomatiska RCS-programmet utförs.

^C Specialartikel. Andra expanderbara multikanalspipetter kan användas förutsatt att ett spetsavstånd på 3,2 cm kan uppnås i expanderat läge. Alternativt kan en enkanalspipett med en pipetteringskapacitet på 75 µl användas.

^D Prestandaegenskaperna för detta *digene* HC2 HPV DNA-test har endast fastställts med de angivna provtagningsseterna.

^E Se *Rapid Capture System Användarhandbok* för ytterligare anvisningar som är specifika för användningen av det systemet för testning av stora provvolymen med den här analysen.

^F *digene* HC2-provkonverteringsrör (VWR eller Corning[®]) tillgängliga från QIAGEN måste användas för att garantera korrekt analysprestanda vid användning av Multi-Specimen Tube Vortexer 2.

VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHET

LÄS ALLA INSTRUKTIONER NOGGRANT INNAN TESTET ANVÄNDS.

SÄKERHETSFÖRESKRIFTER

ALLA PROVER ska behandlas som potentiellt smittförande. Ingen känd testmetod kan erbjuda en fullständig försäkran om att prover inte överför smitta. Det rekommenderas att humanprover handhas enligt gällande nationella/lokala säkerhetsföreskrifter för biologiska ämnen. Använd denna biosäkerhetspraxis i samband med material som innehåller eller misstänks innehålla smittämnen. I dessa säkerhetsåtgärder ingår bland annat:

1. Pipettera inte med munnen.
2. Undvik att röka, äta och dricka i områden där reagenser eller prover hanteras.
3. Använd puderfria engångshandskar medan du hanterar reagenser eller prover. Tvätta händerna noga när testet har utförts.
4. Rengör och desinficera allt spill från prover med ett desinfektionsmedel som har tuberkulocid effekt såsom 0,5 % vol/vol natriumhypoklorit, eller annat lämpligt desinfektionsmedel.^{42,43}
5. Dekontaminering och avfallshantering av prover, reagenser och annat potentiellt kontaminerat material ska ske enligt gällande nationella och lokala föreskrifter.

Vissa reagenser innehåller natriumazid. Natriumazid har rapporterats bilda bly- eller kopparazid i avloppsrör i laboratorier. Dessa azider kan explodera vid stötar, t.ex. hamrande. För att förhindra att det bildas bly- eller kopparazid ska avloppsrören spolats noga med vatten efter kassering av lösningar som innehåller natriumazid. För att ta bort föroreningar från äldre avloppssystem som misstänks ha ackumulering av azider rekommenderar US Occupational Safety and Health Administration följande: (1) sug upp vätskan från låset med en gummi- eller plastslang, (2) fyll på med 10 % vol/vol natriumhydroxidlösning, (3) låt stå i 16 timmar och (4) spola rikligt med vatten.

RCS-automatiserad testning

Se *Rapid Capture System Användarhandbok* för ytterligare varningar och försiktighetsåtgärder som är specifika för användningen av det systemet för testning av stora provvolymmer.

SKYDDS- OCH RISKFRASER FÖR KOMPONENTER

Följande risk- och skyddsfraser gäller för komponenter i *digene* HC2 HPV DNA Test-kit:

Tvättbuffertkoncentrat



Innehåller: Natriumazid. Varning! Farligt vid förtäring. Skadligt för vattenlevande organismer med långtidseffekter. Undvik utsläpp i miljön. Kassera innehållet/behållaren i en godkänd avfallsanläggning.

Denatureringsreagens



Innehåll: natriumhydroxid. Fara! Kan orsaka allvarliga brännskador på huden och skada ögonen. Kan vara frätande på metaller. Kassera innehållet/behållaren i en godkänd avfallsanläggning. OM DU FÅR DET I ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Om du bär kontaktlinser ska du ta av dem om det är lätt att göra. Fortsätt att skölja ögonen. OM DU FÅR DET PÅ HUDEN (eller i håret): Ta omedelbart av och avlägsna alla kontaminerade kläder. Skölj huden med vatten/duscha. Ring omedelbart en GIFTINFORMATIONSCENTRALEN eller en

läkare. Förvaras inlåst. Bär alltid skyddshandskar, skyddskläder, skyddsglasögon och ansiktsskydd.

Probspädningsvätska



Innehåller: ättiksyra, polyakrylsyra. Fara! Kan orsaka allvarliga brännskador på huden och skada ögonen. Kassera innehållet/behållaren i en godkänd avfallsanläggning. OM DU FÅR DET I ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Om du bär kontaktlinser ska du ta av dem om det är lätt att göra. Fortsätt att skölja ögonen. OM DU FÅR DET PÅ HUDEN (eller i håret): Ta omedelbart av och avlägsna alla kontaminerade kläder. Skölj huden med vatten/duscha. Ring omedelbart en GIFTINFORMATIONSCENTRALEN eller en läkare. Förvaras inlåst. Bär alltid skyddshandskar, skyddskläder, skyddsglasögon och ansiktsskydd.

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

Varning! Orsakar lätt hudirritation. Vid hudirritation: Sök läkarvård.

Low-Risk HPV Calibrator (Lågrisk-HPV-kalibrator)

Varning! Orsakar lätt hudirritation. Vid hudirritation: Sök läkarvård.

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

Varning! Orsakar lätt hudirritation. Vid hudirritation: Sök läkarvård.

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

Varning! Orsakar lätt hudirritation. Vid hudirritation: Sök läkarvård.


Negativ kalibrator

Varning! Orsakar lätt hudirritation. Vid hudirritation: Sök läkarvård.


Ytterligare information

Säkerhetsdatablad: www.qiagen.com/safety

ANVÄNDNINGSFÖRESKRIFTER

1. För in vitro-diagnostisk användning.
2. Cervixborste ska endast användas för kvinnor som inte är gravida.
3. Använd inte reagenserna efter utgångsdatumet som anges bredvid symbolen  på etiketten utan på kartongen.
4. Om analysen görs utanför de angivna tids- och temperaturintervallen kan resultaten bli ogiltiga. Analyser som inte gjorts inom fastställda tids- och temperaturintervall måste göras om.
5. Proceduren, kriterierna för analyskalibreringsverifiering, kvalitetskontrollen och tolkningen av resultaten för *digene* HC2 HPV DNA-testet måste följas noga för att man ska få fram pålitliga testresultat.
6. Det är viktigt att pipettera den indikerade reagensvolymen exakt och att blanda väl efter tillsättning av varje reagens. Om detta inte följs kan det leda till felaktiga testresultat. När du kontrollerar att de angivna färgförändringarna har skett bekräftar du att dessa villkor har uppfyllts.
7. Kitkomponenterna har testats som en enhet. Byt **inte** ut dem mot komponenter från andra källor eller andra loter.
8. Nukleinsyror är mycket känsliga för miljömässig nukleasnedbrytning. Nukleaser finns på människans hud och på ytor eller material som hanteras av människor. Rengör och täck över arbetsytor med ett bänkskydd för engångsbruk **och använd puderfria handskar medan analysstegen utförs.**
9. Kontrollera att kontaminering av infångningsmikrotiterplattan och detektionsreagens 2 med exogent alkaliskt fosfatas förhindras under utförandet av analysen. Substanser som kan innehålla alkaliskt fosfatas inkluderar detektionsreagens 1, bakterier, saliv, hår och oljor från huden. **Att infångningsmikrotiterplattan täcks efter tvättmomentet och under inkubationen med detektionsreagens 2 är speciellt viktigt eftersom exogent alkaliskt fosfatas kan reagera med detektionsreagens 2 och ge falskt positiva resultat.**
10. Skydda detektionsreagens 2 mot långvarig exponering för direkt ljus. Använd detektionsreagens 2 omedelbart efter alikvotering och undvik direkt solljus.
11. Den repeterande pipetten ska fyllas före pipettering av reagens och regelbundet kontrolleras för stora luftbubblor. Alltför stora luftbubblor i den repeterande pipettens spets kan medföra felaktig dispensering, vilket kan undvikas genom att fylla pipetten, dispensera all vätska och återfylla. Se pipettillverkarens bruksanvisningar för utförliga instruktioner.
12. Pipettering med flera kanaler ska utföras med den omvända pipetteringstekniken (se *Hybriddetektion*) för dispensering av detektionsreagens 1 och 2. Kontrollera att varje pipettspets på multikanalpipetten är riktigt fastsatt och påfylld.
13. Kontrollera att alla brunnar på mikrotiterplattan är noga rengjorda, enligt anvisningarna för manuell rengöring. Otillräcklig rengöring leder till ökad bakgrund och kan ge falska positiva resultat. Kvarvarande tvättbuffert i brunnarna kan ge en minskad signal eller dålig reproducerbarhet.
14. Låt det ta minst 60 minuter för Hybrid Capture System Microplate Heater I att uppnå $65\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ från en kallstart. Om du inte låter denna uppvärmningsperiod ta den tid som behövs kan hybridiseringsmikrotiterplattan smälta. Se *Microplate Heater I Användarhandbok* för detaljer.

REAGENSPREPARATION OCH FÖRVARING

1. Efter mottagandet ska kitet förvaras vid 2–8 °C. Tvättbuffertkoncentrat, denatureringsreagens och indikatorfärg kan förvaras vid 2–30 °C, efter behov.
2. Använd inte efter utgångsdatumet som anges vid symbolen  på kartongens etikett eller utgångsdatumet för de beredda reagenserna (se nedan).
3. Alla reagenser är färdiga för användning utom reagens för denaturering, lågrisk- och högrisk-HPV-prober och tvättbuffertkoncentrat.

För att testa prover för närvaro av någon av de 18 HPV-typerna, så tillhandahålls en metod för en kombinerad probblandning (CPC). Om du vill använda det här alternativet måste en kombinerad probblandning beredas genom att blanda samman utspädd lågrisk-HPV-probblandning och utspädd högrisk-HPV-probblandning innan *digene* HC2 HPV DNA-testet utförs. Dubbelprobsmetoden använder separata lågrisk- och högrisk-HPV-probblandningar. Se instruktioner nedan.

För testning av stora provvolym, se *Rapid Capture System Användarhandbok* för beredning av HPV-probblandning(ar), tvättbuffert, detektionsreagens 1 och detektionsreagens 2, då dessa anvisningar är specifika för användningen av det systemet för testning av stora provvolym.

REAGENS	BEREDNINGSMETOD												
Denatureringsreagens	<p>Bered först:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tillsätt 5 droppar indikatorfärg i flaskan med denatureringsreagens och blanda ordentligt. Denatureringsreagenset ska ha en homogen, mörklila färg. • När denatureringsreagenset väl har beretts är det stabilt i tre månader om den förvaras vid 2–8 °C. Märk det med det nya utgångsdatumet. Om färgen bleknar, tillsätt 3 droppar indikatorfärg och blanda noggrant före användning. <p>Warning! Denatureringsreagens är frätande. Använd lämpliga skyddskläder, skyddshandskar samt skyddsglasögon eller ansiktsskydd. Hantera med försiktighet.</p>												
Lågrisk-HPV-probblandning (beredd från lågrisk-HPV-prob och reagenser för probspädningsvätska)	<p>Bered under provdenatureringsinkubationen:</p> <p>Viktigt! Ibland fastnar proben i flaskans lock.</p> <p>Obs! Förhindra RNase-kontaminering av prob och probblandning. Använd en Aerosol-Barrier-pipettspets för probpipettering. Spädningsvätska för prob är viskös.</p> <p>Se till att blanda ordentligt när HPC-proberna bereds. En synlig virvel måste bildas i vätskan under blandningssteget. Ofullständig blandning kan leda till nedsatt signal.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Centrifugera flaskan för lågrisk-HPV-prob en kort stund för att flytta vätskan till botten av flaskan. Vänd försiktigt för att blanda. • Bestäm hur stor mängd av probblandning som behövs (25 µl/test). Det rekommenderas att lite extra probblandning görs för att kompensera för den volym som kan förloras i pipettspetsar eller till flaskans sida. Se föreslagna volymer i listan nedan. Det minsta antalet rekommenderade brunnar för varje användningstillfälle är 24. Om färre än 24 brunnar per analys önskas så kan det totala antalet tester per kit minska pga. begränsade volymer av prob och spädningsvätska för prob. • Överför den mängd probspädningsvätska som krävs till en ny engångsbehållare. Beroende på antalet tester så rekommenderas antingen ett 5 ml eller 15 ml rundbottnat polypropylenrör med lock. För att bereda probblandningen görs en spädnings 1:25 av lågrisk-HPV-prob i probspädningsvätskan. <table border="1" data-bbox="576 1654 1380 1816"> <thead> <tr> <th>Antal tester/strips</th> <th>Volym av prob spädningsvätska*</th> <th>Probvolym*</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>48/6</td> <td>2,0 ml</td> <td>80,0 µl</td> </tr> <tr> <td>24/3</td> <td>1,0 ml</td> <td>40,0 µl</td> </tr> <tr> <td>Per brunn</td> <td>0,045 ml</td> <td>1,8 µl</td> </tr> </tbody> </table> <p>*Dessa värden inkluderar den rekommenderade extravolymer.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pipettera lågrisk-HPV-prob i probspädningsvätskan genom att placera pipettspetsen 	Antal tester/strips	Volym av prob spädningsvätska*	Probvolym*	48/6	2,0 ml	80,0 µl	24/3	1,0 ml	40,0 µl	Per brunn	0,045 ml	1,8 µl
Antal tester/strips	Volym av prob spädningsvätska*	Probvolym*											
48/6	2,0 ml	80,0 µl											
24/3	1,0 ml	40,0 µl											
Per brunn	0,045 ml	1,8 µl											

	<p>mot rörets innervägg precis ovanför menisken och tömma innehållet. Doppa inte ned spetsen i probspädningsvätskan.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Vortexblanda i minst 5 sekunder vid maximal hastighet för att blanda noggrant. Det ska bildas en synlig virvel. Märk som lågrisk-HPV-probblandning och förvara i en ren sluten behållare tills du är klar att använda den. Oanvänd probblandning ska kasseras. 												
Högrisk-HPV-probblandning	Bered som för lågrisk-HPV-probblandning ovan. Märk som "Högrisk-HPV-probblandning". Oanvänd probblandning ska kasseras.												
Kombinerad probblandning	Bered lågrisk-HPV-probblandning och högrisk-HPV-probblandning enligt beskrivningen ovan. Tillsätt hela innehållet av den spädda lågrisk-HPV-probblandningen till röret med den spädda högrisk-HPV-probblandningen. Blanda ordentligt genom att blanda under minst 5 sekunder med maximal hastighet. Det ska bildas en synlig virvel. Märk som "Kombinerad probblandning". Oanvänd probblandning ska kasseras.												
Tvättbuffert	<p>Bered under infångningssteget:</p> <p>För Hybrid Capture System Automated Plate Washer ska tvättbufferten beredas enligt anvisningen nedan och förvaras i en övertäckt behållare, eller bered 1 liter åt gången och placera den i tvättbehållarna till Automated Plate Washer. Se tabellen nedan för blandningsvolymerna:</p> <p>Se användarhandboken för Automated Plate Washer för anvisningar om hantering och underhåll.</p> <p>Varning! Tvättbuffertkoncentrat är toxiskt vid förtäring. Använd lämpliga skyddskläder, handskar och ögon- och ansiktsskydd. Minimera exponering genom att tillsätta vatten till tvättbuffertkoncentrat vid preparation.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Mängd tvättbuffert koncentrat</th> <th>Mängd destillerat eller avjoniserat vatten</th> <th>Slutlig vätska av tvättbuffert</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>33,3 ml</td> <td>966,7 ml</td> <td>1 liter</td> </tr> <tr> <td>66,6 ml</td> <td>1 933,4 ml</td> <td>2 liter</td> </tr> <tr> <td>100 ml</td> <td>2 900 ml</td> <td>3 liter</td> </tr> </tbody> </table> <p>Obs! Det är mycket viktigt att alltid låta strömmen till Automated Plate Washer vara på. Då kan underhållssköljningen utföras om instrumentet inte har använts efter åtta timmar.</p> <p>Kontrollera att avfallsbehållaren till Automated Plate Washer är tom och att sköljbehållaren är fylld med destillerat eller avjoniserat vatten inför varje analys.</p> <p>För den manuella platttvättmetoden:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Blanda tvättbuffertkoncentratet noga. • Späd 100 ml tvättbuffertkoncentrat med 2,9 liter destillerat eller avjoniserat vatten i tvättanordningen och blanda noga (slutlig volym ska vara 3 liter). • Förslut behållaren för att förhindra kontaminering eller avdunstning. <p>Beredd tvättbuffert är stabil i tre månader vid 2–30 °C. Märk den med nytt utgångsdatum. Om tvättbufferten har förvarats i kylskåp, låt den komma i jämvikt vid 20–25 °C före användningen.</p> <p>Det rekommenderas att tvättapparaten och slangarna görs rena med 0,5 % natriumhypokloritlösning och noga sköljs med destillerat eller avjoniserat vatten en gång var tredje månad för att förhindra att de kontamineras med alkaliskt fosfat som finns i bakterier och mögel.</p>	Mängd tvättbuffert koncentrat	Mängd destillerat eller avjoniserat vatten	Slutlig vätska av tvättbuffert	33,3 ml	966,7 ml	1 liter	66,6 ml	1 933,4 ml	2 liter	100 ml	2 900 ml	3 liter
Mängd tvättbuffert koncentrat	Mängd destillerat eller avjoniserat vatten	Slutlig vätska av tvättbuffert											
33,3 ml	966,7 ml	1 liter											
66,6 ml	1 933,4 ml	2 liter											
100 ml	2 900 ml	3 liter											

VOLYMER FÖR FÄRDIGA REAGENS**Detektionsreagens 1
och
detektionsreagens 2****Omedelbart före användning:**

Blanda reagenset noggrant, och mätt därefter upp lämplig volym av detektionsreagens 1 eller detektionsreagens 2 i en ren reagensbehållare enligt anvisningarna som visas nedan. För att förhindra kontaminering får dessa reagens **INTE** hållas tillbaka i originalflaskorna: **Kassera oanvänt material efteråt**. Om en 8-kanalspipett inte används kan en lämplig repeterande pipett användas i stället. Om så är fallet ska alikvoter av reagenset göras i polypropylenrör av tillräcklig storlek för att hålla den nödvändiga volymen såsom anges nedan.

Antal tester/strips	Volymdetektion reagens 1 eller 2
96/12	flaskinnehåll
72/9	7,0 ml
48/6	5,0 ml
24/3	3,0 ml
1 test	0,125 ml

PROVTAGNING OCH PROVHANTERING

Cervixprover som tagits och transporterats med *digene* HC2 DNA Collection Device (bestående av en cervixborste och *digene* Specimen Transport Medium [provtransportmedium]) eller prover som tagits med en provtagningsanordning av borsttyp eller kombinerad borste/spatel och sedan placerats i PreservCyt-lösning eller cervikala prover som tagits i SurePath-konserveringsvätska är de enda proverna som rekommenderas för användning med *digene* HC2 HPV DNA-testet. Prover som tagits med andra provtagningsanordningar eller transporterats i annat transportmedium har inte godkänts för användning med denna analys. Prestandaegenskaperna för detta kit har endast fastställts med de angivna provtagningskiten. Cervixprover måste samlas in innan ättiksyra och jod tillsätts om en kolposkopisk undersökning utförs. Se bruksanvisningarna till *digene* HC2 DNA Collection Device när det gäller ytterligare procedurer för provtagning och hantering.

CERVIXPROVER I STM

STM-prover kan förvaras i rumstemperatur i upp till två veckor och transporteras utan kylning till testlaboratoriet. Prover ska skickas i en isolerad behållare med en transportör som skickar över natten eller på 2 dagar. På testlaboratoriet ska proverna förvaras vid 2–8 °C om analysen ska utföras inom en vecka. Om det dröjer mer än 1 vecka innan testet utförs, ska proverna förvaras vid -20 °C i högst 3 månader (se *Anmärkingar* under *Cervixbiopsier* före frysning). Ett konserveringsmedel har tillsatts till STM för att hämma bakterietillväxt och bevara integriteten hos DNA. Det är **inte avsett** att bevara livsdugligheten hos organismer eller celler. *digene* HC2 DNA Collection Device ska inte användas vid provtagning på gravida kvinnor.

CERVIXBIOPSIER

Nytagna cervixbiopsier med ett tvärsnitt på 2–5 mm kan även analyseras med *digene* HC2 HPV DNA-testet. Biopsiprovet måste omedelbart placeras i 1,0 ml STM och förvaras djupfrys vid -20 °C. Biopsiprover kan transporteras vid 2-30 °C för transport över natten till testlaboratoriet och förvaras vid -20 °C tills det ska bearbetas. Biopsier som är mindre 2 mm i diameter ska inte användas.

Obs! För att förhindra att locket lossnar på provrör som transporteras eller förvaras frysta:

- Täck locket med Parafilm innan du transporterar provrören som tidigare har varit frysta. Prover kan transporteras frysta eller vid 20–25 °C.
- När du tar ut prover från frysen för test, ska locket omedelbart ersättas med skruvlock för provtagningsrör.

CERVIXPROVER I PRESERVCYT-LÖSNING

Prover som tagits med en provtagningsanordning av borsttyp eller kombinerad borste/spatel och som sedan placerats i PreservCyt-lösning som ska användas för att göra objektglaset för ThinPrep[®]-paptest kan användas för *digene* HC2 HPV DNA-testet. Prover ska tas på vanligt sätt och ThinPrep Pap Test-objektglas ska beredas i enlighet med anvisningarna för Hologic.

Obs! Det måste finnas minst 4 ml PreservCyt-lösning kvar för *digene* HC2 HPV DNA-testet. Prover med mindre än 4 ml efter beredningen av paptestet kan innehålla för litet material och kan ge ett falskt negativt resultat i *digene* HC2 HPV DNA-testet.

Prover i PreservCyt-lösning kan sparas i upp till tre månader vid temperaturer mellan 2 °C och 30 °C, efter provtagning och före bearbetning av *digene* HC2 HPV DNA-testerna. Prover i PreservCyt-lösning kan inte frysas. Se *PreservCyt provberedningsprocedur* för att bearbeta dessa prover.

CERVIXPROVER I SUREPATH-KONSERVERINGSVÄTSKA

(ENDAST för High-Risk HPV-DNA-test)

Manuell provberedning av SurePath-prover utförs med användning av den postgradienta cellpelleten som är resultatet av beredningen av objektglaset för SurePath-paptest. Bered objektglaset för SurePath-paptest i enlighet med de relevanta anvisningarna för BD PrepStain[®] Slide Processor.

Viktigt! Omedelbart efter beredning av SurePath-papobjektglas, måste 2,0 ml SurePath-konserveringsvätska pipetteras i centrifugprovröret med den resterande cellpelleten. Detta bevarar den postgradienta cellpelleten hel så att *digene* HC2 HPV DNA-testet ska fungera.

Den postgradienta cellpelleten tillsammans med SurePath-konserveringsvätska kan förvaras i högst 4 veckor vid 2–30 °C, före provberedning för *digene* HC2 HPV DNA-testet.

SurePath-prover från den postgradienta cellpelleten bereds så som anges i denna bruksanvisning. Resultatet av manuell provberedning är ett denaturerat prov som är klart att gå vidare till hybridiseringssteget i testet.

TESTFÖRFARANDE

Prover kan innehålla smittbärande ämnen och ska hanteras i enlighet härmed. *digene* HC2 HPV DNA-testet kan utföras manuellt enligt anvisningar i denna bruksanvisning eller med instrumentet Rapid Capture System för testning av stora provvolymmer.

TESTNING AV STORA PROVVOLYMER MED RAPID CAPTURE SYSTEM

Rapid Capture System är ett automatiserat pipetterings- och spädningssystem för allmänt bruk som kan användas med *digene* HC2 HPV DNA-testet för testning av stora provvolymmer. Systemet kan hantera upp till 352 prover på åtta timmar, vari ingår en 3,5-timmarsperiod då inget ingripande krävs. Upp till 704 provresultat kan genereras på 13 timmar. Denaturering av proverna som förberedelse för testningen utförs oberoende av RCS, innan proverna ställs på RCS-plattformen. Dessutom utförs kemiluminiscent signaldetektering och resultatrapportering med offline-DML-instrumentet som är gemensamt för både manuella metoder och RCS-metoder. Stegen i *digene* HC2 HPV DNA-testet utförs i exakt samma följd som vid manuell testning. Med RCS-metoden kan upp till fyra mikrotiterplattor behandlas i överlappande sekvens. Varje platta innehåller prover och nödvändiga analyskalibratorer och -kvalitetskontroller.

Vid användning av Rapid Capture System, se *användarhandboken för Rapid Capture System* som medföljer instrumentet, utöver denna bruksanvisning, för nödvändig information om förfarandet och beskrivande information.

MANUELL METOD

Inställning

- Om Microplate Heater I används **ska du låta det ta minst 60 minuter att uppnå 65 ± 2 °C från en kallstart.** Se *användarhandboken för Microplate Heater I* för detaljer.
- Bekräfta att temperaturen i vattenbadet är vid 65 °C och att det finns tillräckligt mycket vatten så att hela volymen i provrören täcks.
- Ta ut proverna och **alla** behövliga reagenser ur kylskåpet **innan analysen påbörjas.** Låt dessa uppnå 20–25 °C under 15 till 30 minuter.

Obs! Bered proverna i PreservCyt-lösning och SurePath innan du låter redan denaturerade prover och kitreagenser utjämnas till jämvikt vid rumstemperatur.

- Använd analysprogramvaran för *digene*-analysen för att skapa plattlayouten för analysen. Se respektive användarhandbok för anvisningar om hur man skapar en plattlayout.
- Placera kalibratorer, kvalitetskontroller och prover som ska testas i ett provrörsställ, i samma ordning som de ska testas. **Den negativa kalibratorm, lågrisk HPV-kalibratorm och högrisk HPV-kalibratorm måste testas FÖRST.** Negativ kalibrator (NC), lågrisk HPV-kalibrator (LRC) eller högrisk HPV-kalibrator (HRC), lågrisk kvalitetskontroll (QC1-LR), högrisk kvalitetskontroll (QC2-HR) och prover ska köras i en mikrotiterplatta med 8-brunnars kolonnkonfiguration. Se *Exempel på layout* nedan.

Exempel på layout för en analys av en mikrotiterplatta med 24 brunnar:			
Rad	Kolonn		
	1	2	3
A	NK	Prov 1	Prov 9
B	NK	Prov 2	Prov 10
C	NK	Prov 3	Prov 11
D	LRC eller HRC	Prov 4	Prov 12
E	LRC eller HRC	Prov 5	Prov 13
F	LRC eller	Prov 6	Prov 14

	HRC		
G	QC1-LR	Prov 7	Prov 15
H	QC2-HR	Prov 8	Prov 16

6. Om CPC-metoden (kombinerad probblandning) används testas NC, LRC och HRC i triplikat med den kombinerade probblandningen på samma mikrotiterplatta. Använd brunnarna A1, B1 och C1 för NC respektive brunnarna D1, E1, F1, G1, H1 och A2 för LRC respektive HRC. Använd brunnarna B2 och C2 för kvalitetskontrollerna QC1-LR respektive QC2-HR och proverna som börjar med D2. **CPC-proceduren har inte godkänts för användning med Rapid Capture System.**
7. För dubbelprobsmetoden ska testerna med lågrisk-HPV-probblandning utföras på mikrotiterplattans vänstra sida och testerna med högrisk-HPV-probblandning på mikrotiterplattans högra sida.
- FÖRST, testa den negativa kalibratoren (NC) och lågriskkalibratoren (LRC) i triplikat med lågrisk-HPV-probblandning. Därefter testas kvalitetskontrollerna (QC1-LR och QC2-HR) och proverna en gång, också med lågrisk-HPV-probblandning. Placera NC-replikaten i A1, B1, C1 och LRC-replikaten i D1, E1, F1 och QC1-LR i G1 och QC2-HR i H1 och proverna med början i A2.
- DÄREFTER, testa NC och högriskkalibratoren (HRC) i triplikat med högrisk-HPV-probblandning. Därefter testas QC1-LR- och QC2-HR-proverna en gång, också med högrisk-HPV-probblandningen. Placera NC-replikaten i A7, B7, C7 och HRC-replikaten i D7, E7, F7 och QC1-LR i G7 och QC2-HR i H7 och proverna med början i A8. Se exemplet på layout ovan.
- Se tillämplig användarhandbok för korrekt installation av kalibratoren, kvalitetskontrollen och provet i programvaran.
8. Alternativt kan två separata mikrotiterplattor användas för kalibratorer, kvalitetskontroller och prover som testas med lågrisk- och högrisk-HPV-proben. NK och LRC testas i triplikat, QC1-LR och QC2-HR testas en gång med lågrisk-HPV-probblandning på en mikrotiterplatta, NC och HRC testas i triplikat och QC1-LR och QC2-HR testas en gång med högrisk-HPV-probblandning på en andra mikrotiterplatta. Använd brunnarna A1, B1 och C1 för NC och brunnarna D1, E1 och F1 för LRC respektive HRC. Använd brunnarna G1 och H1 för kvalitetskontrollerna QC1-LR respektive QC2-HR.
9. Prover kan testas en gång med kombinerad prob om CPC-metoden används eller en gång med lågrisk-HPV-probblandning och en gång med högrisk-HPV-probblandning om dubbelprobsmetoden används.

DENATURERING:

Obs!

- **Varning!** Denatureringsreagens är frätande. Var försiktig och använd puderfria handskar vid hantering.
- **Viktigt!** Vissa cervixprover kan innehålla blod eller andra biologiska material, vilket kan maskera färgförändringarna när denatureringsreagens tillsätts. Prover som uppvisar en mörk färg före tillsättningen av denatureringsreagens kanske inte visar den korrekta färgförändringen i detta steg. I dessa fall påverkar avsaknad av rätt färgförändring inte analysresultaten. Att blandning utförts korrekt kan verifieras genom att observera färgförändring på kalibratorerna och kvalitetskontrollerna.
- Se till att vattennivån i vattenbadet, under denaturerings- och hybridiseringsmomenten, är tillräcklig för att sänka ned rörets hela provvolym.
- Kalibratorer, kvalitetskontroller och prover kan beredas fram till denatureringsmomentet och förvaras vid 2-8 °C över natten eller vid -20 °C i upp till 3 månader. Prover får frysas och tinas maximalt 3 gånger och förvaras maximalt 2 timmar i rumstemperatur under varje tiningscykel. Blanda noggrant före användning.
- Efter denaturering och inkubation betraktas proverna inte längre som smittsamma.²⁶ Laboratoriepersonal ska dock fortfarande följa nationella och lokala säkerhetsföreskrifter.

- Ta inte bort provtagningsanordningen före denaturering.
- För att undvika falskt positiva resultat är det mycket viktigt att allt kalibrator-, kvalitetskontroll- och STM-provmaterial kommer i kontakt med denatureringsreagenset. Blandning efter tillsats av denatureringsreagenset är ett kritiskt moment: **Se till att Multi-Specimen Tube Vortexer 2 är inställd på 100 (maxhastighet) och att en synlig vätskevirvel som sköljer över hela rörets insida observeras under blandningen. Vid manuell blandning är det viktigt att se till att varje kalibrator, kvalitetskontroll och prov blandas individuellt i minst 5 sekunder vid full hastighet så att vätskevirveln sköljer över hela den inre ytan av röret.**

Prepareringsförfarande för kalibrators, kvalitetskontroller och STM-prover

1. Ta av och kassera locken från kalibrators, kvalitetskontroller och STM-provrör.

Obs! Lock som tas av provrören ska betraktas som potentiellt smittsamma. Kassera dem i enlighet med nationella och lokala föreskrifter.
2. Pipettera denatureringsreagens med indikatorfärg i varje kalibrator, kvalitetskontroll eller STM-prov med en repeterande eller justerbar pipett. Dör att förhindra korskontaminering av proverna ska inte sidorna i röret vidröras. Den denatureringsreagensvolym som behövs är lika med halva provvolymen. Exakt volym för varje typ av kalibrator, kvalitetskontroll och prov anges i tabellen nedan.

Späd kvarvarande denatureringsreagens i flaskan före kassering i enlighet med nationella och lokala laborierprocedurer.

Kalibrator, kvalitetskontroll eller prov	Denatureringsreagensvolym som krävs
Negativ kalibrator	1 000 µl
Lågrisk eller högrisk HPV-kalibrator	500 µl
Lågrisk eller högrisk kvalitetskontroller	500 µl
Cervixprov	500 µl

3. Blanda proverna med en av de två metoderna nedan.

Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2-metod

Obs! *digene* HC2 DNA Collection Device-prover som blandas med MST Vortexer 2 **måste** hybridiseras med hybridiseringsmikrotiterplattan och Microplate Heater I-metoden.

- a) Täck kalibrators, kvalitetskontrollerna och STM-provrören med DuraSeal rörförseglingsfilm genom att dra filmen över rören i stället.
- b) Placera ställets lock över de filmtäckta rören och lås det på plats med de två sidoklämmorna. Skär filmen med skärinstrumentet.
- c) Placera stället på Multi-Specimen Tube Vortexer 2 och fäst ställen med klämman. Se till att hastigheten är inställd på 100 (maximal hastighet) och slå PÅ vortexblandaren. Vortexblanda rören i 10 sekunder.

Manuell metod för individuell blandning

- a) Förslut kalibrators, kvalitetskontrollerna och STM-provrören igen med rena skruvlock för provtagningsrör.
- b) Blanda varje rör noga genom att vortexblanda dem individuellt, vid hög hastighet, i minst 5 sekunder.
- c) Vänd varje provrör en gång för att skölja rörets insida, locket och kanten.
- d) Sätt röret i stället igen.

Oavsett vilken blandningsmetod som används **måste en vätskevirvel ses inne i varje rör under blandningen så att vätskan sköljer rörets hela inneryta.** Kalibratorerna, kvalitetskontrollerna och proverna ska bli lila.

- Inkubera rören i provrörstället i ett vattenbad med 65 ± 2 °C under 45 ± 5 minuter (denaturerade kalibratorer, kvalitetskontroller och prover kan testas omedelbart eller förvaras såsom beskrivs under Anmärkningar ovan). Bered HPV-probblandning(ar) under denna inkubation. Se avsnittet *Reagenspreparation och förvaring*.

Prepareringsförfarande för prover i PreservCyt-lösning

Obs!

- Se bruksanvisningen till *digene* HC2 Sample Conversion-kit för fullständig information.
- Beredning av en aliquot på 4 ml PreservCyt-lösning ger tillräcklig volym för två tester vid manuell testning. Minsta volym som kan beredas är 4 ml.
- Bered i satser om högst 36 prover i PreservCyt-lösning, annars kan cellpelleten fastna när supernatanten dekanteras. Detta är viktigt för att bibehålla integriteten hos cellpelleten under dekanteringsmomentet. Om du ska preparera ytterligare flaskor med PreservCyt-lösning, börja inte preparera dem förrän du har avslutat preparationen av den första satsen.

Reagensberedning

Använd antingen det denatureringsreagens (DNR) som medföljer *digene* HC2 HPV DNA-testet (se *Reagenspreparation och förvaring*) eller det DNR som medföljer *digene* HC2 Sample Conversion-kit. Bered det DNR som medföljer *digene* HC2 Sample Conversion-kitet, tillsätt 3 droppar indikatorfärg i flaskan med DNR och blanda noggrant. Lösningen ska ha en homogen, mörklila färg. För att avgöra hur stor volym som behövs, använd tabell 1.

Tabell 1
Volymbehov: Reagensberedning

Antal tester	Volym av PreservCyt-lösning	Volym av konverteringsbuffert
1-2	4 ml	0,4 ml
3	6 ml	0,6 ml
4	8 ml	0,8 ml
5	10 ml	1,0 ml
6	12 ml	1,2 ml

- Märk ett *digene* HC2 Sample Conversion-rör, ett koniskt Sarstedt-rör på 10 ml eller ett koniskt rör på 15 ml från VWR eller Corning med rätt providentifieringsnummer.
- Hantera ett prov i taget:
 - Skaka flaskan med PreservCyt kraftigt för hand tills alla celler är homogent upplösta.
 - Pipettera omedelbart därefter, eftersom cellerna lägger sig snabbt, rätt volym av PreservCyt-provet i det märkta röret. Pipettera in PreservCyt-lösningen längst ned i det koniska röret så att så litet cellmaterial som möjligt fastnar på insidan av röret.
- Tillsätt rätt volym av Sample Conversion-buffert i varje rör (se tabell 1).
- Sätt på locket igen och blanda innehållet i varje rör noga med en vortexblandare med koppfäste.

Obs! MST Vortexer 2-förfarandet har inte validerats för vortex av prover i PreservCyt-lösning med Sample Conversion-buffert före centrifugering och får således inte användas i detta steg.
- Centrifugera rören i en rotor med en svängande bågare vid $2\ 900 \pm 150$ x g i 15 ± 2 minuter.

6. Under centrifugeringen ska Specimen Transport Medium/denatureringsreagensblandningen (STM/DNR) beredas i förhållandet 2:1, enligt tabell 2.

Obs! STM/DNR-blandningen måste beredas på nytt varje dag som testerna utförs.

- a. För att fastställa den totala volymen STM/DNR-blandning som krävs ska du använda startvolymen för prov i PreservCyt-lösning som en guide och multiplicera STM och DNR "per rörvolym" med det antal prov som ska bearbetas (se tabell 2).

Tabell 2
Volymbehov: STM/DNR

Antal tester	Volym av PreservCyt-lösning	STM-volym per rör för slutlig STM/DNR-blandning*	DNR-volym per rör för slutlig STM/DNR-blandning*	STM/DNR-blandning som tillsätts till röret
1-2	4 ml	120 µl	60 µl	150 µl
3	6 ml	170 µl	85 µl	225 µl
4	8 ml	220 µl	110 µl	300 µl
5	10 ml	270 µl	135 µl	375 µl
6	12 ml	320 µl	160 µl	450 µl

* Volymerna som anges i tabellen ska inte tillsättas direkt till provröret.

- b. Blanda lösningen väl med vortexblandning.
7. Ta ut rören ur centrifugen ett i taget och placera dem i ett provrörsställ eller konversionsställ. En rosa/orange pellet ska finnas i botten på varje rör.
- Obs!** Prover som inte har en synlig cellpellet efter centrifugering kan inte användas för testning och ska kasseras.
8. Hantera varje rör individuellt:
- Ta bort locket och lägg det åt sidan på en ren, luddfri pappershandduk.
 - Dekantera supernatanten försiktigt.
 - Behåll den inverterade rörpositionen och torka försiktigt (cirka sex gånger) på absorberande luddfria pappershanddukar tills ingen vätska längre droppar från röret. Använd ett rent område på pappershandduken varje gång. Låt **inte** cellpelleten glida ned i röret under torkning.
- Obs!**
- Torka inte på samma område på den absorberande luddfria pappershandduken mer än en gång.
 - Det är viktigt att ta bort så mycket PreservCyt-lösning som möjligt genom torkning. Det är dock normalt med rester av PreservCyt efter torkning.
- d. Placera röret i ett provrörsställ eller i konversionsstället.

VORTEXBLANDNING OCH DENATURERING

Manuellt blandningsförfarande

- Tillsätt rätt volym av STM/DNR i varje pellet (se tabell 2). Sätt tillbaka locket på varje rör och suspendera pelleten på nytt genom att vortexblanda varje rör individuellt i minst 30 sekunder på högsta hastighet. Om det är svårt att få en pellet att suspenderas igen kan röret blandas i ytterligare 10–30 sekunder eller tills pelleten flyter loss från botten av röret. Om pelleten ännu inte är upplöst efter ytterligare blandning (högst två minuter sammanlagt) ska du anteckna provets identifikation och gå till nästa steg.
- Placera rören i ett ställ.

3. Placera stället i ett vattenbad med 65 ± 2 °C i 15 ± 2 minuter. Kontrollera att vattnet täcker all vätska i alla rör.
4. Ta ut stället med prover ur vattenbadet och blanda proven individuellt i 15–30 sekunder.
Obs! Se till att alla cellpelletar är helt suspenderade igen. Prover som fortfarande har en synlig cellpellet kan inte användas för testning och ska kasseras.
5. Sätt tillbaka stället i vattenbadet på 65 ± 2 °C och fortsätt denatureringen i ytterligare 30 ± 3 minuter.
6. Gå vidare till *hybridiseringsmomentet* eller se *Valfri stoppunkt* för förvaring och hantering av denaturerade prover.

Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2-förfarande

Obs!

- Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2-förfarandet har validerats för beredning av prover i PreservCyt-lösning efter centrifugering och dekantering av supernatanten.
 - Det är bara MST Vortexer 2 som är avsedd för beredning av prover i PreservCyt-lösning.
 - Konverteringsstället och locket är särskilt utformade för *digene* HC2 Sample Conversion-rör (VWR eller Corning 15 ml koniska rör). Endast en rörtyp åt gången ska användas på konversionsstället. Andra varumärken har inte validerats för användning.
 - Det är viktigt att man följer de angivna blandningstiderna för konversionsstället med lock.
 - Konverteringsstället och locket kan inte användas för att vortexblanda *digene* HC2 DNA Test-kitets kalibratorer eller kvalitetskontroller. Höjden på STM-rören gör att de inte kan blandas ordentligt i konversionsstället med lock.
1. Efter att ha torkat av alla de märkta koniska 15 ml rören ska du ställa dem var och en på sin plats i konversionsstället.
 2. Tillsätt rätt volym av STM/DNR-blandning i varje pellet (tabell 2).
 3. Täck de koniska 15 ml rören med DuraSeal förseglingsfilm genom att dra filmen över rören, där de står i stället.
 4. Placera ställets lock över de filmtäckta rören och lås det på plats med de två sidoklämmorna. Klipp till filmen med skärinstrumentet när locket sitter fast ordentligt.
 5. För upp spaken med rött handtag till horisontellt läge.
 6. Placera konversionsstället med locket på MST Vortexer 2 så att det största naggade hörnet på konversionsstället kommer i det högra främre hörnet. Placera stället med lock på MST Vortexer 2-plattformen så att det sitter ordentligt mellan stöden. Fäst stället genom att flytta den röda spaken nedåt, till det vertikala läget. Detta låser fast stället på plats.
 7. Kontrollera att hastigheten är inställd på 100 (maximal hastighet) och att strömbrytarens pulsgenerator är AV.
 8. Slå PÅ vortexblandaren. **Vortexblanda rören i 30 sekunder.**
 9. Stäng AV vortexblandaren.
 10. Ta bort konverteringsstället och locket från MST Vortexer 2 genom att lyfta upp den röda spaken.
 11. Placera stället i ett vattenbad om 65 ± 2 °C i 15 ± 2 minuter. Kontrollera att vattnet helt täcker all vätska i alla rör.
 12. Efter 15 minuters inkubation ska du ta upp stället med proverna ur vattenbadet.
 13. För att undvika stänk ska du torka av det mesta av vattnet på stället innan det placeras på MST Vortexer 2.
 14. Sätt fast konverteringsstället och locket i MST Vortexer 2 enligt beskrivningen i *steg 6*.
 15. Kontrollera att hastigheten är inställd på 100 och slå PÅ vortexblandaren. **Blanda rören i en minut.**

16. Stäng AV vortexblandaren.

Obs! I MST Vortexer 2-förfarandet standardiserar blandningshastigheten, tiderna och beredningen. Det betyder att cellpelleten inte behöver kontrolleras visuellt, vilket måste göras om man använder sig av manuell blandning.

17. Ställ tillbaka stället i vattenbadet på 65 ± 2 °C och fortsätt denatureringen i 30 ± 3 minuter.

18. Ta upp stället ur vattenbadet, torka det och sätt fast det i vortexblandaren.

19. Slå PÅ vortexblandaren. **Blanda i 10 sekunder på högsta inställning.**

20. Stäng AV vortexblandaren. Ta bort stället.

21. Ta omedelbart bort ställets lock och DuraSeal-rörförseglingsfilmen från proven.

22. Gå vidare till *hybridiseringsmomentet* eller se *Valfri stoppunkt* för förvaring och hantering av denaturerade prover.

Prepareringsförfarande för SurePath-prover (ENDAST för High-Risk HPV DNA-testning)

Efter cytologisk behandling fortsätter du på följande sätt:

1. Kontrollera att den observerade vätskevolymen motsvarar 2,8 ml.

WARNING! Om den resterande cellpelleten verkar innehålla mindre än 1 ml vätska är det möjligt att SurePath-konservingsvätska inte tillsattes efter cytologi och att provet INTE är lämpligt för högrisk-HPV-DNA-testning.

2. Kontrollera att proverna är rumstempererade.

3. Centrifugera proverna i en rotor med en svängande bägare vid $800 \pm 15 \times g$ i 10 ± 1 minuter.

4. Avlägsna rören från centrifugen.

5. Dekanter supernatanten försiktigt omedelbart efter centrifugering och torka av varje rör försiktigt (cirka tre gånger) på absorberande pappershanddukar för att få bort vätska. Undersök pelleten i varje rör. **Låt inte cellpelletarna glida ned i röret under torkning.**

6. Placera rören i stället.

7. Tillsätt 200 µl STM till varje pellet med en repeterande eller justerbar pipett.

Obs! Rör kan blandas utan lock.

8. Lös upp varje pellet genom att blanda varje rör individuellt i 15 sekunder vid hög hastighet. Om pelleten är svår att lösa upp ska man blanda i ytterligare 5 till 30 sekunder eller tills pelleten flyter lös från botten av röret och ser ut att lösas upp.

9. Pipettera 100 µl beredd denatureringsreagens (med indikatorfärg) i varje prov med en repeterande eller justerbar pipett.

WARNING! Dör att förhindra korskontaminering av proverna ska inte sidorna i röret vidröras.

Följ tillämpliga lokala och nationella bestämmelser för kassering av frätande ämnen vid kassering av återstående denatureringsreagens.

10. Blanda varje rör noggrant och individuellt vid hög hastighet i 5 sekunder.

Obs! Rör kan blandas utan lock.

Märk 15 ml koniskt rör med lämplig providentifikation och typ (exempel "SP" för SurePath-provtyp) och placera det i ett ställ.

Obs! Om du använder Rapid Capture System för halvautomatiska analysbearbetning måste VWR eller Corning koniska rör på 15 ml användas för korrekt placering i *digene* konverteringsställ (silverställ).

11. Överför hela rörvolymen till ett 15 ml koniskt rör med skruvlock genom att använda en 7-ml överföringspipett för engångsbruk med standardspets eller motsvarande¹.
12. Sätt på locken på 15 ml koniska rör.
13. Inkubera i ett vattenbad på 65 ± 2 °C i 90 ± 5 minuter.

WARNING! Denna inkubationstid är längre än vad som behövs för andra godkända provtyper.

14. Om HPV-testning ska slutföras samma dag ska du denaturera *digene* HC2 DNA-testets kalibratorer enligt bruksanvisningen.
15. Ta ut provstället ur vattenbadet.

Valfri stoppunkt

Efter denaturering kan STM-prov och konverterade PreservCyt- och SurePath-prov förvaras vid 2–8 °C över natten eller vid -20 °C i upp till 3 månader. Vid förvaring i kylskåp över natt kan proverna lämnas kvar i konversionsstället med DuraSeal-filmen och ställocket på. Före förvaring vid -20 °C ska ställets lock och DuraSeal-filmen tas bort och locken sättas tillbaka på rören. I vilket fall måste proverna anta rumstemperatur (20–25 °C) och noga vortexblandas innan hybridiseringsmomentet kan påbörjas.

Obs! Denaturerade prover får inte förvaras eller transporteras på kolsyreis.

Prover får frysas och tinas maximalt 3 gånger och förvaras maximalt 2 timmar i rumstemperatur under varje tiningscykel.

HYBRIDISERING: KOMBINERAD PROBBLANDNING (CPC) OCH DUBBELPROBSMETODEN

Obs!

- HPV-probblandningar är viskösa. Kontrollera att probblandningen är väl blandad och att den volym som behövs dispenserar fullständigt i varje brunn på mikrotiterplattan. Se avsnittet *Reagenspreparation och förvaring*.
- Om det denaturerade provet har förvarats vid -20 °C, låt det tina till 20–25 °C och vortexblanda provet ordentligt innan hybridisering påbörjas.
- Förvärm Microplate Heater I till 65 ± 2 °C i minst 60 minuter före användning. Se *användarhandboken till Microplate Heater I* för ytterligare anvisningar vid behov.

Hybridiseringsmetod som använder hybridiseringsmikrotiterplatta och Microplate Heater I

Obs! Prover som tagits med *digene* HC2 DNA Collection Device i STM och bearbetats med MST Vortexer 2-metoden kan **endast** hybridiseras med Microplate Heater I-metoden.

1. Ta fram och märk en hybridiseringsmikrotiterplatta.
2. Ta ut kalibratorer, kvalitetskontroller och prover ur vattenbadet efter inkubationen. Om Multi-Specimen Tube Vortexer 2 används ska du vortexblanda hela provstället med STM-prov i minst 5 sekunder på högsta hastighet. För prover i PreservCyt- eller SurePath-lösning ska du blanda hela konversionsstället i minst 10 sekunder på högsta hastighet. Alternativt kan varje rör blandas individuellt under minst 5 sekunder.
3. Pipettera 75 µl av varje kalibrator, kvalitetskontroll eller prov i **botten** av en tom brunn på en hybridiseringsmikroplatta efter plattlayouten som skapats under *installationen*. Undvik att vidröra brunnarnas sidor och begränsa bildningen av luftbubblor. Använd en ren, extra lång pipettspets

¹ QIAGEN-verifikationstester använder 15 ml koniska rör av märket VWR

för varje överföring för att undvika korskontamination av kalibratorer, kvalitetskontroller eller prover. Ta inte bort provtagningsanordningen från provets transportrör. Denaturerade prover kan tillslutas med skruvlock för provtagningsrör och kan förvaras med provtagningsanordningen kvar i rören. För denaturerade PreservCyt-prover kan de ursprungliga locken användas.

Obs! Falskt positiva resultat kan inträffa om aliquoter av prover inte överförs noggrant. Vid överföringen av prov får inte pipettspetsen vidröra rørets insida när aliquoten på 75 µl tas bort.

4. När det sista provet har överförts **lägger du ett lock på hybridiseringsmikrotiterplattan och låter den inkuberas i 10 minuter vid 20–25 °C.**
5. Fördela den beredda och ordentligt vortexblandade probblandningen i aliquoter i en reagensbehållare för engångsbruk. Pipettera försiktigt 25 µl av probblandningen i varje brunn som innehåller kalibratorer, kvalitetskontroller och prover med hjälp av en 8-kanalspipett och med nya spetsar för varje rad. Dispensera probvolymen till varje hybridiseringsbrunn och undvik returstänk. Undvik att vidröra brunnarnas sidor. Placera plattlocket på mikrotiterplattan som ska vara pålagt under hela denatureringsinkubationen.
6. Täck hybridiseringsmikrotiterplattan med plattlocket och skaka med Hybrid Capture-systemets Rotary Shaker I som ställts in på 1 100 ±100 varv/min i 3 ± 2 minuter. *Kalibratorer, kvalitetskontroller och prover ska bli gula efter skakning.* Brunnar som fortfarande är lila har eventuellt inte fått rätt mängd probblandning. Tillsätt ytterligare 25 µl probblandning till de prover som fortfarande är lila och skaka igen. Om brunnarna förblir lila efter denna procedur ska proverna testas på nytt.

Obs!

- Efter skakningen ska prover i PreservCyt-lösning bli rosa istället för gula.
- Var noga med att inte stänka när du placerar hybridiseringsmikrotiterplattan i Microplate Heater I.

7. Inkubera i Microplate Heater I som är förvärmad och utjämnad till 65 ± 2 °C i 60 ± 5 minuter.

Hybridiseringsmetod med mikrorör och vattenbad

Obs!

- Att bearbeta prover som tagits med *digene* HC2 DNA Collection Device i STM genom att använda MST Vortexer 2-metoden för blandning och vattenbadsmetoden för hybridisering **har inte validerats**. Prover som tagits med *digene* HC2 DNA Collection Device i STM och bearbetats med MST Vortexer 2-metoden kan **endast** hybridiseras med Microplate Heater I-metoden.
- Om det denaturerade provet har förvarats vid -20 °C, låt det tina till 20–25 °C och vortexblanda provet ordentligt innan hybridisering påbörjas.

1. Märk och placera erforderligt antal rena hybridiseringsmikrorör i mikrorørsstället.
2. Ta ut kalibratorer, kvalitetskontroller och prover ur vattenbadet efter inkubationen. Vortexblanda varje rör individuellt under minst 5 sekunder precis innan aliquoter tas bort.
3. Pipettera 75 µl av varje kalibrator, kvalitetskontroll eller prov i **botten** av det tomma hybridiseringsmikrorøret efter plattlayouten som skapats under installationen. Undvik att vidröra mikrorørens sidor och begränsa bildningen av luftbubblor. Använd en ren, extra lång pipettspets för varje överföring för att undvika korskontamination av kalibratorer, kvalitetskontroller eller prover. Det är inte nödvändigt att ta bort provtagningsanordningen från provets transportrör. Denaturerade prover kan tillslutas med skruvlock för provtagningsrör och kan förvaras med provtagningsanordningen kvar i rören.

Obs! Falskt positiva resultat kan inträffa om aliquoter av prover inte överförs noggrant. Vid överföringen av prov får inte pipettspetsen vidröra rørets insida när aliquoten på 75 µl tas bort.

- När det sista provet har överförts ska **hybridiseringsmikrorören inkuberas i 10 minuter vid 20–25 °C**.
- Fördela den beredda och ordentligt vortexblandade probblandningen i aliquoter i en reagensbehållare för engångsbruk. Pipettera försiktigt 25 µl av probblandningen i varje mikrorör som innehåller kalibratorer, kvalitetskontroller och prover med hjälp av en 8-kanalspipett med nya spetsar för varje rad. Dispensera probvolymen till varje hybridiseringsmikrorör och undvik returstänk. Undvik att vidröra rörens sidor. Inspektera stället underifrån för att försäkra dig om att alla rör har fått rätt mängd probblandning.
- Täck mikrorören med en plattförseglare. Placera locket till stället över stället. Skaka provrörsstället för mikrorör på Rotary Shaker I som ställts in på $1\ 100 \pm 100$ varv/min i 3 ± 2 minuter. *Kalibratorer, kvalitetskontroller och prover ska bli gula efter skakning*. Rör som fortfarande är lila har eventuellt inte fått rätt mängd probblandning. Tillsätt ytterligare 25 µl probblandning till de prover som fortfarande är lila och skaka igen. Om rören fortfarande är lila efter denna procedur ska proverna testas igen.

Obs! Efter skakning ska prover i PreservCyt-lösning bli rosa istället för gula.

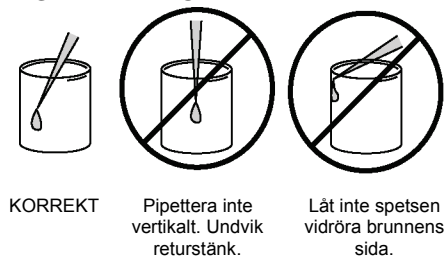
- Inkubera i ett vattenbad med 65 ± 2 °C i 60 ± 5 minuter. Kontrollera att vattennivån i vattenbadet räcker för att täcka hela volymen av hybridiseringsblandningen. Provrörsstället för mikrorör flyter i vattenbadet.

Obs! Skapa en plattlayoutfil med analysprogramvaran för *digene*-analyser om detta inte har gjorts tidigare.

HYBRIDINFÅNGNING

- Ta bort alla utom det nödvändiga antalet brunnar från infångsmikrotiterplattan på plattramen. Lägg tillbaka de oanvända mikrotiterplattbrunnarna i originalpåsen och försegla. Numrera varje kolonn 1, 2, 3... med en märkpenna. . . . Märk mikrotiterplattan med lämplig identifiering. Proverna ska tillsättas brunnarna enligt layouten i exemplet som förbereddes under Inställning.
- Ta försiktigt bort hybridiseringsmikrotiterplattan som innehåller kalibratorer, kontroller och prover från Microplate Heater I. Ta omedelbart bort plattlocket och lägg det på en ren yta. Ta alternativt ut provrörsstället för mikrorör ur vattenbadet. Ta omedelbart bort locket från stället och dra plattförseglaren uppåt och längs med stället.
- Överför hela innehållet (cirka 100 µl) i kalibratorer, kvalitetskontroller och prover från hybridiseringsmikrotiterplattans brunnar eller mikrorör till botten av motsvarande brunnar på infångsmikrotiterplattan med en 8-kanalspipett. Använd nya pipettspetsar på 8-kanalspipetten för varje överförd kolonn och låt varje pipettspets tömmas helt för att se till att det sker en fullständig provöverföring. Om så önskas kan pipetten stadgas genom att **mitten** på pipettspetsarna får vila på den övre kanten av brunnarna på infångningsmikrotiterplattan (se *diagram 1*).

DIAGRAM 1: KORREKT PIPETTERING



- Täck infångsmikrotiterplattan med plattlocket eller plattförseglaren och skaka med Rotary Shaker I på $1\ 100 \pm 100$ varv/min vid 20–25 °C under 60 ± 5 minuter.

5. Bered tvättbufferten och kontrollera skölj- och tvättbehållarna till Automated Plate Washer under den här inkubationen. Se avsnittet Reagenspreparation och förvaring.
6. När infångningssteget är fullständigt ska du ta bort infångstmikrotiterplattan från Rotary Shaker I och försiktigt ta bort plattlocket eller plattförseglaren. Tag bort vätskan från brunnarna genom att hålla den i slasken. Vänd plattan helt upp och ned och skaka hårt med en nedåtgående rörelse och var försiktig så att detta inte orsakar returstränk genom att dekantera den för nära slaskens botten. **Vänd inte tillbaka plattan igen**; torka genom att knacka plattan hårt 2–3 gånger på rena Kimtowels-torkar eller motsvarande luddfria pappershanddukar. Kontrollera att all vätska har avlägsnats från brunnarna och att ovansidan på plattan är torr.

HYBRIDDETEKTION

Obs!

- Utför tillsatser över plattan från vänster till höger med en 8-kanalspipett.
 - Vi rekommenderar att den omvända pipetteringstekniken används för att förbättra enhetligheten för reagenstilltillsats. Med denna teknik överfylls pipettspetsarna initialt genom att använda pipettens andra stoppläge på kontrollen för aspirering/dispensering (kolv). Se procedur nedan. Torka av spetsarna på reagensbehållaren för engångsbruk för att ta bort överflödigt reagens före tillförelse till platta.
 - Om så önskas kan pipetten stadgas genom att mitten på pipettspetsarna får vila på den övre kanten av brunnarna på mikrotiterplattan. Iakttag försiktighet så att mikrotiterplattbrunnarnas sidor inte vidrörs, annars kan korskontamination av prover ske. Se diagram 1 ovan.
1. Fördela lämplig volym detektionsreagens 1 i alikvoter i en reagensbehållare för engångsbruk. Se avsnittet *Reagenstillverkning och förvaring* för instruktioner. Pipettera försiktigt 75 µl detektionsreagens 1 i varje brunn på infångstmikrotiterplattan med en 8-kanalspipett och den omvända pipetteringstekniken.

Omvänd pipetteringsteknik:

- a) Sätt fast spetsar på en 8-kanalspipett; kontrollera att alla spetsar sitter säkert.
 - b) Tryck pipettkolven förbi det första stoppet till det andra stoppet.
 - c) Sänk ner spetsarna i lösningen med detektionsreagens 1.
 - d) Släpp kolven sakta och låt lösningen fylla spetsarna.
 - e) Dispensera lösningen in i brunnarna på mikrotiterplattan (75 µl) genom att trycka ner kolven till det första stoppet. Frigör inte kolven förrän pipettspetsarna åter har sänkts ned i lösningen med detektionsreagens 1.
 - f) Fyll spetsarna igen och upprepa tills alla brunnar är fyllda. Fyll mikrotiterplattans brunnar från vänster till höger. Se till att alla brunnar är fyllda genom att observera den rosa färgens intensitet. Alla brunnar ska ha liknande intensitet.
2. Täck plattorna med plattlock eller ren plastfilm (eller liknande) och inkubera vid 20–25 °C under 30–45 minuter.

TVÄTTNING

Tvätta infångningsplattan med en av de två metoderna nedan.

Automated Plate Washer-metod

Obs! Automated Plate Washer ska alltid vara **PÅ**. Kontrollera att sköljbehållaren är fylld och att avfallsbehållaren är tom. Automated Plate Washer sköljer rutinmässigt systemet för rengöring. Se användarhandboken för Automated Plate Washer för vidare anvisningar.

FÖRE VARJE ANVÄNDNING:

- Se till att tvättbehållaren är fylld åtminstone till 1-litersmärket med tvättbuffertlösningen. Om inte, bered tvättbuffertlösningen. Se avsnittet Reagenspreparation och förvaring.
- Se till att sköljbehållaren är fylld med avjoniserat eller destillerat vatten.

- Se till att avfallsbehållaren är tom och att locket är säkert fastsatt.
 - Automated Plate Washer primas automatiskt före varje tvätt och sköljs efter varje tvätt.
1. Ta bort plattans lock och lägg plattan på plattformen till Automated Plate Washer.
 2. Se till att strömmen är PÅ, och att displayen visar "Digene Wash Ready" (Digene-tvätt klar) eller "P1".
Obs! Om endast en del av infångningsbrunnarna används måste tomma brunnar på mikrotiterplattan placeras på infångningsplattan för att komplettera kolonnen före tvätt.
 3. Välj antalet strips som ska tvättas genom att trycka på tangenten "Rows" (Rader) och sedan på "+" eller "-" för att justera. Tryck på tangenten "Rows" (Rader) för att återgå till "Digene Wash Ready" (Digene-tvätt klar) eller "P1".
 4. Tryck på "Start/Stop" för att börja.
 5. Tvättapparaten utför sex påfyllnings- och aspirationssteg vilket tar ungefär 10 minuter. Det görs en kortvarig paus under programmet, så ta inte ut plattan för tidigt. När Automated Plate Washer är klar med tvätten visar displayen "Digene Wash Ready" (Digene-tvätt klar) eller "P1".
 6. Ta bort mikroplattan från tvättapparaten när programmet är slut. Plattan ska vara vit och inga rester av rosa vätska ska finnas kvar i brunnarna på mikrotiterplattan.

Metod för manuell tvättning

1. Ta bort detektionsreagens 1 ur brunnarna genom att placera rena Kimtowels-torkar eller likvärdiga luddfria pappershanddukar på plattans översida och vänd den försiktigt upp och ned. Se till att pappret är i kontakt med hela ytområdet på plattan innan den vänd upp och ner. Låt plattan rinna av i 1–2 minuter. Låt torka väl på rena Kimtowels-torkar eller motsvarande luddfria pappershanddukar. Ta försiktigt bort och kassera använda pappershanddukar för att undvika kontaminering med alkaliskt fosfatas i senare steg.
2. Handtvätta plattan sex gånger med hjälp av tvättapparaten. Varje brunn ska tvättas så att den svämmar över för att ta bort detektionsreagens 1 från brunnarnas översida. Tvättningen börjar med brunn A1 och fortsätter på ett slingrande sätt till höger och nedåt. När alla brunnar är fyllda, ska vätskan dekanteras i vasken med en kraftig nedåtriktad rörelse. Den andra tvätten börjar med brunn H12 och rör sig med en slingrande rörelse till vänster och uppåt. Sekvensen för dessa två tvättar upprepas ytterligare två gånger så att varje brunn får totalt sex tvättar.
3. Efter tvätt ska plattan torkas genom att den vänds upp och ner på rena Kimtowels-torkar eller motsvarande luddfria pappershanddukar. Knacka hårt på den 3–4 gånger. Byt ut pappershanddukarna och gör om proceduren. Låt plattan ligga upp och ned och låt den rinna av i fem minuter. Torka av plattan en gång till.
4. Plattan ska vara vit och inga rester av rosa vätska ska finnas kvar i brunnarna på mikrotiterplattan.

SIGNALFÖRSTÄRKNING

OBS!

- Använd ett nytt par handskar när du hanterar detektionsreagens 2.
- **Endast** den reagensmängd som krävs för att utföra analysen ska fördelas i alikvoter i reagensbehållaren för engångsbruk för att undvika kontaminering av detektionsreagens 2. Se avsnittet om reagenspreparation. **Återlämna inte detektionsreagens 2 till den ursprungliga flaskan. Kassera oanvänt material efter användning.**
- Detektionsreagens 2-tillsatsen ska göras utan avbrott. Inkubationstiden för alla brunnar måste vara så lika som möjligt.
- Kontrollera att du inte vidrör sidorna på brunnen på mikrotiterplattan och att du inte får reagensstänk på pipetspetsarna eftersom prover då kan korskontamineras (se , *diagram 1*).

1. Pipettera försiktigt 75 µl detektionsreagens 2 i varje brunn på infångstmikrotiterplattan med en 8-kanalspipett såsom tidigare beskrivits. *Alla brunnar på mikrotiterplattan ska bli gula.* Se till att alla brunnar är fyllda genom att observera färgens intensitet. Alla brunnar ska ha liknande intensitet.
2. Täck mikrotiterplattorna med ett plattlock eller en ren Parafilm (eller liknande) och inkubera vid 20–25 °C under 15 minuter. Undvik direkt solljus.
3. Avläs mikrotiterplattan på DML-instrumentet efter 15 minuters inkubation (och högst 30 minuter efter inkubation).
4. Det analys-specifika programprotokollet möjliggör inmatning av viktig information om analysen direkt i programvaran.
5. Om du inte använder en full mikrotiterplatta tar du bort mikroplattans använda brunnar från mikroplatttramen, sköljer mikroplatttramen noga med destillerat eller avjoniserat vatten, och torkar och sparar den för nästa test.

KRITERIER FÖR ANALYSKALIBRERINGSVERIFIERING

Analyskalibreringsverifiering utförs för att säkerställa att reagenserna och försedda material för kalibratorerna och kvalitetskontrollerna fungerar som de ska, vilket möjliggör en noggrann bestämning av analysens cutoff-värde. För *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet krävs kalibrering vid varje analys; därför är det nödvändigt att verifiera varje analys med kriterierna nedan. Denna verifieringsprocedur är inte avsedd att ersätta intern kvalitetskontrolltestning. Protokollen för analysprogram för *digene*-analyser verifierar automatiskt kriterierna nedan.

1. Negativ kalibrator

Den negativa kalibratoren måste testas i tripliket vid varje testanalys. Medelvärdet för negativ kalibrator måste vara ≥ 10 och ≤ 250 RLU för att kunna fortsätta. Resultaten för negativ kalibrator ska visa en variationskoefficient (%CV) på ≤ 25 %. Om %CV är > 25 så ska värdet med ett RLU-värde som avviker mest från medelvärdet tas bort och de två kvarvarande värdena användas för att beräkna medelvärdet. Om skillnaden mellan medelvärdet och vart och ett av de två värdena är ≤ 25 % ska du gå vidare till steg 2. I övriga fall är verifikationen av analyskalibreringen ogiltig och testanalysen måste upprepas för alla patientprover. Följaktligen ska resultaten från patientproverna inte rapporteras.

2. Kalibrаторer

Kalibratorerna måste testas i tripliket vid varje analys. För CPC måste bägge kalibratorerna testas i tripliket. Resultaten för kalibratoren ska visa en variationskoefficient (%CV) på ≤ 15 %. För CPC, %CV för LRC, HRC samt LRC-HRC kombinerat måste visa %CV ≤ 15 %. Om %CV är > 15 ska kalibratorvärdet med ett RLU-värde som avviker mest från medelvärdet tas bort och de kvarvarande kalibratorvärdena användas för att beräkna medelvärdet. Endast ett LRC- och ett HRC-repliket får tas bort. Om %CV av kalibratorerna är ≤ 15 % ska du gå vidare till steg 3. I övriga fall är verifikationen av analyskalibreringen ogiltig och testanalysen måste upprepas för alla patientprover. Följaktligen ska resultaten från patientproverna inte rapporteras.

Verifieringen av analyskalibreringen som beskrivs ovan för kalibratorerna utförs automatiskt av analysprogramvaran för *digene*-analysen och skrivs ut i dataanalysrapporten. **Analysprotokollen för *digene*-analysen för HPV verifierar automatiskt att %CV för lågrisk- och högrisk-HPV-kalibratorerna är ≤ 15 %** Version v1.0.2 och v1.0.3 av analysprogramvaran för *digene*-analys ogiltigförklarar emellertid INTE analysen såvida inte %CV är > 25 % för kalibratorerna. Därför måste användaren manuellt verifiera att %CV som beräknats av analysprogramvaran för *digene*-analysen är ≤ 15 % and gå vidare enligt anvisningen för situation 1 i tabellen nedan. Om %CV för kalibratorreplikaten ligger mellan 15 och 25 ska du läsa anvisningarna för situation 2 eller 3 i tabellen nedan och vidta åtgärderna som beskrivs under "Användaråtgärder".

Situation	Rapporterat %CV för LRC- och/eller HRC-replikaten	Åtgärd som tagits av analysprogramvaran för <i>digene</i> -analysen	Användaråtgärder
1	≤ 15 %	Analysen rapporteras som "Giltig"	Resultaten kan rapporteras; ingen ytterligare åtgärd behövs.
2	Mellan 15 % och 25 %	Inga avvikande värden borttagna och analysen rapporteras som "Giltig"	Ta bort det RLU-värde för kalibratorerna som avviker mest från medelvärdet. Beräkna kalibratorns %CV igen med de två kvarvarande värdena. Om %CV för de kvarvarande RLU-värdena är > 15 % är analysen ogiltig. Resultaten får inte rapporteras. Om %CV för de kvarvarande RLU-värdena är ≤ 15 % ska analysens cutoff beräknas om och därefter ska RLU/cutoff-kvoten för varje prov som använder denna cutoff beräknas om. Dessa omräknade värden kan rapporteras.
3	Mellan 15 % och 25 %	Ett avvikande värde per kalibrator borttaget och analysen rapporteras som "Giltig"	Analysen är ogiltig. Resultaten får inte rapporteras. Analysen måste upprepas.
4	> 25 %	Ett avvikande värde borttaget och analysen rapporteras som "Ogiltig"	Analysen är ogiltig. Resultaten får inte rapporteras. Analysen måste upprepas.

För att manuellt beräkna %CV såsom anges i situation 2 ovan ska användaren dividera standardavvikelsen (STDEV) (n-1) för de kvarvarande replikatens RLU-värden med medelvärdet av de kvarvarande replikatens RLU-värden (LRC eller HRC eller bägge) och multiplicera detta resultat med 100.

För att beräkna %CV med Microsoft® Excel® (medföljer den tidigare versionen av analysprogramvaran för *digene*-analysen) kan användaren beräkna standardavvikelsen av kalibratorreplikat med formeln *STDEV* och bestämma kalibratorns medel-RLU med formeln *AVERAGE*. När dessa två värden har erhållits, dividera *STDEV* med *AVERAGE* och multiplicera resultatet med 100 för att erhålla %CV.

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

Om du har frågor som berör beräkning av %CV, beräkning av analysens cutoff eller beräkning av provernas RLU/cutoff, ska du ringa en lokal representant för QIAGEN.

Resultaten från de tre kliniska utvärderingarna som rör 152 analyskörningar utförda med *digene* HC2 HPV DNA-testet har sammanställts så att kalibratorns reproducerbarhet kan fastställas och frekvensen kan uppskattas där manuella beräkningar kan bli nödvändiga. Resultaten visade att medelvärdet av %CV för dessa 152 körningar var 8,1. Med hänsyn till alla tre kalibratorreplikaten per testkörning så observerades en reproducerbarhet på > 15 %CV för kalibratorn i endast 17 av 152 körningar (11,2 %) varav 10 av dessa 17 testkörningar resulterade i en %CV mellan 15–25 (situation 2). För de 17 testkörningarna som gav en %CV på > 15 så togs ett avvikande värde bort och %CV omräknades. Efter vidtagna användaråtgärder för situation 2 så förblev endast ett av testkörningens %CV på > 15 vilket gjorde testkörningen ogiltig. Vid beräkning av %CV för de kvarvarande 151 testkörningarna gav detta ett medelvärde för %CV på 6,0.

3. Resultaten för kalibrators medelvärde (LRC eller HRC och medelvärdet för negativ kalibrator (NC) används för att beräkna LRC/NC- eller HRC/NC-kvoten för varje prob. Tidigare versioner (V1.0.2 och V1.0.3) av protokoll för analysprogrammet för *digene*-analys beräknar inte de godtagbara intervallen korrekt. Dessa kvoter måste uppfylla de följande kriterierna för att verifiera analyskalibreringen innan provresultaten kan tolkas:

CPC-METOD	DUBBELPROBSMETOD
Analyskalibreringsverifiering Acceptabla intervall	Analyskalibreringsverifiering Acceptabla intervall
$2,0 \leq LRC\bar{x} / NC\bar{x} \leq 15$	$2,0 \leq LRC\bar{x} / NCLR\bar{x} \leq 15$ (LR-sidan)
$2,0 \leq HRC\bar{x} / NC\bar{x} \leq 15$	$2,0 \leq HRC\bar{x} / NCHR\bar{x} \leq 15$ (HR-sidan)
$2,0 \leq (LRC \text{ och } HRC) \bar{x} / NC\bar{x} \leq 15$	

4. Beräkna de lämpliga LRC \bar{x} /NC \bar{x} - eller HRC \bar{x} /NC \bar{x} -kvoterna för samtliga probuppsättningar. Gå till nästa steg om kvoterna är $\geq 2,0$ och ≤ 15 . Om någon av kvoterna är $< 2,0$ eller > 15 , **är analysen ogiltig för den specifika proben och måste upprepas**. Upprepa alla patientprover för den körningen.

Obs! Acceptabla intervall för negativa kalibrators och positiva kalibrators har endast fastställts för ett DML-instrument.

CUTOFF-BERÄKNING

När en analys har validerats enligt kriterierna angivna ovan så är cutoff-värdena för bestämningen av positiva prover såsom följer:

1) Metod för kombinerad probblandning: $\frac{(\text{LRC-replikat} + \text{HRC-replikat})}{\text{antal replikat}}$

2) Dubbelprobsmetod: Cutoff för lågrisk-HPV-prob = $\text{LRC}\bar{x}$
Cutoff för högrisk-HPV-prob = $\text{HRC}\bar{x}$

Exempel på cutoff-beräkning					
för:		Lågrisk- eller högrisk-HPV-prob Dubbelprobsmetod	Lågrisk- HPV-prob CPC-metod	Högrisk- HPV-prob CPC-metod	Kombinerad HPV-prob CPC-metod
	NC RLU- värden	LRC eller HRC RLU-värden	LRC RLU- värden	HRC RLU- värden	LRC och HRC RLU-värden
	97	312	330	235*	330
	101	335	305	295	305
	91	307	385	279	385
					295
					235*
					279
RLU- medelvärde	96	318	340	287*	318,8*
%CV	4,9	4,7	12,0	3,9*	13,0
$\text{LRC}\bar{x}/\text{NC}\bar{x}$	N/A	3,31	3,54	3,00	3,32

Den positiva kalibrators medelvärde för RLU bestämmer analysens cutoff-värde. Därför är det positiva cutoff-värdet ($\text{LRC}\bar{x}$) = 318.

* Medelvärdet av %CV för alla sex replikat var 16,8. Replikat med ett värde på 235 togs bort som ett avvikande värde. De kvarvarande replikatens %CV var 13,0 med ett medelvärde på 318,8. Initial %CV för HRC var 11,5.

RLU-värdena för alla prover ska omvandlas till en kvot med det tillämpliga cutoff-värdet. Till exempel ska alla analyser som testats med lågrisk-HPV-prob uttryckas som prov-RLU/lågrisk cutoff-värde. Samma sak kan göras med prover som testats med högrisk-HPV-prob eller CPC-prob.

Obs! RLU/CO-värden och positiva/negativa resultat för alla prover rapporteras i DML-instrumentets *dataanalysrapport*.

För användning av Rapid Capture System-instrumentet har programvaruprotokollet RCS HPV programmerats att tillämpa en kalibreringsjusteringsfaktor (CAF) på 0,8 på RLU-medelvärdet för giltiga positiva kalibratorreplikat. CAF krävs för att analysens prestandaegenskaper ska förbli likvärdiga med den manuella testproceduren. Den här ändringen gäller bara analyser utförda med Rapid Capture System-instrumentet. Det är således viktigt att välja rätt programprotokoll för varje specifik testmetod för att generera korrekta testresultat. RLU-värdena för alla prover ska omvandlas till en kvot med det tillämpliga cutoff-värdet (CO-värdet). Till exempel ska alla analyser uttryckas som prov-RLU/CO-värde.

KVALITETSKONTROLL

Kvalitetskontrollprover tillhandahålls med *digene* HC2 HPV DNA-testet. Anvisningar om hur du matar in lotnummer och utgångsdatum för kvalitetskontrollerna finns i den tillämpliga användarhandboken. Dessa kvalitetskontroller måste inkluderas i varje testkörning och RLU/CO för varje kvalitetskontroll måste ligga inom de följande godkända intervallen för att körningen ska anses giltig. **Om kvalitetskontrollerna inte ligger inom dessa intervall är analysen ogiltig och måste upprepas.**Således ska inga patientresultat rapporteras för någon körning som är ogiltig.

Kvalitet Kontroll	HPV-typ	Förväntat resultat (RLU/Cutoff-värde) Lågrisk-HPV-prob			
		Minimum	Maximum	Medelvärde	%CV
QC1-LR	Lågrisk (HPV 6)	2	8	5,0	25
QC2-HR	Högrisk (HPV 16)	0,001	0,999	0,5	25

Kvalitet Kontroll	HPV-typ	Förväntat resultat (RLU/Cutoff-värde) Högrisk-HPV-prob			
		Minimum	Maximum	Medelvärde	%CV
QC1-LR	Lågrisk (HPV 6)	0,001	0,999	0,5	25
QC2-HR	Högrisk (HPV 16)	2	8	5,0	25

Kvalitet Kontroll	HPV-typ	Förväntat resultat (RLU/Cutoff-värde) CPC HPV-prob			
		Minimum	Maximum	Medelvärde	%CV
QC1-LR	Lågrisk (HPV 6)	2	8	5,0	25
QC2-HR	Högrisk (HPV 16)	2	8	5,0	25

1. Materialet för kvalitetskontroll som medföljer satsen är klonade HPV-DNA-mål och härstammar inte från HPV av vildtyp. Detta är samma typ av material som används för de medföljande kalibratorerna med *digene* HC2 HPV DNA-testet.
2. Detta material för kvalitetskontroller fungerar inte som en lämplig kontroll för bearbetningen av PreservCyt-lösning eller SurePath-konserveringsvätska.
3. Kvalitetskontrollerna som medföljer detta testkit måste användas vid intern kvalitetskontroll. Ytterligare kvalitetskontroller kan testas enligt riktlinjer eller krav från lokala och/eller nationella föreskrifter eller ackrediterade organisationer.

TOLKNING AV PROVRESULTAT

Obs! Cutoff för *digene* HC2 HPV DNA-testet på 1 pg/ml är likvärdigt med 100 000 HPV-kopior/ml eller 5 000 HPV-kopior per analys.

1. STM-prover med en kvot på RLU/cutoff-värde som är $\geq 1,0$ **med enbart lågrisk-HPV-prob** betraktas som "positiva" för en eller flera av HPV-typerna 6, 11, 42, 43 eller 44.
2. STM-prover med en kvot på RLU/cutoff-värde som är $\geq 1,0$ **med enbart högrisk-HPV-prob** betraktas som "positiva" för en eller flera av HPV-typerna 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 och 68.
3. Om RLU/CO-kvoten är $\geq 1,0$ och $< 2,5$ vid testning av PreservCyt-prover, rekommenderar QIAGEN att provet omtestas. Om det första omtestningsresultatet är positivt ($\geq 1,0$ RLU/CO) kan provet rapporteras som positivt och då behöver ingen vidare omtestning göras. Om det första resultatet från omtestningen däremot är negativt ($< 1,0$), krävs ett andra omtest (ett tredje resultat) för att få ett slutligt resultat. Resultatet av den andra omtestningen ska betraktas som slutligt och rapporteras.
4. Om ett provs RLU/cutoff-kvot är nära men mindre än 1,0 och högrisk HPV-infektion misstänks ska alternativa testmetoder och/eller ny provtagning överväg.
5. STM-prover med en kvot på RLU/cutoff-värdet som är $\geq 1,0$ med både lågrisk-HPV-prob och högrisk-HPV-prob anses "Positiva" för en eller flera HPV-typer från varje probgrupp.
6. STM-prover med en kvot på RLU/cutoff-värdet som är $\geq 1,0$ för kombinerad probblandning anses positiva för en eller flera av HPV-typerna 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 och 68.
7. Prover med en kvot på RLU/cutoff-värdet som är $< 1,0$ för kombinerad probblandning eller både lågrisk-HPV-prob och högrisk-HPV-prob anses "Negativa" eller "Inget HPV DNA detekterat" för de 18 testade HPV-typerna. HPV DNA-sekvenser är antingen frånvarande eller så är HPV DNA-nivåerna under detektionsgränsen för analysen.

PRESTANDAEGENSKAPER

DATA SOM STÖDER INDIKATIONEN LÅGRISK OCH HÖGRISK HPV.

Klinisk screening av patienter med ASC-US Pap smear-resultat för att bestämma behovet av remiss till kolposkopi.

En studie med titeln "Utility of HPV DNA Testing for Triage of Women with Borderline Pap Smears" (Användbarheten av HPV-DNA-testning för triage av kvinnor med gränsresultat av pap smear) utfördes i USA år 1996 under ledning av Kaiser Foundation Research Institute (Kaiser-stiftelsens forskningsinstitut) och Kaiser Permanente Medical Group (Kaiser Permanentes medicinska grupp). Cervixprover för rutinmässigt pap smear och för *digene* HC2 HPV DNA-testet erhöles från kvinnor som besökte flera Kaiser-klinikmottagningar. Inledande pap smear utvärderades i enlighet med Bethesda-klassificeringen. När det gäller motsvarande terminologi för screening av cervixcancer inom EU, se European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening (Europeiska riktlinjer för kvalitetssäkring inom screening för cervixcancer)⁴⁰. Kvinnor (15 år och äldre) med ASC-US pap smear-resultat (med atypiska celler av obestämd signifikans) återkom för kolposkopi och biopsi. Med hjälp av kolposkopi erhöles histologiska prover som utvärderades av patolog och en initial diagnos gjordes. Varje histologiskt prov granskades också av en oberoende patolog och skillnader mellan den initiala bedömningen och den oberoende bedömningen avgjordes av en tredje patolog.

HPV DNA-testningen utfördes på ett initialt prov och endast högrisk-HPV-prober användes. HPV DNA-testningen utfördes med en prototyp av *digene* HC2 HPV DNA-testet som innehöll prover för 11 av de 13 HPV-typerna som inkluderades i högrisk-HPV-proben (utom HPV-typ 59 och 68). Denna skillnad förväntades inte resultera i en signifikant skillnad i kvalitetsprofil för de två analyserna.

HPV-testresultat och histologiska diagnoser erhöles från 885 kvinnor med ASC-US Pap smear. Testningen av de flesta av patienterna utfördes med prover som tagits i både STM och PreservCyt-lösning. På grund av likheterna mellan *digene* HC2 HPV DNA-testets prestandaegenskaper för STM och PreservCyt-medium, presenteras analysprestanda endast för PreservCyt-lösning.

Tabell 3 visar att bland de som hade en ASC-US-remiss till pap smear, är det negativa prediktiva värdet för *digene* HC2 HPV DNA-testet för att ha HSIL eller allvarligare sjukdom vid kolposkopi 99 %.

Tabell 3
Jämförelse mellan *digene* HC2 HPV DNA-test och konsensus-histologi
Population med ASC-US-remiss till pap smear
Kaiser-studie, prover i PreservCyt-lösning

	HSIL eller högre vid tidpunkten för kolposkopi			Totalsumma
		+	-	
Högrisk-HPV	+	66	317	383
	-	5	497	502
	Totalsumma	71	814	885

Känslighet [TP/(TP+FN)] = 93,0 % (66/71)
95 % KI = 84,3 till 97,7
Specificitet [TN/(TN+FP)] = 61,1 % (497/814)
95 % KI = 57,7 till 64,4
Sjukdomsprevalens = 8,0 % (71/885)
Positivt prediktivt analysvärde = 17,2 % (66/383)
Negativt prediktivt analysvärde = 99,0 % (497/502)

Tabell 4 visar teoretiskt positiva och negativa prediktiva värden baserade på olika prevalenser för en initial ASC-US som visats vara HSIL eller högre baserat på resultat i högrisk-HPV-prob.

Tabell 4
Teoretiskt positiva och negativa prediktiva värden
Högrisk-HPV-prob
ASC-US Pap Smear-resultat

Teoretisk prevalens för HSIL	Initiala ASC-US Pap Smear-resultat	
	Positivt prediktivt analysvärde	Negativt prediktivt analysvärde
5	11,2	99,4
10	21,0	98,7
15	29,7	98,0
20	37,4	97,2
25	44,3	96,3
30	50,6	95,3

Tabell 5 illustrerar variationen mellan olika åldersgrupper som ingick i studien:

Tabell 5
Kaiser-studiedata
***digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testets prestanda jämfört med konsensus-histologi**
Resultat (HSIL)
Åldersspecifika egenskaper

	Ålder < 30	Ålder 30–39	Ålder > 39
n	287	233	365
Prevalens av sjukdom (%)	12,2	11,2	2,7
Känslighet (%)	100,00 (35/35)	88,46 (23/26)	80,00 (8/10)
95 % konfidensintervall	90,0-100	69,9-97,6	44,4-97,5
Specificitet (%)	31,4 (79/252)	66,2 (137/207)	79,15 (281/355)
95 % konfidensintervall	25,7-37,5	59,3-72,6	74,6-83,3
Negativt prediktivt värde (%)	100 (79/79)	97,86 (137/140)	99,29 (281/283)
Positivt prediktivt värde (%)	16,83 (35/208)	24,73 (23/93)	9,76 (8/82)

Klinisk känslighet och specificitet för bestämning av risken för höggradig sjukdom hos kvinnor med LSIL eller HSIL Pap Smears

En klinisk multicenterstudie där *digene* HC2 HPV DNA-testet användes, utfördes med prover som tagits från flera stora sjukhus och kolposkopikliniker (3 kliniker) med hög prevalens av cervixsjukdom och HPV i västra och södra USA. HPV-testning utfördes på tre kliniker som inte var anknutna till kolposkopiklinikerna från vilka proverna erhöles. Populationen för denna kliniska studie utgjordes av kvinnor som antingen fått diagnosen LSIL eller HSIL baserat på ett färskt pap smear och remitterats till uppföljande kolposkopi. Av 702 rekryterade patienter hade 327 pap smear-resultat som översteg ASC-US och hade adekvat information tillgänglig; 96 av dessa hade ett slutligt sjukdomsstatus på HSIL eller allvarligare. Exfolierade cervixcellprover erhöles med antingen *digene* HC2 DNA Collection Device för att sedan placeras i STM eller med en provtagningsborste som sedan sköljdes i PreservCyt-lösning. Prover togs vid tiden för kolposkopi. Prover testades med *digene* HC2 HPV DNA-testet och resultaten jämfördes med sjukdomsstatus som fastställts för varje patient. Sjukdomsstatus baserades på resultaten från den histologiska utvärderingen, men när histologin var negativ eller när ett histologiresultat saknades, fastställdes dock sjukdomsstatus med cytologi vid tiden för kolposkopiundersökningen (se *tabell 6*). *digene* HC2 HPV DNA-testet utfördes vid tre stora storstadskliniker utan anknytning till klinikerna där man samlade in proverna vid kolposkopi. Cytologi utfördes vid ett referenspatologilaboratorium, och histologin utfördes vid institutionerna som utförde kolposkopin. Testresultat jämfördes med

sjukdomsstatus för att bedöma testets känslighet, specificitet samt negativa och positiva prediktiva värden för detektion av höggradig cervikal neoplasi. På grund av likheterna mellan *digene* HC2 HPV DNA-testets prestandaegenskaper för STM och PreservCyt-medium, presenteras analysprestanda endast för PreservCyt.

Ingen skillnad observerades mellan högrisk-HPV-probresultat från STM-prover och PreservCyt-lösningssprover. Följande tabell visar resultaten för högrisk-HPV-proben i denna population:

Tabell 6
Algoritm för patienters sjukdomsstatus

Cytologieresultat	Histologieresultat	Sjukdomsstatus
NEG	NEG eller Ej utfört*	NEG
LSIL	NEG	LSIL
HSIL	NEG	HSIL
Cancer	NEG	HSIL+
NEG	LSIL	LSIL
LSIL	Ej utfört*	LSIL
LSIL	LSIL	LSIL
HSIL	LSIL	LSIL
Cancer	LSIL	LSIL
NEG	HSIL	HSIL
LSIL	HSIL	HSIL
HSIL	HSIL	HSIL
HSIL	Ej utfört*	HSIL
Cancer	HSIL	HSIL
NEG	Cancer	HSIL+
LSIL	Cancer	HSIL+
HSIL	Cancer	HSIL+
Cancer	Ej utfört*	HSIL+
Cancer	Cancer	HSIL+

* Biopsi och/eller endocervikal skrapning (ECC) utfördes inte eftersom inga avvikelser observerades vid kolposkopi eller histologieresultatet inte var tillgängligt.

Tabell 7 och 8 innehåller prestandan för *digene* HC2 HPV DNA-testet som fastställdes med användning av 327 PreservCyt-prover, av vilka 96 togs från kvinnor som fått diagnosen höggradig cervixsjukdom. Jämförelserna gjordes mellan alla studiepatienter med avvikande resultat på remiss-pap smear. Jämförelserna visas för PreservCyt-proverna som testats med högrisk-HPV-prob.

Tabell 7
Resultat av högrisk-HPV-prob

Resultat av remiss-pap smear	Slutgiltig sjukdomsstatus						Totalsumma
	HSIL		LSIL		Negativt		
	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	
Högrisk-HPV-resultat							
LSIL	44	4	78	33	28	37	224
HSIL	45	3	29	14	5	7	103
Totalsumma	89	7	107	47	33	44	327
	96		154		77		

Tabell 8 visar att *digene* HC2 HPV DNA-testet som använder högrisk-HPV-prob uppvisade cirka 93 % total känslighet för identifiering av kvinnor med höggradig neoplas i en population som remitterats till kolposkopi på basis av en pap smear-diagnos på LSIL, HSIL eller motsvarande. Testet uppvisade dessutom ett negativt prediktivt värde på nästan 93 % i denna population.

Tabell 8
Prestandaegenskaper
digene HC2 High-Risk HPV DNA-test bland patienter som har en remiss
 Pap smear med LSIL eller högre och med HSIL som slutgiltig sjukdomsstatus

Resultat av högrisk-HPV-prob	Remitterade Pap LSIL eller HSIL → HSIL-sjukdom			Totalsumma
		+	-	
+		89	140	229
-		7	91	98
Totalsumma		96	231	327

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

95 % KI = 85,6 till 97,0

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

95 % KI = 33,1 till 46,0

Sjukdomsprevalens för remitterad LSIL till slutgiltig HSIL = 21,4 %

Sjukdomsprevalens för remitterad HSIL till slutgiltig HSIL = 46,6 %

Totalt positivt prediktivt värde = 38,9 % (89/229)

Totalt negativt prediktivt värde = 92,8 % (91/98)

Medan specificiteten för *digene* HC2 HPV DNA-testet verkade vara något lågt, väntas inget strikt samband mellan frånvaro av neoplas och ett negativt HPV-resultat. HPV-DNA kan vara närvarande hos kvinnor som inte har utvecklat en högre grad av sjukdom. Faktum är, att när HPV-testning med PCR (polymeraskedjereaktion) (en analys som endast används i forskning) utfördes på prover med positiva HPV-resultat och vilkas motsvarande sjukdomsstatus var lägre än låggradig neoplas, var nästan 75 % positiva.

Tabell 9 indikerar teoretiskt positiva och negativa prediktiva värden med högrisk-HPV-proben när initiala LSIL eller HSIL vid kolposkopi befanns vara HSIL eller svårare sjukdom.

Tabell 9
Teoretiskt positiva och negativa prediktiva värden
 Högrisk-HPV-prob
 Initiala LSIL eller HSIL pap smear-resultat

Teoretisk prevalens för HSIL	Initiala LSIL eller HSIL pap smear-resultat	
	Analysens positivt prediktiva värde	Analysens negativt prediktiva värde
5	7,4	99,0
10	14,5	97,9
15	21,2	96,8
20	27,6	95,5
25	33,7	94,1
30	39,6	92,6
35	45,1	90,9
40	50,4	89,0
45	55,5	86,8
50	60,4	84,3

DATA SOM STÖDER INDIKATIONEN PRIMÄR SCREENING FÖR HÖGRISK-HPV

Klinisk prestanda vid screening av patienter med normala pap smear-resultat för att underlätta riskbedömningen för patienthantering

Resultaten av åtta oberoende kliniska studier som utförts av framstående medicinska, akademiska och myndighetsinstitutioner vid kliniker i USA och utomlands beskrivs nedan. I studierna användes de vedertagna pap-metoderna i de länder där studien utfördes. I alla utom två fall användes Bethesda-systemet för att tolka pap-resultaten. Dessutom diagnostiserades höggradig cervixsjukdom genom användningen av kolposkopistyrd biopsi för varje studie. I dessa studier bedömdes den kliniska användbarheten av *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-test jämfört med pap smear för äldre kvinnor (i allmänhet över 30–35 år). I alla utom en studie utfördes även prospektiv HPV-testning med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet.

Studierna var screeningstudier av ett tvärsnitt av den allmänna populationen med användning av *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet, såvida inget annat anges nedan. Såsom angetts utfördes två av åtta screeningstudier i USA, två i Europa, två i Latinamerika, en i Afrika och en i Asien.

Prestandan för *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet som observerades från sex tvärsnittsstudier sammanfattas, i tabell 10 och 11, för kvinnor i åldern 30 år och äldre och diagnostiserade med histologiskt bekräftad höggradig cervikal neoplasi (definieras som CIN3 eller allvarligare).

Tabell 10
Prestandauppskattningar av *Digene* HC2 High-Risk HPV DNA-test
Känslighet och specificitet

Population	n	Känslighet (%)			Specificitet (%)		
		PAP enbart	HPV enbart	HPV + PAP	PAP enbart	HPV enbart	HPV + PAP
Västeuropa 1	7592	51,6 (14/27)	96,3 (26/27)	100 (27/27)	98,5 (7453/7565)	96,2 (275/7565)	95,1 (7193/7565)
		95 % KI	32,0-71,3	81,0-99,9	87,2-100	98,2- 98,8	95,7-96,6
Latinamerika 1	6115	58,4 (45/77)	94,8 (73/77)	97,4 (75/77)	98,7 (5962/6038)	93,9 (5669/6038)	93,4 (5637/6038)
		95 % KI	46,68-69,6	87,2-98,6	90,9-99,7	98,4-99,0	93,3-94,5
Latinamerika 2 [†]	6176	77,9 (53/68)	89,7 (61/68)	94,1 (64/68)	94,1 (5745/6108)	94,0 (5742/6108)	89,9 (5490/6108)
		95 % KI	66,2-87,1	79,9-95,8	85,6-98,4	93,4-94,6	93,4-94,6
Afrika	2925	84,1 (90/107)	89,7 (96/107)	92,5 (99/107)	86,4 (2436/2818)	80,0 (2253/2818)	76,4 (2152/2818)
		95 % KI	75,8-90,5	82,4-94,8	85,8-96,7	85,1-87,7	78,4-81,4
Asien	1936	97,6 (41/42)	100 (42/42)	100 (42/42)	76,3 (1445/1894)	83,0 (1572/1894)	68,0 (1287/1894)
		95 % KI	87,4-99,9	91,6-100,0	91,6-100,0	74,3-78,2	81,2-85,0
USA 1	1040	50,0 (1/2)	100 (2/2)	100 (2/2)	97,6 (1013/1038)	96,2 (999/1038)	95,5 (991/1038)
		95 % KI	1,26-98,7	15,8-100,0	15,8-100,0	96,5-98,4	94,9-97,3

[†] HC2-data om sådana var tillgängliga, i annat fall användes HCS-data; kombinerade data.

Tabell 11
Prestandauppskattningar av *Digene* HC2 High-Risk HPV DNA-test
Positivt och negativt prediktivt värde

Population	n		Prevalens (%)	Positivt prediktivt värde (%)			Negativt prediktivt värde (%)		
			CIN 3	PAP enbart	HPV enbart	HPV + PAP	PAP enbart	HPV enbart	HPV + PAP
Västeuropa 1	7592		0,36 (27/7592)	11,1 (14/126)	8,23 (26/316)	6,77 (27/399)	99,83 (7453/7466)	99,99 (7275/7276)	100,0 (7193/7193)
		95 % KI	0,23-0,52	6,21-17,9	5,45-11,8	4,51-9,69	99,70-99,91	99,92-100,0	99,95-100,0
Latinamerika 1	6115		1,26 (77/6115)	37,2 (45/121)	16,5 (73/442)	15,8 (75/476)	99,47 (5962/5994)	99,93 (5669/5673)	99,96 (5637/5639)
		95 % KI	0,99-1,57	28,6-46,4	13,2-20,3	12,6-19,4	99,25-99,63	99,82-99,98	99,87-100,0
Latinamerika 2†	6176		1,10 (68/6176)	12,7 (53/416)	14,3 (61/427)	9,4 (64/682)	99,74 (5745/5760)	99,88 (5742/5749)	99,93 (5490/5494)
		95 % KI	0,86-1,39	9,69-16,3	11,1-18,0	7,30-11,8	99,57-99,85	99,75-99,95	99,81-99,98
Afrika	2925		3,66 (107/2925)	19,1 (90/472)	14,5 (96/661)	12,9 (99/765)	99,31 (2436/2453)	99,51 (2253/2264)	99,63 (2152/2160)
		95 % KI	3,01-4,40	15,6-22,9	11,9-17,4	10,6-15,5	98,89-99,60	99,13-99,76	99,27-99,84
Asien	1936		2,17 (42/1936)	8,37 (41/490)	11,5 (42/364)	6,47 (42/649)	99,93 (1445/1446)	100,0 (1572/1572)	100,0 (1287/1287)
		95 % KI	1,57-2,92	6,07-11,2	8,44-15,3	4,70-8,65	99,62-100,0	99,77-100,0	99,71-100,0
USA 1	1040		0,19 (2/1040)	3,85 (1/26)	4,88 (2/41)	4,08 (2/49)	99,90 (1013/1014)	100,0 (999/999)	100,0 (991/991)
		95 % KI	0,02-0,69	0,10-19,6	0,60-16,5	0,50-14,0	99,45-100,0	99,63-100,0	99,63-100,0

† HC2-data om sådana var tillgängliga, i annat fall användes HCS-data; kombinerade data.

I samtliga studier finns en enhetlig och ofta mycket signifikant förbättring i känslighet för *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet jämfört med enbart pap. Liksom för känslighet överskrider det negativa prediktiva värdet (NPV) för HPV värdet för enbart pap i samtliga fall, och närmar sig 100 %. Detta NPV visar den höga sannolikheten för frånvaro av höggradig cervixsjukdom eller cancer hos cytologiskt normala kvinnor som inte har HPV-infektion.

Även om specificiteten för *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet är lägre än för enbart pap, har en analys av sannolikhetskvoterna visat att den observerade minskningen av specificitet inte är tillräckligt signifikant för att påverka den kliniska nyttan med att använda testet för att identifiera kvinnor med föga eller ingen risk för att ha eller utveckla cervixsjukdom. Icke desto mindre är det viktigt att beslutet att remittera en patient till kolposkopi baseras på all klinisk information och riskinformation och patienthistorik som är tillgänglig för läkaren. Viktiga variabler innefattar historiken för HPV-infektion och/eller avvikande pap smears, ålder vid första samlaget, antalet sexpartner och samtidiga sexuellt överförda sjukdomar.^{27,28}

Även om prevalensen av höggradig sjukdom inte signifikant varierar mellan de studier från vilka prestandan beräknades kan prevalensen av HPV-infektion i en population påverka prestanda, och varierar vanligtvis med patientpopulationen. Dessutom har det visat sig att prevalensen för HPV-infektion sjunker dramatiskt med stigande ålder.^{28, 30-37, 41} Positiva prediktiva värden minskar när man testar populationer med låg prevalens eller individer med föga risk för infektion.

Longitudinella analyser utfördes med användning av resultaten av två studier; en utfördes i USA av National Cancer Institute (NCI, nationella cancerinstitutet) i Portland, Oregon, och den andra utfördes i Frankrike vid Laboratoire Pol Bouin C.H.U. de Reims (Pol Bouin-laboratoriet, universitetskliniken i Reims). Dessa longitudinella analyser gjordes för att visa att pap-negativa/HPV-negativa patienter har en lägre risk att ha en cervixsjukdom jämfört med traditionellt definierade lågrisk-kvinnor vars HPV-status är okänd och jämfört med pap-negativa/HPV-positiva patienter.

Resultaten av dessa longitudinella analyser visas i tabell 12 och 13 nedan.

Tabell 12
Resultatsammandrag: Studier från NCI och Frankrike
Relativ risk för höggradig sjukdom

Studiegrupp	Ålder	Lågrisk-klassificering	n	Fall av CIN 3+	Frekvens (per 100 patientår)	Relativ risk (95 % KI)
NCI	30 och äldre	Pap-normal, HPV-negativ	12 054	28	0,043	0,897 (0,596, 1,348)
		Efterföljande normala pap*	9 429	19	0,048	1,000
	Alla	Pap-normal, HPV-negativ	17 594	48	0,056	0,678 (0,514, 0,894)
		Efterföljande normala pap*	13 392	44	0,082	1,000
Frankrike	30 och äldre	Pap-normal, HPV-negativ	1 690	3	0,084	0,849 (0,307, 2,35)
		Efterföljande normala pap*	2 026	4	0,099	1,000
	Alla	Pap-normal, HPV-negativ	2 180	3	0,066	0,491 (0,221, 1,09)
		Efterföljande normala pap*	2 650	7	0,136	1,000

*Tre normala årliga pap-test under cirka 2 år

Tabell 13
Resultatsammandrag: Studier från NCI och Frankrike
Sjukdomsfrekvenser stratifierade per HPV-status vid baslinjen

Studiegrupp	Ålder	Status vid baslinje	n	Fall av CIN 3+	Frekvens (per 100 patientår)	Relativ risk (95 % KI)
NCI	30 och äldre	Pap-normal, HPV-positiv	1 078	24	0,451	10,50 (6,13, 18,0)
		Pap-normal, HPV-negativ	12 054	28	0,043	1,00
	Alla	Pap-normal, HPV-positiv	2 561	63	0,096	10,64 (7,33–15,5)
		Pap-normal, HPV-negativ	17 594	48	0,056	1,00
Frankrike	30 och äldre	Pap-normal, HPV-positiv	419	14	2,346	27,3 (8,41, 88,3)
		Pap-normal, HPV-negativ	1696	3	0,084	1,00
	Alla	Pap-normal, HPV-positiv	619	22	2,520	37,0 (11,8, 116)
		Pap-normal, HPV-negativ	2180	3	0,066	1,00

Den kliniska användbarheten av HPV-testresultatet påvisas ytterligare av den ökade risken för cervixsjukdom hos HPV-positiva kvinnor jämfört med HPV-negativa kvinnor.

ANALYTISK KÄNSLIGHET

En icke-klinisk panel av klonat HPV-plasmid-DNA testades för att fastställa om var och en av de 18 HPV-typerna kan detekteras med *digene* HC2 HPV DNA-testet och för att fastställa analysens känslighet för var och en av HPV-typerna. Varje koncentration av mål-HPV (100 pg/ml, 10 pg/ml, 2,5 pg/ml, 1 pg/ml, 0,5 pg/ml och 0,2 pg/ml) för var och en av de 18 HPV DNA-typerna (6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 och 68) kördes i triplikat med lågrisk-HPV-prob eller högrisk-HPV-prob, såsom lämpligt. Medelsignal i RLU för varje koncentration av varje HPV-typ beräknades och jämfördes med den positiva kalibratorm för den lämpliga sidan av analysen.

Detektionsgränsen för varje HPV-typ i STM visas i tabell 14. Detektionsgränserna varierade från 0,62 pg/ml till 1,39 pg/ml beroende på den testade HPV-typen. Alla HPV-typer kunde detekteras vid en beräknad koncentration av 1,09 pg av HPV DNA-mål per 1 ml prover i STM-prover. Medelvärdet för detektionsgränsen för alla 18 HPV DNA-typerna var 1,09 pg/ml med en standardavvikelse på 0,05.

Tabell 14
Sammanfattning av detekterbara gränser i *digene* HC2 HPV DNA-test
för känsligheten av varje HPV DNA-typ i STM

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

PRESTANDA FÖR KOMBINERAD PROBLANDNING (CPC)

Samma icke-kliniska HPV-plasmid-DNA-panel som beskrivs ovan testades för att fastställa den analytiska känsligheten för var och en av de 18 HPV-typerna i *digene* HC2 HPV DNA-testet efter protokollet för den kombinerade probblandningen (CPC) som beskrivs i den här bilagan. CPC-protokollets analytiska känslighet varierade från 0,58 pg/ml till 1,39 pg/ml och alla HPV-typer kunde detekteras vid en beräknad nivå på 0,95 pg/ml av HPV DNA-mål per 1 ml prov. Medelvärdet för detektionsgränsen för alla 18 HPV DNA-typerna var 0,95 pg/ml med en standardavvikelse på 0,07. Denna känslighet är ekvivalent med den analytiska känslighet som finns i dubbelprobsmetoden i *digene* HC2 HPV DNA-testet.

EKVIVALENS MELLAN STM- OCH PRESERV CYT-LÖSNINGSPROVER

Ekvivalens mellan STM- och PreservCyt-lösningssprover undersöktes för likvärdig utvinning av HPV 18-DNA från cirka 10^6 positiva HeLa-celler som innehöll integrerade HPV 18-genom som tillsattes till STM och till en pool med negativa celler i PreservCyt-lösning. Varje provtyp bearbetades enligt deras respektive Berednings-/denatureringsprocedurer så som beskrivs i bruksanvisningarna, och testades med *digene* HC2 HPV DNA-testet genom att använda högrisk-HPV-prob. Resultaten visade att utvinning av HPV 18-DNA från humana cancerceller är ekvivalent för de två medierna och att beredningen av PreservCyt-lösningen inte påverkar den analytiska känsligheten för *digene* HC2 HPV DNA-testet.

KORRELATION MELLAN RESULTAT AV SUREPATH-PROVER OCH STM-PROVER I EN KLINISK POPULATION

En klinisk utvärdering i två faser utfördes på 6 provtagningskliniker och 3 testkliniker inom USA. Patienter som besökte kliniker för sexuellt överförbara sjukdomar, kliniker för obstetrik/gynekologi, kliniker för kolposkopi, sjukhus eller familjeplaneringskliniker var kvalificerade för rekrytering enligt i förväg fastställda inklusions- och exklusionskriterier. Till genomförbarhetsfasen, avsedd att fastställa ett lämpligt cutoff-värde för *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-analysen för användning med SurePath-prover, rekryterades cirka 400 patienter. Den kliniska valideringsfasen, till vilken cirka 1 500 patienter rekryterades för att validera det valda cutoff-värdet för analysen, började efter det att en interimistisk analys av

genomförbarheten visat att ett cutoff-värde av analysen på 1,0 RLU/CO med användning av SurePath-prover producerade acceptabel överensstämmelse med STM-provresultat.

I båda utvärderingsfaserna erhöles parade SurePath- och STM-cervixprover från varje deltagande kvinna. SurePath-provet skickades sedan till ett cytologilaboratorium för objektglasberedning. Efter cytologisk beredning testades det återstående SurePath-provet och det motsvarande STM-provet med *digene* HC2 High-Risk HPV DNA-testet med ett cutoff-värde av analysen på 1,0 RLU/CO.

Tabell 15 ger korrelationen mellan SurePath-resultat och parade STM-prov som observeras i de slutliga resultaten som passar för dataanalys från den totala deltagande populationen.

Tabell 15
Överensstämmelse mellan SurePath-resultat och STM
(alla åldrar och cytologisk klassifikation)
(n = 1490)

Positiv överensstämmelse % 95 % KI (n/N)		Negativ överensstämmelse % 95 % KI (n/N)	
Alla positiva	Högt positivt subset (RLU/CO ≥ 2,5)	Alla negativa	Lågt negativt subset RLU/CO (< 0,80)
93,5 90,7, 95,6 (401/429)	96,4 94,1, 98,0 (378/392)	95,3 93,8, 96,5 (1011/1061)	96,0 94,6, 97,1 (1002/1044)

Dessa resultat förutspår att den relativa analyskänsligheten och -specificiteten för användning av SurePath-prover har en hög korrelation med resultaten som erhålls vid användning av STM-provtypen vilket beläggs genom den lägre gränsen för det 95-procentiga konfidensintervallet för både positiv och negativ överensstämmelse.

REPRODUCERBARHET

En multicenter-reproducerbarhetsstudie utfördes för att fastställa reproducerbarheten mellan dagar, mellan laboratorier och totalt för *digene* HC2 HPV DNA-testet med användning av en panel av HPV-DNA-mål och HPV-positiva och HPV-negativa kliniska prover.

Tre externa laboratorier utförde testningen med samma lot av *digene* HC2 HPV DNA Test-kit på 3 olika dagar med en identisk reproducerbarhetspanel. Reproducerbarhetspanelen innehöll följande prover: 12 pooler med denaturerade, kliniska prover i STM; tre pooler med odenaturerade, kliniska prover i PreservCyt-lösning och negativa och positiva kalibratorer för lågrisk och högrisk med koncentrationer på 0,5 pg/ml, 1 pg/ml, 2,5 pg/ml, 5 pg/ml och 10 pg/ml. Alla panelprover testades varje dag i triplikat med både högrisk-HPV-prob- och CPC-metoder. Resultaten visas i tabell 16.

Tabell 16
Sammanfattning av den övergripande statistiken för
multicenter-reproducerbarhet av *digene* HC2 HPV DNA-test

Statistiskt mått	HÖGRISK-HPV-PROB	Kombinerad probblandning (CPC)	Kombinerade resultat för högrisk-HPV-prob och CPC^a
Andelen förväntade positiva med ett observerat positivt resultat	100 % (99,0–100,0)	99,8 % (98,92–100,0)	99,9 % (99,38–100,0)
Andelen förväntade negativa med ett observerat negativt resultat	99,0 % (97,49-99,73)	98,9 % (96,79-99,77)	99,0 % (97,88-99,58)
Överensstämmelse	99,5 % (98,70-99,86)	99,5 % (98,70-99,86)	99,5 % (99,0-99,78)
Kappa	0,990	0,989	0,990

^aNummer inom parentes indikerar 95 % konfidensintervall. Totala data är en kombination av alla körningar vid alla laboratorier.

Detta indikerar att reproducerbarheten för *digene* HC2 HPV DNA-testet med kliniska prover insamlade med STM är mycket god.

KORSREAKTIVITET

KORSREAKTIVITETSPANEL

Ett batteri av bakterier, virus och plasmider som förekommer allmänt i kvinnans anogenitala kanal, liksom en samling av kutanotropa HPV-typer för vilka det fanns tillgängliga kloner, analyserades för fastställande av om det skulle uppstå en korsreaktivitet med HPV-prober som används i *digene* HC2 HPV DNA-testet. Alla mikroorganismer analyserades vid koncentrationer på 1×10^5 och 1×10^7 organismer per ml. Renade DNA av virus och plasmider analyserades vid en koncentration på 4 ng/ml.

De bakterier som testades anges nedan. Alla bakterier som har testats negativt i *digene* HC2 HPV DNA-testet.

<i>Acinetobacter anitratus</i>	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>
<i>Acinetobacter lwoffii</i> (ATCC 17908)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (ATCC 19424)
<i>Bacteroides fragilis</i> (ATCC 25285)	<i>Neisseria lactamica</i> (NRL 2118)
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	<i>Neisseria meningitidis</i> (ATCC 13077)
<i>Candida albicans</i> (ATCC 14053 or 10231)	<i>Neisseria sicca</i> (ATCC 29256)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 21117, 8427, 33420)
<i>Escherichia coli</i> (HB101)*	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (Cowan-stam)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Streptococcus faecalis</i> (ATCC 14508)
<i>Haemophilus ducreyi</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC27762)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Treponema pallidum</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
<i>Mobiluncus curtisii</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
<i>Mobiluncus mulieris</i>	
<i>Mycoplasma hominis</i>	

* Både *E. coli*-stammen som användes för att odla plasmider (HB101) och ett kliniskt isolat av *E. coli* analyserades.

Nedan anges de virus- eller plasmid-DNA eller humanserum som testades:

Adenovirus 2	Humant papillomavirus typ 1
Cytomegalovirus	Humant papillomavirus typ 2
Epstein-Barr-virus	Humant papillomavirus typ 3
Hepatit B-tytantigenpositivt serum	Humant papillomavirus typ 4
Herpes Simplex I	Humant papillomavirus typ 5
Herpes Simplex II	Humant papillomavirus typ 8
Humant immunbristvirus (HIV, RT DNA)	Humant papillomavirus typ 13
Simian-virus typ 40 (SV40)	Humant papillomavirus typ 30
	pBR322

De enda virus eller plasmider som visade korsreaktivitet i *digene* HC2 HPV DNA-testet var HPV typ 13 och plasmid pBR322. HPV 13 DNA reagerade endast med lågrisk-HPV-prob. HPV 13 upptäcks ofta i lesioner på läpparna hos vissa etniska grupper, men har inte upptäckts i anogenitalkanalerna.²⁹ Korsreaktivitet som observeras mellan HPV 13 och *digene* HC2 HPV DNA-testets lågrisk-HPV-prob förväntas därför inte orsaka ett kliniskt förvirrande resultat för anogenitala prover. Korsreaktivitet mellan pBR322 och *digene* HC2 HPV DNA-testets lågrisk- och högrisk-HPV-prober är inte oväntad eftersom det är svårt att avlägsna allt vektor pBR322-DNA vid isolering av HPV-insatsen. Förekomsten av pBR322-homologa sekvenser har rapporterats i humana genitalprover och falskt positiva resultat skulle kunna förekomma i närvaro av höga nivåer av bakteriell plasmid.²⁹ 8 kliniska prover som testades positiva med *digene* HC2 HPV DNA-testets lågrisk- och högrisk-HPV-prober visade emellertid inga positiva resultat på grund av pBR322 när de testades med en pBR322-prob. Sannolikheten för ett falskt positivt resultat med

digene HC2 HPV DNA-testet på grund av homologa pBR322-sekvenser i kliniska prover förefaller alltså vara låg.

KORSHYBRIDISERING

Var och en av de 18 HPV-typerna testades med både lågrisk- och högrisk-HPV-prober med HPV DNA-koncentrationer på 4 ng/ml. Alla mål-HPV förväntades vara positiva med lämplig probgrupp medan inget av proverna förväntades vara positiva med den motsatta probgruppen. Den här studien visade att korshybridisering sker i liten utsträckning mellan HPV-typerna 6 och 42 (lågrisk HPV-typer) och högriskprobgruppen (högrisk-HPV-prob). Prover med höga koncentrationer (4 ng/ml eller högre) av HPV 6 eller HPV 42 DNA kan vara positiva med bägge probgrupperna. Den kliniska betydelsen av detta är att patienter med 4 ng/ml eller högre av HPV 6 eller HPV 42 DNA kanske remitteras till kolposkopi.

Dessutom har det visats att högrisk-HPV-proben korsreagerar med HPV-typ 40, 53 och 66. Dessa typer är sällsynta, och det finns inte tillräcklig evidens för att fastställa den exakta korrelationen mellan infektion med dessa typer och utvecklingen av höggradig sjukdom³⁸. Patienter med prover som innehåller höga nivåer av dessa HPV DNA-typer kan felaktigt bli remitterade till kolposkopi. Det finns även rapporter i litteraturen om att komplexa prober som är likartade med de som används i detta test kan orsaka falskt positiva resultat på grund av korshybridisering med HPV-typ 11, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 eller MM9.³⁹ Även om flera av dessa HPV-typer är sällsynta eller nya typer som sällan träffas på vid höggradig sjukdom, kan patienter vilkas prover innehåller höga nivåer av dessa HPV-DNA-typer felaktigt bli remitterade till kolposkopi.

EFFEKT AV BLOD OCH ANDRA SUBSTANSER PÅ STM-PROVER

Effekten av blod och andra potentiellt störande definierade eller odefinierade substanser utvärderades i *digene* HC2 HPV DNA-testet. Helblod, slidsköljningsvätska, svampdödande kräm och spermiedödande medel (substanser som ofta återfinns i cervixprover) tillsattes till STM-negativa och -positiva prover (kliniska provpooler och icke-kliniska prover) vid koncentrationer som kan finnas i cervixprover. Inga falskt positiva resultat observerades med någon av de fyra substanserna vid någon koncentration. Emellertid kan falskt negativa resultat rapporteras för kliniska prover med HPV DNA-koncentrationer nära analysens positiva cutoff (1 pg/ml) om höga koncentrationer av svampdödande kräm eller preventivmedelskräm är närvarande. Det är emellertid osannolikt att ett kliniskt prov består nästan helt och hållet av en av dessa substanser eftersom cervix rengörs rutinmässigt innan provtagning för pap smear och HPV-testning görs.

EFFEKT AV BLOD OCH ANDRA SUBSTANSER PÅ PRESERV CYT-LÖSNINGS-PROVER

Effekten av blod och andra potentiellt störande definierade eller odefinierade substanser som potentiellt finns i kliniska prover i PreservCyt-lösning utvärderades i *digene* HC2 HPV DNA-testet. Helblod, slidsköljningsvätska, svampdödande kräm och spermiedödande medel (substanser som ofta återfinns i cervixprover) tillsattes till pooler med PreservCyt-negativa och -positiva kliniska prover vid koncentrationer som kan finnas i cervixprover. Inga falskt positiva eller falskt negativa resultat observerades med någon av de fyra substanserna vid någon koncentration. Dessutom hämmas inte detektionen av HPV-DNA med *digene* HC2 HPV DNA-testet av substanser som ingår naturligt i vissa kliniska prover.

REPRODUCERBARHETEN FÖR *digene* HC2 HPV DNA-TESTET MED KLINISKA PROVER INSAMLADE I STM

Reproducerbarheten för *digene* HC2 HPV DNA-testet med kliniska prover insamlade i STM fastställdes i en studie med 20 kliniska pooler (10 positiva och 10 negativa) beredda genom att kombinera tidigare denaturerade och testade cervixborstprover insamlade med STM. Prover testades i replikat om fyra på var och en av fem dagar för totalt 20 replikat per prov. Testning utfördes med metoden för kombinerad probblandning. Medelvärden, standardavvikelse och 95 % konfidensintervaller runt medelvärden (KI) beräknades för varje prov per dag under fem dagar. Värdena visas i tabell 17.

Tabell 17
Medelvärde för RLU/CO med konfidensintervall och procent positivt
(medel-RLU/CO i fallande ordning)

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

För de fem proverna med ett medelvärde för RLU/CO på 20 % eller mer över cutoff-värdet (nr 1–5), var 100 av 100 replikat (100,0 %) positiva. För de fem proverna med ett medelvärde för RLU/CO inom 20 % över eller under analysens cutoff-värde (nr 6–10), var 60 av 100 (60 %) av replikaten positiva och 40 av 100 (40 %) var negativa. För de 10 proverna med ett medelvärde för RLU/CO vid mer än 20 % under analysens cutoff-värde, var 200 av 200 replikat (100 %) negativa.

Således var prover med ett medelvärde för RLU/CO på 20 % eller mer över cutoff-värdet positiva 100 % av tiden medan prover med ett medelvärde för RLU/CO på 20 % eller mer under cutoff-värdet var negativa 100 % av tiden. Detta indikerar att prover med ett medelvärde på 20 % eller mer från cutoff-värdet kan förväntas att ge konsekventa resultat. Prover som var nära cutoff-värdet gav ungefär lika många positiva som negativa resultat. Dessa data visar att prover i STM ger reproducerbara resultat med *digene* HC2 HPV DNA-testet.

REPRODUCERBARHETEN FÖR *digene* HC2 HPV DNA-TEST MED KLINISKA PROVER INSAMLADE MED PRESERV CYT-LÖSNING

Reproducerbarheten för *digene* HC2 HPV DNA-testet med kliniska prover som samlats in med PreservCyt-lösning fastställdes i en studie som använde 24 simulerade prover med en koncentration som sträcker sig över ett intervall av HPV-DNA-koncentrationer. Prover bestod av PreservCyt-lösning och vita blodceller, med och utan HPV 16 plasmid-innehållande bakterier.

Proverna testades med fyra replikat dagligen i fem dagar med totalt 20 replikat per prov. På var och en av de fem dagarna i studien bereddes och testades en aliquot om 8 ml från varje prov enligt bruksanvisningen till *digene* HC2 Sample Conversion-kitet genom att enbart använda högrisk-HPV-prob. Medelvärden, standardavvikelse och 95 % konfidensintervall (KI) beräknades för varje prov per dag och under fem dagar och replikat. Medelvärdet för RLU/CO, konfidensintervallet runt medelvärdet och procent positiva replikat visas i tabell 18 för varje prov i fallande ordning baserat på medelvärdet för RLU/CO.

Tabell 18
Medelvärde för RLU/CO med konfidensintervall och procent positivt
(medel-RLU/CO i fallande ordning)

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

För de sex proverna med ett medelvärde för RLU/CO vid 20 % eller mer över cutoff-värdet (nr 1–6), var 114 av 120 replikat (95,0 %) positiva. För de sju proverna med ett medelvärde för RLU/CO inom 20 % över eller under analysens cutoff-värde (nr 7-13), var 88 av 139 (63,3 %) av replikaten positiva och 51 av 139 (36,7 %) var negativa. För de fyra proverna inom 10 % över eller under cutoff (nr 10–13) var 41 av 79 (51,9 %) av replikaten positiva och 38 (48,1 %) var negativa. För de 11 proverna med ett medelvärde för RLU/CO vid mer än 20 % under analysens cutoff-värde, var 220 av 220 replikat (100 %) negativa.

Således var prover med ett medelvärde för RLU/CO på 20 % eller mer över cutoff-värdet positiva 95 % av tiden medan prover med ett medelvärde för RLU/CO på 20 % eller mer under cutoff-värdet var negativa 100 % av tiden. Detta indikerar att prover med ett medelvärde på 20 % eller mer från cutoff-värdet kan förväntas att ge konsekventa resultat. Prover som var nära cutoff-värdet gav ungefär lika många positiva som negativa resultat. Dessa data visar att prover i PreservCyt-lösning ger reproducerbara resultat med *digene* HC2 HPV DNA-testet.

REPRODUCERBARHETEN FÖR *digene* HC2 HIGH-RISK HPV DNA-TEST MED PROVER INSAMLADE MED SUREPATH-KONSERVERINGSVÄTSKA

Utvärderingar av reproducerbarheten utfördes för att undersöka möjligheten för tre olika laboratorier att erhålla ett liknande diagnostiskt resultat under olika dagar och i olika körningar med en identisk uppsättning av prover med känd positiv/negativ HPV-status vid användning av en analyscutoff på 1,0 RLU/CO. Provpanelen för reproducerbarhet bestod av fem HPV-positiva prover, två prover med HPV DNA-koncentrationer nära analyscutoff och fem negativa HPV-prover.

Panelmedlemmar bereddes genom att kombinera unika SurePath-patientprover med en känd negativ och positiv HPV-status för att erhålla de önskade målvärdena för RLU/CO. Varje panelmedlem testades dubbelt, två gånger varje dag under en period av fem dagar vid de tre deltagande laboratorium.

Tabell 19
Reproducerbarhetsstudie SurePath-prover
Kvalitativa resultat efter panelmedlem

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

REPRODUCERBARHET FÖR SUREPATH-RESULTAT NÄR RAPID CAPTURE SYSTEM ANVÄNDS FÖR ANALYSBEARBETNING

Reproducerbarheten för SurePath-provresultat vid användning av Rapid Capture System för analysbearbetning jämfört med resultat som erhöles vid användning av manuell analysbearbetning. Två jämförande tester utfördes på separata alikvoter av samma bearbetade prov.

Tabell 20
Överensstämmelse mellan SurePath-resultat inom prov och RCS
(RCS kontra manuell analys)

Positiv överensstämmelse % 95 % KI (n/N)		Negativ överensstämmelse % 95 % KI (n/N)	
Alla positiva	Högt positivt subset (RLU/CO ≥ 2,5)	Alla negativa	Lågt negativt subset RLU/CO (< 0,80)
99,0 417/421 97,6, 99,7	100 375/375 99,0, 100	97,7 1057/1079 96,9, 98,7	98,7 1050/1064 97,8, 99,28

PROCEDURENS BEGRÄNSNINGAR

För *in vitro*-diagnostisk användning

Se användarhandboken för Rapid Capture System för ytterligare begränsningar av proceduren som är specifika för användningen av det systemet för testning av stora provvolymmer.

- *digene* HC2 HPV DNA-testet för humant papillomavirus typ 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 och 68 rekommenderas inte för bedömning av misstänkta sexuella övergrepp.
- Prevalensen av HPV-infektioner i en population kan påverka specificiteten. Positiva prediktiva värden minskar när man testar populationer med låg prevalens eller individer utan risk för infektion.
- Ett negativt resultat utesluter inte möjligheten av en HPV-infektion då en mycket låg infektionsnivå eller provtagningsfel kan ge falskt negativa resultat.
- *digene* HC2 HPV DNA-testet särskiljer mellan två grupper av HPV-typer: HPV 6/11/42/43/44 och 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68. Det särskiljer inte mellan de olika virustyperna inom dessa grupper.
- *digene* HC2 HPV DNA-testet kan endast användas med cervixprover som tagits med *digene* HC2 DNA Collection Device, med biopsier som samlats in i STM eller med cervikala prover som tagits med en provtagningsanordning av borsttyp eller kombinerad borste/spatel och sedan placerats i PreservCyt-lösning eller cervikala prover som tagits i SurePath-konserveringsvätska. Biopsiprover kan endast analyseras om de omedelbart placeras i STM och förvaras vid -20 °C till dess att analysen utförs.
- *digene* HC2 DNA Collection Device ska inte användas vid provtagning på gravida kvinnor.
- Infektion med HPV är inte en definitiv indikator på närvaro av höggradig cervixsjukdom, inte heller innebär det att alla fall utvecklar höggradig sjukdom eller cancer.
- Det förekommer en viss korshybridisering mellan HPV-typ 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 56, MM4, MM7, MM8 och MM9 och högrisk-HPV-proben. Patienter med prover som innehåller höga koncentrationer av dessa HPV-typer kan felaktigt remitteras till kolposkopi.³⁸
- *digene* HC2 HPV DNA-testet är utformat för att detektera högrisk-HPV-typer, inklusive 39, 58, 59 och 68. Analytiska studier, utförda av QIAGEN, med klonat plasmid-DNA från HPV visar att denna analys detekterar dessa typer vid koncentrationer mellan 0,62 pg/ml och 1,39 pg/ml. Detta är ekvivalent med detektionsegenskaperna för de andra HPV-typerna som detekteras av *digene* HC2 HPV DNA-testet. QIAGEN kunde validera detektionen av dessa HPV-typer hos endast ett begränsat antal kliniska prover. Eftersom den låga prevalensen för dessa typer i befolkningen i allmänhet (såsom visats av Bosch et. Al³⁶), har prestandaegenskaperna för *digene* HC2 HPV DNA-testet för detektionen av HPV-typ 39, 58, 59 och 68 inte bekräftats statistiskt.
- Om höga koncentrationer av svampdödande kräm, preventivmedelskräm eller sköljvätska är närvarande när provtagning för HPV-testning sker och proverna innehåller HPV DNA-koncentrationer som ger RLU/CO-värden nära analysens cutoff så kan sannolikt falskt negativa resultat erhållas.
- Korsreaktivitet mellan både *digene* HC2 HPV DNA Test-proben och plasmiden pBR322 är möjlig. Förekomsten av pBR322-homologa sekvenser har rapporterats i humana genitalprover och falskt positiva resultat skulle kunna förekomma i närvaro av höga nivåer av bakteriell plasmid.

LITTERATURHÄNVISNINGAR

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

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

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

Observation	Troliga orsaker	Lösningar
<p>Felaktig eller ingen färgförändring observeras under denaturering.</p>	<p>Denatureringsreagens inte beredd på rätt sätt eller</p> <p>Denatureringsreagens inte tillsatt</p> <p>Prov innehåller blod eller andra material som maskerar färgförändringen.</p> <p>Provets pH kan vara ovanligt surt.</p>	<p>Kontrollera att denatureringsreagensen innehåller indikatorfärgen och har en mörklila färg.</p> <p>Kontrollera att denatureringsreagensen har tillsatts till provet genom att mäta provets volym (ska vara 1,5 ml). Om volymen indikerar att denatureringsreagens inte har tillsatts ska du tillsätta lämplig mängd, blanda och fortsätta med analysen om den rätta färgförändringen observeras.</p> <p>Den exakta färgförändringen som beskrivs väntas inte ske med dessa provtyper; <i>digene</i> HC2 HPV DNA Test-resultat ska inte påverkas negativt.</p> <p>Om ingen av dessa orsaker stämmer, kan provet vara ovanligt surt, vilket gör att den väntade färgförändringen inte inträffar. Ta ett nytt prov innan du applicerar ättiksyra i cervix eftersom ett olämpligt prov-pH påverkar testresultaten negativt.</p>
<p>Kvalitetskontrollerna ger felaktiga resultat</p>	<p>Felaktigt val av programvaruprotokoll för testet (tex. CPC-protokoll har använts för dubbelmetoden).</p> <p>Omvänd placering av QC1-LR och QC2-HR</p> <p>Omvänd placering av LRC och QC1-LR och/eller HRC och QC1-HR.</p>	<p>Om programvaruprotokollet är fel för det test som utförs ska plattan läsas igen, inom 30 minuter efter tillsättning av detektionsreagens 2, med korrekt protokoll.</p> <p>Testa proverna igen.</p> <p>Testa proverna igen.</p>
<p>Felaktig färgförändring observerad under hybridisering.</p>	<p>Otillräcklig blandning av probblandning med denaturerade kalibratorer, kontroller och/eller prover; eller probblandning inte tillsatt; eller felaktig reagensvolym tillsatt.</p> <p>Prov innehåller blod eller andra material som maskerar färgförändringen.</p> <p>Provet hade < 1 000 µl STM.</p>	<p>Skaka hybridiseringsmikrotiterplattan eller stället för mikrorör i ytterligare två minuter. Om det finns brunnar som fortfarande är lila, ska du tillsätta ytterligare 25 µl av lämplig probblandning och blanda väl. Om korrekt färgförändring inte sker när prob tillsatts och omblandats och provet inte innehåller blod eller andra material ska provet testas igen.</p> <p>Den exakta färgförändringen som beskrivs väntas inte ske med dessa provtyper; <i>digene</i> HC2 HPV DNA Test-resultat ska inte påverkas negativt.</p> <p>Kontrollera originalprovets volym. Volymen ska vara 1 350 µl ± 20 µl (efter det att 75 µl har tagits bort för låg- och högrisk-HPV-proberna). Om volymen är < 1 350 µl, innehöll originalprovet < 1 000 µl STM. Ta ett nytt prov.</p>

Observation	Troliga orsaker	Lösningar
<p>Analysen klarar inte valideringskriterierna. Ingen signal observeras i kalibratorer, kvalitetskontroller eller i prover.</p>	<p>Ingen prob tillsatt till probspädning.</p> <p>Prob kontaminerad med RNAs vid beredning.</p> <p>Otillräcklig blandning av prob och spädningsvätska för prob.</p> <p>Otillräcklig blandning av spädd prob och denaturerat prov.</p> <p>Felaktig tid eller temperatur under hybridiseringssteget.</p> <p>Otillräcklig blandning under infångningssteget.</p> <p>Omvända prober/problandningar/hybridiseringsrör.</p> <p>Det går inte att lägga till rätt mängd detektionsreagens 1 eller att inkubera en specifik tid.</p> <p>Det går inte att lägga till rätt mängd detektionsreagens 2 eller att inkubera en specifik tid.</p> <p>Fel på luminometern eller felaktig programmering.</p>	<p>Bered probblandningar så som beskrivs i denna bruksanvisning. Märk rören noga.</p> <p>Använd pipettspetsar med aerosolfilter för att pipettera prob och använd handskar. Använd endast rena, nya reagensbehållare för engångsbruk.</p> <p>När proben har tillsatts till probspädningsvätskan ska den vortexblandas noga på hög hastighet i minst 5 sekunder. Det ska bildas en synlig virvel.</p> <p>Efter att ha tillsatt probblandning och prov till varje brunn eller mikrorör på hybridiseringsmikrotiterplatta ska skakning utföras på Rotary Shaker I med $1\ 100 \pm 100$ varv/min i 3 ± 2 minuter. Kontrollera färgförändringen från lila till gult i varje rör/mikrotiterplattsbrunn.</p> <p>Hybridisera i 60 ± 5 minuter vid 65 ± 2 °C. Kontrollera temperaturen på Microplate Heater I eller vattenbadet. Kontrollera att Microplate Heater I eller vattenbadet är inställt på att värma upp prover till rätt temperatur och är förvärmade i 60 minuter före användning. Kontrollera att vattennivån är tillräcklig för att värma upp prover till rätt temperatur. Vattenbad ska kalibreras regelbundet.</p> <p>Skaka på Rotary Shaker I i 60 ± 5 minuter vid 20–25 °C så som beskrivs i denna bruksanvisning. Verifiera Rotary Shaker I-hastigheten med en kalibrering, som beskrivs i avsnittet Kalibrering av skakarens hastighet i <i>användarhandboken för Rotary Shaker I</i>.</p> <p>Bered probblandningarna noggrant och märk därefter probblandningsrören. Var noggrann med att tillsätta rätt prob till rätt sats hybridiseringsrör. Märk probblandningsrör, hybridiseringsrör och/eller ställ för att minimera risken för förväxling.</p> <p>Pipettera 75 µl av detektionsreagens 1 i varje brunn med en 8-kanalspipett. Inkubera vid 20–25 °C under 30–45 minuter.</p> <p>Pipettera 75 µl av detektionsreagens 2 i varje brunn med en 8-kanalspipett. Inkubera vid 20–25 °C under 15 till 30 minuter.</p> <p>Se den tillämpliga användarhandboken för ytterligare anvisningar eller ring en lokal representant för QIAGEN.</p>

Observation	Troliga orsaker	Lösningar
<p>Förhöjda RLU-värden i kalibrator, kvalitetskontroller och/eller prover (≥ 200 RLU i många eller alla brunnar). Analysen kanske inte klarar valideringskriterierna.</p>	<p>Denatureringsreagens är inte tillsatt; eller felaktig reagensvolym tillsattes; eller otillräcklig blandning av denatureringsreagens med prover eller kalibratorer.</p> <p>Ljussläckage i luminometern. Dörren inte förseglad. Förseglingen runt dörren bruten.</p> <p>Kontaminering av detektionsreagens 2 eller brunnar på infångsmikrotiterplatta med detektionsreagens 1 eller exogent alkaliskt fosfat.</p> <p>Kontaminerad tvättbuffert.</p> <p>Kontaminerad Automated Plate Washer</p> <p>Otillräcklig tvättning av brunnar på infångningsmikrotiterplattan efter inkubation med detektionsreagens 1.</p> <p>Brunnar på mikrotiterplattan kontaminerade med detektionsreagens 1.</p> <p>Torkning av hybridiseringslösning inom samma område på Kimtowels-torkar eller liknande luddfria pappershanddukar</p> <p>Använt felaktiga torkdukar.</p>	<p>Kontrollera att den repeterande pipetten tillför rätt mängd innan du tillsätter denatureringsreagens. Det är väsentligt att pipetter är kalibrerade. Tillsätt ytterligare en halv volym denatureringsreagens till varje rör och blanda väl. Undvik falskt positiva resultat genom att säkerställa att vätskan tvättar hela insidan av röret. Kalibratorer, kvalitetskontroller och prover ska bli lila efter tillsats av denatureringsreagens.</p> <p>Kontrollera luminometerns bakgrundssignal genom att läsa av en tom mikrotiterplatta. En avläsning större än 50 RLU indikerar ljussläckage. Se tillämplig användarhandbok för ytterligare anvisningar eller ring en lokal representant för QIAGEN.</p> <p>Se kontaminationskontrollen i det här felsökningsavsnittet.</p> <p>Se kontaminationskontrollen i det här felsökningsavsnittet.</p> <p>Se kontaminationskontrollen i det här felsökningsavsnittet.</p> <p>Tvätta brunnarna på mikrotiterplattan väl med tvättbuffert 6 gånger, antingen genom att överflöda brunnarna varje gång eller använda Automated Plate Washer. Det ska inte synas några rester av rosa vätska i brunnarna efter tvätten. Se <i>användarhandboken för Automated Plate Washer</i> för anvisningar om testning avseende kontaminering eller funktionsfel.</p> <p>Kontrollera att alla arbetsytor är rena och torra. Var försiktig när du använder detektionsreagens 1. Undvik aerosoler.</p> <p>Torka inte av igen på samma område av Kimtowels-torkarna eller liknande luddfria pappershanddukar som använts tidigare.</p> <p>Använd Kimtowels-torkar eller motsvarande luddfria pappershanddukar för torkning.</p>

Observation	Troliga orsaker	Lösningar
<p>Låga PC/NC-kvoter eller stort antal av lågt positiva prover med kvoter på < 2,0 (> 20 %). Analysen kanske inte klarar valideringskriterierna.</p>	<p>Otillräcklig provberedning.</p> <p>Prob otillräckligt blandad eller för litet prob tillsatt till analysen.</p> <p>Otillräcklig volym av spädd prob tillsatt till varje hybridiseringsmikrorör.</p> <p>Ingen aktivitet hos detektionsreagens 1.</p> <p>Otillräcklig infångning.</p> <p>Otillräcklig tvätt.</p> <p>Kontaminerad tvättbuffert.</p>	<p>Tillsätt rätt volym detektionsreagens och blanda noggrant med vortexblandning. Undvik falskt positiva resultat genom att säkerställa att vätskan tvättar hela insidan av röret. För prover i PreservCyt-lösning måste du se till att tillräcklig blandning och resuspension av cellpelleten slutförs före denatureringsinkubation. Se bruksanvisningen för <i>digene</i> HC2 Sample Conversion-kit för information om protokollet. En tydlig färgförändring från genomskinligt till mörkt lila ska observeras. Inkubera i 45 ± 5 minuter vid 65 ± 2 °C.</p> <p>Bered probblandningarna enligt anvisningarna. Blanda noga med vortexblandning och se till att det bildas en synlig virvel. Probblandningar ska tillsättas till rör med en volymetrisk pipett eller en pipett med flera kanaler för att säkerställa rätt tillförsel.</p> <p>Kontrollera att 8-kanalspipetten tillför rätt mängd innan du tillsätter probblandning till hybridiseringsmikrotiterplattan eller -mikrorören. Tillsätt 25 µl probblandning till varje brunn på mikrotiterplattan eller mikrorör som innehåller denaturerade kalibratorer, kvalitetskontroller och kliniska prover. Kontrollera att 8-kanalspipetten tillför rätt mängd innan du tillsätter probblandning till brunnarna på hybridiseringsmikrotiterplattan. Färgförändringen ska gå från mörklila till gult efter tillsats och noggrann blandning av probblandningen. Prover i PreservCyt-lösning ska bli rosa istället för gula.</p> <p>Detektionsreagens 1 ska förvaras vid 2–8 °C. Använd före det utgångsdatum som anges på kitets ytterkartong.</p> <p>Infångningssteget ska utföras med en Rotary Shaker I inställd på 1 100 ± 100 varv/min. Validera skakarens hastighet genom kalibrering.</p> <p>Tvätta brunnarna på mikrotiterplattan väl med tvättbuffert sex gånger, antingen genom att överflöda brunnarna varje gång eller använda Automated Plate Washer.</p> <p>Se kontaminationskontrollen i det här felsökningsavsnittet.</p>
<p>Serie av positiva prover med ungefär samma RLU-värden</p>	<p>Kontaminering av brunnar på infångningsmikroplattan under analysens manipulation.</p> <p>Kontaminering av detektionsreagens 2.</p> <p>Funktionsfel i Automated Plate Washer</p>	<p>Täck alltid infångstmikrotiterplatta vid alla inkubationer Undvik att exponera rör för aerosolkontamination medan analysen utförs. Använd puderfria handskar under manipulationer.</p> <p>Var försiktig så att reagenset inte kontamineras vid pipettering av detektionsreagens 2 till brunnarna på infångstmikrotiterplattan. Undvik kontaminering av detektionsreagens 2 med aerosoler från detektionsreagens 1 eller med laboratoriedamm osv.</p> <p>Se kontaminationskontrollen i det här felsökningsavsnittet eller se <i>användarhandboken Automated Plate Washer</i> för anvisningar om testning avseende kontamination eller funktionsfel.</p>
<p>Stort %CV mellan replikat.</p>	<p>Felaktig pipettering.</p> <p>Otillräcklig blandning.</p> <p>Ofullständig överföring av vätska från hybridiseringsmikrorör till brunnar på infångstmikrotiterplatta.</p> <p>Felaktiga tvättförhållanden.</p> <p>Brunnar på mikrotiterplattan kontaminerade med detektionsreagens 1.</p>	<p>Kontrollera att pipetten verkligen tillför reproducerbara volymer. Kalibrera pipetter rutinemässigt.</p> <p>Blanda noga vid alla steg. Vortexblanda före denatureringsinkubation och efter tillsats av probblandning. Kontrollera att en synlig virvel bildas.</p> <p>Kontrollera att reproducerbara volymer överförs under överföringssteget från brunnarna på hybridiseringsmikrotiterplattan eller hybridiseringsmikrorören till brunnarna på infångningsmikrotiterplattan.</p> <p>Tvätta brunnarna på mikrotiterplattan väl med tvättbuffert sex gånger, antingen genom att överflöda brunnarna varje gång eller använda Automated Plate Washer och korrekta Automated Plate Washer-protokoll.</p> <p>Kontrollera att alla arbetsytor är rena och torra. Var försiktig när detektionsreagens 1 används. Undvik aerosoler.</p>

Observation	Troliga orsaker	Lösningar
Falskt positiva resultat från kända negativa prover.	<p>Detektionsreagens 2 kontaminerad.</p> <p>Brunnar på mikrotiterplattan kontaminerade med detektionsreagens 1.</p> <p>Avtorkning på samma område, över flera rader, på Kimtowels torkdukar eller liknande luddfria pappershanddukar.</p> <p>Otillräcklig provberedning.</p> <p>Felaktiga tvättförhållanden.</p> <p>Kontaminering av pipettspetsen med odenaturerat material vid överföring av denaturerat prov till mikrorör eller brunn på mikrotiterplatta som används för hybridisering av HPV-proben.</p>	<p>Var försiktig så att du inte korskontaminerar prover när du fördelar detektionsreagens 2 i alikvoter mellan prover. Om du bara använder en del av ett kit, ska den volym som behövs för analysen fördelas i alikvoter i en ren reagensbehållare för engångsbruk innan pipetten fylls.</p> <p>Tvätta brunnarna på mikrotiterplattan väl med tvättbuffert sex gånger, antingen genom att överflöda brunnarna varje gång eller använda Automated Plate Washer. Det ska inte synas några rester av rosa vätska i brunnarna på mikrotiterplattan efter tvätten.</p> <p>Torka inte av på samma område som använts förut, eftersom kontaminering kan inträffa.</p> <p>Tillsätt rätt volym detektionsreagens och blanda noggrant med vortexblandning. Undvik falskt positiva resultat genom att säkerställa att vätskan tvättar hela insidan av röret med antingen den manuella metoden eller med MST Vortexer 2-metoden (för den manuella vortexer-metoden ska du vända på röret en gång). För prover i PreservCyt-lösning måste du se till att tillräcklig blandning och resuspension av cellpelleten slutförs före denatureringsinkubation. Se bruksanvisningen för <i>digene</i> HC2 Sample Conversion-kit för information om protokollet. För alla prover ska en distinkt färgförändring till mörklila ses. Inkubera i 45 ± 5 minuter vid 65 ± 2 °C. För SurePath-prover ska du se till att proverna inkuberas i 90 ± 5 minuter vid 65 ± 2 °C.</p> <p>Tvätta brunnarna på mikrotiterplattan väl med tvättbuffert sex gånger, antingen genom att överflöda brunnarna varje gång eller använda Automated Plate Washer och korrekta Automated Plate Washer-protokoll.</p> <p>Denatureringssteget i provbearbetningsproceduren ska utföras så som anges i denna bruksanvisning. Om provet inte blandas ordentligt eller röret inte vänds eller skakas på rätt sätt kan det hända att denatureringen av ospecifika RNA:DNA-hybrider i cervixproverna inte denatureras tillräckligt. Vid användning av prover i PreservCyt-lösning eller SurePath-konserveringsvätska är det troligt att det finns sådana hybrider på insidan av denatureringsröret. För att förhindra risken för kontaminering av detta icke-denaturerade cellmaterial får mikropipettspetsen inte vidröra sidorna på provdenatureringsröret när det denaturerade provet överförs till mikroröret eller brunnen på mikrotiterplattan som används för hybridisering av HPV-proben.</p>
Förhöjda negativ RLU-värden för kalibrator (> 200 RLU). Återstående analys utförs som förväntat.	<p>Detektionsreagens 2 inkuberades vid en temperatur som översteg 20–25 °C</p> <p>Detektionsreagens 2 inkuberades längre än 30 minuter.</p> <p>Detektionsreagens 2 eller tvättbuffert var kontaminerad med alkaliskt fosfatase eller detektionsreagens 1.</p>	<p>Kör om testet och kontrollera att infångnings- och detektionsstegen inkuberas vid 20–25 °C.</p> <p>Läs av plattan 15 minuter efter inkubation vid 20–25 °C (och inte senare än 30 minuter efter inkubationen).</p> <p>Se kontaminationskontrollen i det här felsökningsavsnittet.</p>
Analysen klarar inte valideringskriterierna. Förhöjd PC/NC-kvot	Omvänd placering av HRC och QC2-HR och/eller LRC och QC1-LR	Testa proverna igen. Läs noga etiketterna på kalibrator- och kvalitetskontrollflaskorna för att förhindra omvänd placering av dessa reagenser.

KONTAMINATIONSKONTROLL

Utvärderat reagens	Procedur för kontaminationskontroll	Tolkning av resultat
Obs! Var försiktig när detektionsreagens 2 pipetteras för att undvika kontaminering. Använd handskar och undvik att vidröra arbetsytor med pipettspetsar.		
Detektionsreagens 2	<ul style="list-style-type: none"> Pipettera 75 µl alikvoterat, resterande och/eller ursprungligt detektionsreagens 2 från flaskan till en tom brunn på infångningsmikrotiterplatta. Inkubera vid 20–25 °C i 15 minuter. Undvik direkt solljus. Avläs brunnarna på mikrotiterplattan i luminometer. <p>Obs! Testning av detektionsreagens 2 i replikat om tre ger optimal prestandabedömning.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Kontroll av detektionsreagens 2 bör vara < 50 RLU. Om värden för detektionsreagens 2 är < 50 RLU kan detektionsreagens 2 användas för att upprepa analysen. Vid kontaminering, (> 50 RLU), erhåll ett nytt kit och upprepa analysen.

Tvättbuffertanordning och/eller Vattenkälla	<ul style="list-style-type: none"> • Pipettera 75 µl detektionsreagens 2 i fyra separata brunnar på infångsmikrotiterplatta. • Märk brunnarna 1–4. • Brunn 1 är kontrollen av detektionsreagens 2. • Pipettera 10 µl tvättbuffert från tvättflaskan i brunn 2. • Låt tvättbuffert flöda genom tvättslangen. • Pipettera 10 µl tvättbuffert från slangen i brunn 3. • Skaffa en aliquot av vattnet som användes för att bereda tvättbufferten. Pipettera 10 µl vatten i brunn 4. • Inkubera vid 20–25 °C i 15 minuter. Undvik direkt solljus. • Avläs brunnarna på mikrotiterplattan i luminometer. 	<ul style="list-style-type: none"> • Kontrollen av detektionsreagens 2 (brunn 1) ska vara < 50 RLU. • Jämför RLU-värdet från brunn 2, 3 och 4 med kontrollen av detektionsreagens 2 RLU-värde (brunn 1). De enskilda RLU-värdena för brunn 2, 3 och 4 ska inte överskrida 50 RLU av RLU-värdet för kontrollen av detektionsreagens 2 (brunn 1). • Värdet som överstiger 50 RLU för kontrollen av detektionsreagens 2 anger kontaminering. Se Reagensberedning och förvaring för anvisningar om rengöring och underhåll av tvättapparaten.
Automated Plate Washer	<ul style="list-style-type: none"> • Pipettera 75 µl detektionsreagens 2 i fem separata brunnar på infångsmikrotiterplattan. • Märk brunnarna 1–5. • Brunn 1 är kontrollen av detektionsreagens 2. • Pipettera 10 µl av tvättbufferten från flaskan för plattvättaren märkt <i>Wash</i> (Tvätta) i brunn 2. • Pipettera 10 µl av sköljvätskan från flaskan för plattvättaren märkt <i>Rinse</i> (Skölj) i brunn 3. • Tryck på knappen Prime (Prima) på plattvättarens knappsats, så att tvättbufferten kan flöda genom slangarna. • Pipettera 10 µl av tvättbufferten från tråget i brunn 4. • Tryck på tangenten Rinse (Skölj) på plattvättarens knappsats, så att sköljvätskan kan flöda genom slangarna. • Pipettera 10 µl av tvättbufferten från tråget i brunn 5. • Täck och inkubera i 15 minuter vid 20–25 °C. Undvik direkt solljus. • Avläs brunnarna på mikrotiterplattan i luminometer. 	<ul style="list-style-type: none"> • Kontrollen av detektionsreagens 2 (brunn 1) ska vara < 50 RLU. • Jämför RLU-värdet från brunn 2, 3, 4 och 5 med RLU-värdet för kontrollen av detektionsreagens 2 (brunn 1). De enskilda RLU-värdena för brunn 2, 3, 4 och 5 ska inte överskrida 50 RLU av RLU-värdet för kontrollen av detektionsreagens 2 (brunn 1). • Värdet som överstiger 50 RLU för kontrollen av detektionsreagens 2 indikerar kontaminering av plattvättaren. • Se <i>användarhandbok för Automated Plate Washer</i>, dekontaminationsproceduren.

KONTAKTINFORMATION

Använd kontaktinformationsbladet som medföljer denna produkt för att kontakta din lokala QIAGEN representant.

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

Registrerade namn, varumärken osv. som används i detta dokument, även när de inte uttryckligen har markerats som sådana, får inte betraktas som oskyddade i lag.

Denna produkt och de metoder den använder omfattas av ett eller flera av följande patent:

HPV-patentnummer i USA

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

Patentnummer för Hybrid Capture i USA

6,228,578B1

Sammanfattning av digene HC2 HPV DNA-test

VIKTIGT! Det är viktigt att du är helt förtrogen med procedurernas detaljer innan du använder den här sammanfattningen.

	Procedur	
	Manuell blandningsmetod	Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2-metod
DENATURERING (För prover i PreservCyt-lösning, se bruksanvisning för digeneHC2 Sample Conversion-kit)	<p>Märk hybridiseringsmikrorören. Bered denatureringsreagenset.</p> <p>↓</p> <p>Pipettera denatureringsreagens (volymen är lika med halva provvolymen) i kalibratorer, kvalitetskontroller och prover. Vortexblanda varje prov, kalibrator och kvalitetskontroll individuellt i 5 sekunder på hög hastighet (se bruksanvisningen för information). Kontrollera att alla rör uppvisar en lila färg.</p> <p>↓</p> <p>Inkubera vid 65 ± 2 °C i 45 ± 5 minuter.</p> <p>↓</p> <p>Bered HPV-probblandningen.</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p>	<p>Märk hybridiseringsplattan. Bered denatureringsreagenset.</p> <p>↓</p> <p>Pipettera denatureringsreagens (volymen är lika med halva provvolymen) i kalibratorer, kvalitetskontroller och prover. Kontrollera att alla rör uppvisar en lila färg.</p> <p>↓</p> <p>Täck stället med film och lock.</p> <p>↓</p> <p>Vortexblanda i 10 sekunder.</p> <p>↓</p> <p>Inkubera vid 65 ± 2 °C i 45 ± 5 minuter.</p> <p>↓</p> <p>Bered HPV-probblandningen</p> <p>↓</p>
HYBRIDISERING Metod för kombinerad probblandning	<p>Vattenbadsmetod</p> <p>Blanda denaturerade prover ordentligt och pipettera 75 µl till rören.</p> <p>↓</p> <p>Inkubera i 10 minuter vid 20–25 °C.</p> <p>↓</p> <p>Pipettera 25 µl kombinerad probblandning i hybridiseringsmikrorören.</p>	<p>Microplate Heater I-metoden</p> <p>Blanda denaturerade prover ordentligt och pipettera 75 µl i brunnarna på mikrotiterplattan.</p> <p>↓</p> <p>Inkubera i 10 minuter vid 20–25 °C.</p> <p>↓</p> <p>Pipettera 25 µl kombinerad probblandning i hybridiseringsmikrotiterplattans brunnar.</p>
Dubbelprobmetod	<p>ELLER</p> <p>Blanda denaturerade prover ordentligt och pipettera 75 µl i "LR"-rören. Blanda denaturerade prover ordentligt och pipettera 75 µl i "HR"-rören.</p> <p>↓</p> <p>Inkubera i 10 minuter vid 20–25 °C.</p> <p>↓</p> <p>Pipettera 25 µl lågrisk-HPV-probblandning i "LR"-rören. Pipettera 25 µl högrisk-HPV-probblandning i "HR"-rören.</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>Täck mikrorören med en plattförseglare och skaka på Rotary Shaker I inställd på $1\ 100 \pm 100$ varv/min i 3 ± 2 minuter. Kontrollera att alla rör uppvisar en gul färg.</p> <p>↓</p> <p>Inkubera vid 65 ± 2 °C i 60 ± 5 minuter. Bered infångstmikrotiterplattan.</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p>	<p>ELLER</p> <p>Blanda denaturerade prover väl och pipettera 75 µl i "LR"-mikrotiterplattans brunnar och 75 µl i "HR"-mikrotiterplattans brunnar.</p> <p>↓</p> <p>Inkubera i 10 minuter vid 20–25 °C.</p> <p>↓</p> <p>Pipettera 25 µl lågrisk-HPV-probblandning i "LR"-mikrotiterplattans brunnar. Pipettera 25 µl högrisk-HPV-probblandning i "HR"-mikrotiterplattans brunnar.</p> <p>↓</p> <p>Täck mikrotiterplattan med ett lock och skaka med Rotary Shaker I på $1\ 100 \pm 100$ varv/min i 3 ± 2 minuter. Kontrollera att alla rör uppvisar en gul färg.</p> <p>↓</p> <p>Inkubera vid 65 ± 2 °C i 60 ± 5 minuter. Bered infångstmikrotiterplattan.</p> <p>↓</p>
HYBRIDINFÄNGNING	<p>Överför innehållet från varje brunn på hybridiseringsplattan eller mikrorör till motsvarande brunn på infångstmikrotiterplattan, med en 8-kanalspipett. Täck med ett plattlock eller en plattförseglare. Skaka på $1\ 100 \pm 100$ varv/min vid 20–25 °C i 60 ± 5 minuter. Bered tvättbuffert.</p> <p>↓</p> <p>Dekantera och torka av infångningsmikrotiterplattan (se bruksanvisningen för information).</p> <p>↓</p>	
HYBRIDDETEKTION	<p>Pipettera 75 µl av detektionsreagens 1 i varje brunn med en infångningsmikrotiterplattan. Täck infångstmikrotiterplatta med plattlock, plastfilm eller liknande. Inkubera vid 20–25 °C i 30–45 minuter. Tvätta plattan med önskad metod.</p> <p>↓</p>	
TVÄTTNING	<p>Metod för manuell tvättning</p> <p>Dekantera och torka av infångstmikrotiterplattan (se bruksanvisningen för information).</p> <p>↓</p> <p>Tvätta sex gånger.</p> <p>↓</p> <p>Torka av på luddfria pappershanddukar.</p> <p>↓</p>	<p>Automated Plate Washer-metod</p> <p>Placera plattan på tvättapparaten och tryck på "START/STOP" för att starta.</p> <p>↓</p> <p>Fortsätt till nästa steg.</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p>
SIGNALFÖRSTÄRKNING	<p>Pipettera 75 µl av detektionsreagens 2 i varje brunn på infångningsmikrotiterplattan. Inkubera vid 20–25 °C i 15–30 minuter.</p> <p>↓</p>	
AVLÄSNING	<p>Avläs infångningsmikrotiterplattan på DML-instrumentet.</p> <p>↓</p> <p>Validera analysen och tolka resultatet.</p>	