



Hybrid Capture[®] 2

GC-ID DNA Test

Notice d'instructions

Test ADN *digene*[®] HC2 GC-ID

Test d'hybridation moléculaire *in vitro* avec amplification du signal par chimiluminescence en format microplaque pour la détection qualitative de l'ADN de *Neisseria gonorrhoeae* (GC) dans les prélèvements cervicaux.

À utiliser avec :

Dispositif de prélèvement d'ADN *digene*[®] HC2
Kit de prélèvement féminin avec écouvillon *digene*[®]
Solution Hologic PreservCyt[®]

PRINCIPAUX CHANGEMENTS PAR RAPPORT À LA PRÉCÉDENTE RÉVISION DE LA NOTICE D'INSTRUCTIONS

1. Mise à jour de la marque du produit
2. Suppression des données et des références sur le test réflexe

Pour usage professionnel uniquement par un personnel de laboratoire qualifié et agréé. Lire ces instructions attentivement avant emploi.



QIAGEN Gaithersburg, Inc.
1201 Clopper Road
Gaithersburg, MD 20878 États-Unis



QIAGEN GmbH
QIAGEN Str. 1
D-40724 Hilden
Germany

©2011 QIAGEN Gaithersburg, Inc.

IVD



96

REF 5140-1330

L2172FR Rev. 3



Le test ADN *digene* HC2 GC-ID, apposé du marquage CE, répond aux exigences de la directive 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*.

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|----|
| DÉSIGNATION ET APPLICATION | 1 |
| RÉSUMÉ ET DESCRIPTION DU TEST | 1 |
| PRINCIPE DE LA TECHNIQUE | 1 |
| RÉACTIFS ET MATÉRIEL FOURNIS | 3 |
| MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI | 4 |
| MISES EN GARDE ET MESURES DE PRÉCAUTION | 5 |
| CONSIGNES DE SÉCURITÉ | 5 |
| CONSEILS DE PRUDENCE | 6 |
| PRÉCAUTIONS D'EMPLOI | 6 |
| PRÉPARATION ET CONSERVATION DES RÉACTIFS | 7 |
| PRÉLÈVEMENT ET MANIPULATION DES ÉCHANTILLONS | 10 |
| ÉCHANTILLONS CERVICAUX EN STM | 10 |
| ÉCHANTILLONS CERVICAUX EN SOLUTION HOLOGIC PRESERVCYT | 11 |
| PROCÉDURE | 11 |
| TESTER UN GRAND NOMBRE D'ÉCHANTILLONS AVEC LE SYSTÈME RAPID CAPTURE | 11 |
| MÉTHODE MANUELLE | 11 |
| DÉNATURATION | 12 |
| Procédure De Preparation Des Calibrateurs, Des Controles De Qualite Et Des | |
| Echantillons En STM | 13 |
| Procédure De Preparation Des Echantillons En Solution PreservCyt | 14 |
| Etape D'arret Facultative | 18 |
| HYBRIDATION | 18 |
| CAPTURE DES HYBRIDES | 19 |
| DÉTECTION DES HYBRIDES | 20 |
| LAVAGE | 20 |
| Méthode De Lavage Avec Le Laveur Automatique De Microplaques : | |
| Méthode De Lavage Manuelle | 21 |
| AMPLIFICATION DU SIGNAL | 22 |
| CRITÈRES DE VÉRIFICATION DE LA CALIBRATION DU TEST | 22 |
| CALCUL DE LA VALEUR SEUIL | 24 |
| CONTRÔLE DE QUALITÉ | 24 |
| INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS DES ÉCHANTILLONS | 25 |
| LIMITES DE LA TECHNIQUE | 26 |
| RÉSULTATS ATTENDUS | 26 |
| PREVALENCE | 26 |
| VALEURS PREDICTIVES POSITIVES ET NEGATIVES | 27 |
| DISTRIBUTION DE LA FREQUENCE : RESULTATS RLU/CO DU TEST ADN <i>digene</i> HC2 GC-ID | 27 |
| PERFORMANCE DU TEST | 28 |
| RÉSULTATS DE L'ESSAI CLINIQUE PAR ÉCHANTILLON | 28 |
| REPRODUCTIBILITÉ | 32 |
| PRÉCISION | 33 |
| Précision Avec Des Echantillons En Solution PreservCyt | 34 |
| SENSIBILITÉ ANALYTIQUE | 35 |
| Considérations Supplémentaires Pour Les Prélèvements En Solution PreservCyt | 37 |
| SPÉCIFICITÉ ANALYTIQUE | 38 |
| HOMOLOGIE DES SONDAS AVEC L'ADN PLASMIDIQUE TOTAL ET L'ADN GÉNOMIQUE TOTAL | 41 |
| IMPACT DU SANG ET D'AUTRES SUBSTANCES SUR LES ÉCHANTILLONS EN STM | 41 |
| IMPACT DU SANG ET D'AUTRES SUBSTANCES SUR LES ÉCHANTILLONS EN SOLUTION | |
| PRESERVCYT | 42 |
| PRÉCISION À LA VALEUR SEUIL DU TEST <i>digene</i> HC2 GC-ID AVEC LES ÉCHANTILLONS CLINIQUES | |
| RECUEILLIS EN STM | 42 |
| INFORMATION SUR LA PHASE PRÉCÉDENTE | 43 |
| ÉQUIVALENCE ENTRE ÉCHANTILLONS EN STM ET ÉCHANTILLONS EN SOLUTION | |
| PRESERVCYT | 44 |

| | |
|---|-----------|
| RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 46 |
| GUIDE DES ERREURS..... | 47 |
| VÉRIFICATION DES CONTAMINATIONS | 52 |
| CONTACTER QIAGEN | 53 |
| RÉSUMÉ DU TEST ADN <i>digene</i> HC2 GC-ID | 54 |

DÉSIGNATION ET APPLICATION

Le test ADN *digene*[®] Hybrid Capture[®] 2 (HC2) GC-ID est un test d'hybridation moléculaire *in vitro* avec amplification du signal par chimiluminescence sur microplaque pour la détection qualitative de l'ADN de *Neisseria gonorrhoeae* dans les prélèvements cervicaux-utérins. Ces prélèvements cervicaux-utérins sont recueillis à l'aide du dispositif de prélèvement d'ADN *digene* HC2 (constitué d'une cytobrosse cervicale et du milieu de transport Specimen Transport Medium [STM] *digene*) et à l'aide du kit de prélèvement féminin avec écouvillon *digene* (écouvillon et STM) ou à l'aide d'un dispositif de prélèvement de type balai et placés dans une solution Hologic PreservCyt[®]. Le test ADN *digene* HC2 GC-ID est préconisé chez les femmes symptomatiques et asymptomatiques pour mettre en évidence une infection à *Neisseria gonorrhoeae* (GC).

Pour tester un grand nombre d'échantillons, le test ADN *digene* HC2 GC-ID peut être effectué en utilisant l'application du système Rapid Capture[®] System (RCS).

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* IVD

RÉSUMÉ ET DESCRIPTION DU TEST

Les *Neisseria gonorrhoeae* sont des diplocoques gram négatifs immobiles nécessitant des conditions de croissance assez complexes. Ce sont des bactéries aérobies, se développant de façon optimale dans un intervalle de température compris entre 35 et 37 °C en présence de 3 à 7 % de CO₂ et d'une humidité relative ≥ 70 %. Le diagnostic présomptif de *Neisseria gonorrhoeae* est traditionnellement obtenu en isolant les organismes à partir de cultures d'échantillons cliniques et en utilisant une coloration de Gram pour l'examen morphologique. Le diagnostic définitif peut être obtenu à l'aide d'un test de culture positif à l'oxydase et/ou à la catalase. Les tests de dégradation des glucides, d'agglutination et de fermentation du glucose sont des moyens supplémentaires de confirmer les résultats. Des tests plus définitifs et directs pour les *Neisseria gonorrhoeae* comprennent la détection d'antigène et les tests par sonde d'acide nucléique. Il a été démontré que la technique EIA est aussi sensible et aussi spécifique que la coloration de Gram pour détecter les gonocoques dans les échantillons urétraux mâles et les échantillons du premier jet d'urine, mais qu'elle est d'une sensibilité diminuée lorsqu'elle est appliquée aux échantillons endocervicaux.^{1, 2} Le test de détection d'antigène peut entraîner une réaction croisée avec les *Neisseria* commensaux et les espèces de la même famille³ ; par conséquent, ce test ne peut être utilisé que pour un diagnostic présomptif.³

Plus récemment, les tests d'hybridation moléculaire ont été utilisés pour évaluer les échantillons cliniques dans la détection des *Neisseria gonorrhoeae* dans des populations à haut risque. Ces tests ont été effectués avec des échantillons urétraux masculins et endocervicaux.

PRINCIPE DE LA TECHNIQUE

Le test ADN *digene* HC2 GC-ID utilisant la technologie *digene* Hybrid Capture 2 est un test d'hybridation moléculaire avec amplification du signal qui utilise une détection par chimiluminescence sur microplaque. Les échantillons contenant l'ADN cible s'hybrident avec une sonde ARN spécifique du type GC. Les hybrides ARN:ADN résultants sont capturés à la surface d'un puits de microplaque revêtu d'anticorps anti-hybrides ARN:ADN spécifiques. Les hybrides immobilisés réagissent ensuite avec des anticorps anti-hybrides ARN:ADN spécifiques conjugués à de la phosphatase alcaline et sont révélés par un substrat chimiluminescent. Chaque anticorps est conjugué à plusieurs molécules de phosphatase alcaline et de multiples anticorps conjugués se fixent sur chaque hybride capturé, conduisant à une amplification substantielle du signal. Quand le substrat est clivé par la phosphatase alcaline liée, une radiation lumineuse est émise qui peut être mesurée en unités RLU (Relative Light Units) par un luminomètre. L'intensité de la lumière émise indique la présence ou l'absence d'ADN cible dans l'échantillon.

Une intensité RLU égale ou supérieure au rapport spécifique par rapport à la valeur du seuil (CO) positif indique la présence d'ADN de GC dans l'échantillon. Une intensité RLU inférieure au rapport spécifique par rapport à la valeur du seuil positif indique, soit l'absence d'ADN de GC, soit que la quantité d'ADN de GC présente est inférieure au seuil de détection du test.

La sonde GC contient un mélange de sondes choisies spécifiquement pour éliminer ou réduire au maximum les réactions croisées avec les séquences ADN de cellules humaines, d'autres espèces bactériennes ou d'espèces de *Neisseria* autres que le *Neisseria gonorrhoeae*. La sonde GC fournie avec le test ADN *digene* HC2 GC-ID est complémentaire à l'ADN génomique de *Neisseria gonorrhoeae* ($1,9 \times 10^6$ pdb)⁴ sur environ 9 700 pdb soit 0,5 % de l'ADN génomique. Une sonde est complémentaire au plasmide cryptique de 4 200 pdb soit 100 % du plasmide.

Tester un grand nombre d'échantillons avec le test ADN *digene* HC2 GC-ID peut être effectué en utilisant un système de pipetage et de dilution automatique d'usage courant appelé le « Rapid Capture System » ou RCS. Cet appareil, qui utilise une application spécifique pour le test ADN *digene* HC2 GC-ID, peut traiter jusqu'à 352 échantillons en huit heures. Pour permettre le test d'un grand nombre d'échantillons, toutes les étapes de la procédure de test sont effectuées par le RCS, à l'exception de la dénaturation des échantillons, de la détection du signal chimiluminescent et du rapport des résultats.

RÉACTIFS ET MATÉRIEL FOURNIS

Un kit de test ADN *digene* HC2 GC-ID (REF 5140-1330) contient 96 tests. Le nombre de résultats patients variera suivant le nombre de séries faites par kit.

1 série = 88 résultats patients

2 séries = 80 résultats patients

3 séries = 72 résultats patients

4 séries = 64 résultats patients

| | |
|---|-------------|
| Indicateur coloré INDIC | 1 x 0,35 ml |
| Contient 0,05 % p/v d'azide de sodium. | |
| Réactif de dénaturation* REAG DENAT | 1 x 50 ml |
| Solution diluée d'hydroxyde de sodium (NaOH). | |
| Diluant de sonde* DIL PROBE | 1 x 5 ml |
| Solution tamponnée avec 0,05 % p/v d'azide de sodium. | |
| Sonde GC PROBE GC | 1 x 200 µl |
| Sonde ARN de GC en solution tamponnée. | |
| Calibrateur négatif CAL - | 1 x 2 ml |
| ADN porteur dans le STM avec 0,05 % p/v d'azide de sodium. | |
| Calibrateur positif (PC) GC CAL GC + | 1 x 1 ml |
| 1,0 pg/ml d'ADN de GC cloné et d'ADN porteur dans le STM avec 0,05 % p/v d'azide de sodium. | |
| Contrôle de qualité CT (QC CT) QC CT | 1 x 1 ml |
| 5,0 pg/ml d'ADN de CT cloné et d'ADN porteur dans le STM avec 0,05 % p/v d'azide de sodium. | |
| Contrôle de qualité GC (QC GC) QC GC | 1 x 1 ml |
| 5,0 pg/ml d'ADN de GC cloné et d'ADN porteur dans le STM avec 0,05 % p/v d'azide de sodium. | |
| Microplaque de capture PLATE CAPTURE | 1 de chaque |
| Revêtue d'anticorps polyclonaux caprins anti-hybrides ARN:ADN. | |
| Réactif de détection 1 REAG DET 1 | 1 x 12 ml |
| Anticorps anti-hybrides ARN:ADN conjugués à de la phosphatase alcaline en solution tamponnée avec 0,05 % p/v d'azide de sodium. | |
| Réactif de détection 2 REAG DET 2 | 1 x 12 ml |
| CDP-Star® avec Emerald II (substrat chimiluminescent). | |
| Tampon de lavage cocentré* BUF WASH X 30 | 1 x 100 ml |
| Contient 1,5 % d'azide de sodium. | |

*Voir la section Mises en garde et mesures de précaution de cette notice d'instructions pour connaître les informations relatives à l'hygiène et à la sécurité.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

Équipement et accessoires de diagnostic *in vitro* pour le système Hybrid Capture ^A

| | |
|---|---|
| <p><i>digene</i> Hybrid Capture 2 (HC2) System (Système <i>digene</i> Hybrid Capture 2) constitué d'un luminomètre approuvé par QIAGEN (« luminomètre »), d'un PC et de périphériques approuvés par QIAGEN (écran, clavier, souris, imprimante et câble d'imprimante), logiciel du système <i>digene</i> HC2 (« logiciel d'analyse du test <i>digene</i> »), protocoles de test du système <i>digene</i> HC2 pour CT/GC, logiciel LumiCheck Plate et manuel d'utilisation du logiciel du système <i>digene</i> HC2 Hybrid Capture Rotary Shaker I (Agitateur rotatif I, système Hybrid Capture)</p> <p>Hybrid Capture Microplate Heater I (Incubateur pour Microplaques I, système Hybrid Capture)</p> <p>Hybrid Capture Automated Plate Washer (Laveur Automatique de Microplaques, système Hybrid Capture)</p> <p>Hybrid Capture System Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 (Agitateur pour tube multi-échantillons MST Vortexer 2 du système Hybrid Capture) (facultatif)^B</p> <p>Portoir de conversion et couvercle pour portoir (facultatif pour l'utilisation manuelle, exigé pour l'utilisation du système Rapid Capture avec le test ADN <i>digene</i> HC2 GC-ID et les échantillons en solution PreservCyt)</p> <p>Portoir pour échantillons <i>digene</i> et couvercle pour portoir (facultatif pour l'utilisation manuelle, exigé pour l'utilisation du système Rapid Capture avec le test ADN <i>digene</i> HC2 GC-ID et les échantillons <i>digene</i> HC2 prélevés à l'aide du dispositif de prélèvement d'AND <i>digene</i> HC2)</p> <p>Pipette EXPAND-4TM et support (facultatif)^C</p> <p>Dispositif de prélèvement d'ADN <i>digene</i> HC2</p> | <p>Kit de prélèvement féminin avec écouvillon <i>digene</i> (constitué de 2 écouvillons et du STM <i>digene</i>)</p> <p>Distributeur de film étanche pour tube et cutter (facultatif, utilisé avec le MST Vortexer 2)</p> <p>Système Rapid Capture (facultatif pour l'analyse d'un grand nombre d'échantillons)^E</p> <p>Appareil de lavage</p> <p>Microplaques d'hybridation</p> <p>Couvercles pour microplaques</p> <p>Barrettes vides pour microplaques vides (disponibles auprès de Costar, modèle n°2581) (à utiliser en option avec le Laveur Automatique de Microplaques)</p> <p>Embouts pour pipette extra-longues pour le prélèvement des échantillons</p> <p>Tubes de prélèvement d'échantillons</p> <p>Portoir pour tubes de prélèvement d'échantillons</p> <p>Bouchons à vis pour tubes de prélèvement d'échantillons</p> <p>Réservoirs à réactif à usage unique</p> <p>Film étanche pour tube DuraSeal[®]</p> |
|---|---|

Équipement et accessoires de laboratoire d'usage courant

Bain-marie à 65 ± 2 °C, assez large pour recevoir un portoir de conversion (36 x 21 x 9 cm) ou deux portoirs pour échantillons *digene* (31,7 x 15,2 x 6,4 cm chacun)

Microcentrifugeuse (facultatif, pour centrifuger les flacons de sonde afin d'obtenir un volume de sonde maximal)

Agitateur Vortex avec attaches de puits

Micropipette monocanal à volume variable de 20 à 200 µl et de 200 à 1000 µl

Pipette à déplacement positif répété de type pipette Eppendorf Repeater[®] ou pipette équivalente

Pipette à 8 canaux à volume variable de 25 à 200 µl

Chronomètre

Solution d'hypochlorite de sodium d'une concentration finale de 0,5 %, (ou eau de javel à usage domestique)

Parafilm[®] ou film étanche équivalent

Embouts à usage unique pour pipette avec filtre aérosol pour pipette monocanal (de 20 à 200 µl et de 200 à 1000 µl)

Embouts à usage unique pour pipette Eppendorf Repeater[®] (25 et 500 µl)

Embouts à usage unique pour pipette à 8 canaux (de 25 à 200 µl)

Essuie-tout Kimtowels[®] ou papier absorbant faiblement pelucheux équivalent

Revêtement de paille à usage unique

Gants sans talc

Tubes en polypropylène à fond rond et bouchon pressoir de 5 ml et/ou de 15 ml (pour la dilution de la sonde)

Tubes à microcentrifuger de 2,0 ml en polypropylène avec bouchons

Équipement et accessoires supplémentaires pour le traitement des échantillons en solution PreservCyt

Centrifugeuse équipée d'un rotor libre capable d'atteindre 2900 ± 150 x g et de recevoir des tubes à centrifuger coniques en polypropylène de 10 ml ou de 15 ml

Pipettes sérologiques ou pipettes de transfert de 5 ml

Kit de conversion d'échantillons *digene* HC2^A

Embouts jetables pour pipette Eppendorf Repeater (50 et 100 µl)

Pour la procédure de vortexage manuelle

Tubes de conversion d'échantillons *digene* HC2 (coniques, 15 ml)^F, tubes coniques de 10 ml Sarstedt[®] avec bouchon ou tubes à centrifuger de 15 ml en polypropylène à fond conique de marque VWR[®] ou Corning[®] avec bouchons

Portoir pour tubes coniques de 10 ml ou de 15 ml

Pour la procédure utilisant le MST Vortexer 2

Tubes de conversion d'échantillons *digene* HC2 (coniques, 15 ml)^F

Multi-Specimen (MST) Vortexer 2 (Agitateur pour tubes multi-échantillons)

Portoir de conversion et son couvercle (spécifique pour les tubes coniques de 15 ml)

Distributeur de film étanche pour tube et cutter

Film étanche pour tube DuraSeal (utilisé avec le MST Vortexer 2)

^A Seul l'équipement et les accessoires validés pour les tests ADN *digene* HC2 CT/GC sont disponibles auprès de QIAGEN.

^B Utilisation également nécessaire lors de l'utilisation de l'application RCS semi-automatique.

^C Accessoires sur commande. D'autres pipettes multicanaux pouvant être agrandies sur commande peuvent être utilisées, à condition qu'un espace de 3,2 cm puisse être aménagé entre les embouts lorsque la pipette est agrandie. Un autre choix consiste à utiliser une pipette monocanal pouvant effectuer un pipetage de 75 µl.

^D La performance du test ADN *digene* HC2 GC-ID a été établie uniquement avec les kits de prélèvement indiqués.

^E Se référer au *manuel d'utilisation du système Rapid Capture* pour obtenir des instructions spécifiques sur l'utilisation de ce système pour tester un grand volume d'échantillons avec ce test.

^F Afin d'assurer une bonne performance du test lors de l'utilisation de la procédure avec le MST Vortexer 2, vous devez utiliser les tubes de conversion d'échantillons *digene* HC2 (de marque VWR ou Corning®) disponibles auprès de QIAGEN.

MISES EN GARDE ET MESURES DE PRÉCAUTION

LIRE ATTENTIVEMENT L'INTÉGRALITÉ DES INSTRUCTIONS AVANT D'EFFECTUER LE TEST.

CONSIGNES DE SÉCURITÉ

TOUS LES ÉCHANTILLONS doivent être considérés comme potentiellement infectieux. Il n'existe aucune méthode de test connue pouvant totalement garantir que les échantillons ne transmettront pas d'infection. Il est recommandé que les échantillons humains soient manipulés conformément aux pratiques de sécurité biologique en vigueur sur le plan régional et national.^{5, 6, 7, 8} Ces pratiques doivent être suivies lors de la manipulation de substances qui contiennent ou pourraient contenir des agents infectieux. Ces précautions d'emploi comprennent celles indiquées ci-dessous, mais ne sont pas limitées à celles-ci :

1. Ne pas pipeter à la bouche.
2. Ne pas fumer, manger ou boire dans les lieux où les réactifs ou les échantillons sont manipulés.
3. Porter des gants jetables sans talc pendant la manipulation des réactifs ou des échantillons. Se laver les mains soigneusement après avoir effectué le test.
4. Nettoyer et désinfecter toute substance renversée issue d'un échantillon à l'aide d'un désinfectant tuberculocide, par exemple une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5 % v/v ou un autre désinfectant adéquat.^{9, 10}
5. Décontaminer et jeter tout échantillon, réactif et tout autre matériel potentiellement contaminé conformément aux normes nationales et régionales.^{11, 12}

Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium dont la présence dans les canalisations de laboratoire a été signalée comme pouvant former de l'azide de plomb ou de cuivre. Ces azides peuvent exploser en cas de percussion comme, par exemple, le martelage. Après avoir jeté des solutions contenant de l'azide de sodium, rincer à grande eau les canalisations de façon à empêcher la formation d'azide de plomb ou de cuivre. Afin de décontaminer de vieilles canalisations pouvant avoir accumulé de l'azide, le National Institute for Occupational Safety and Health recommande de : (1) siphonner le liquide à l'aide d'un tuyau en caoutchouc ou en plastique, (2) remplir d'une solution d'hydroxyde de sodium à 10 % v/v, (3) laisser reposer pendant 16 heures, et (4) rincer à grande eau.

CONSEILS DE PRUDENCE

Les substances ci-dessous ont été évaluées conformément aux exigences des directives européennes 2001/59/CE et 99/45/CE.



T

Tampon de lavage concentré. Contient de l'azide de sodium : toxique (T)

R25 : Toxique en cas d'ingestion.

S2/3 : Nocif pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique.

S36/37/39 : Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage.

S45 : En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible, lui montrer l'étiquette).



C

Réactif de dénaturation. Contient de l'hydroxyde de sodium : corrosif (C)

R35 : Provoque de graves brûlures.

S26 : En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.

S36/37/39 : Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage.

S45 : En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible, lui montrer l'étiquette).



Xi

Diluant de sonde. Contient du BES et de l'acide acétique : irritant (Xi)

R36/38 : Irritant pour les yeux et la peau.

S26 : En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.

S36/37/39 : Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage.

INFORMATIONS D'URGENCE 24 HEURES SUR 24

DES INFORMATIONS MÉDICALES D'URGENCE EN ANGLAIS, FRANÇAIS ET ALLEMAND PEUVENT ÊTRE OBTENUES 24 HEURES SUR 24 AUPRÈS DU :

CENTRE D'INFORMATION ANTIPOISON, MAYENCE, ALLEMAGNE

TÉL : +49-6131-19240

Se référer au *Manuel d'utilisation du système Rapid Capture* pour obtenir des mises en garde et des mesures de précaution supplémentaires spécifiques à l'utilisation de ce système pour tester un grand nombre d'échantillons avec ce test.

PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

1. Pour utilisation en diagnostic *in vitro*.
2. La cytobrosse ne peut pas être utilisée chez les femmes enceintes.
3. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption figurant à côté du symbole  situé sur l'étiquette du conditionnement extérieur.
4. Effectuer les tests en dehors des temps et des températures indiqués peut fausser les résultats. Les tests résultants seront invalides et devront être recommencés.
5. La procédure du test ADN *digene* HC2 GC-ID, les critères de vérification de la calibration du test, le contrôle de qualité et l'interprétation des résultats des échantillons doivent être suivis à la lettre pour obtenir des résultats fiables.

6. Il est important de pipeter le volume exact de réactif indiqué et de bien mélanger après chaque ajout de réactif. Le non-respect de cette règle pourrait entraîner des résultats erronés. Le changement de coloration attendu assurera que ces conditions sont respectées.
7. Ces composants ont été testés en lot. **Ils ne sont pas interchangeables** avec des composants provenant de sources ou de lots différents.
8. Les acides nucléiques sont facilement dégradables par les nucléases environnantes. Des nucléases sont présentes sur la peau humaine et sur les surfaces ou matériaux manipulés. Nettoyer et couvrir les plans de travail avec des protections jetables **et porter des gants sans talc pendant toutes les étapes du test.**
9. Prendre soin d'éviter toute contamination des microplaques de capture et du réactif de détection 2 par la phosphatase alcaline exogène lorsque le test est effectué. Le réactif de détection 1, les bactéries, la salive, les cheveux et les sécrétions cutanées font partie des substances pouvant contenir de la phosphatase alcaline. **Il est très important de couvrir la microplaque de capture après le lavage et durant l'incubation du réactif de détection 2, car la phosphatase alcaline exogène peut réagir avec le réactif de détection 2 et provoquer des faux positifs.**
10. Éviter d'exposer le réactif de détection 2 à la lumière de façon prolongée. Utiliser le réactif dans les délais indiqués immédiatement après avoir pris un aliquot et le protéger de toute lumière intense et directe.
11. La pipette à répétition doit être préparée à l'avance avec le réactif à distribuer et doit être vérifiée périodiquement afin d'éviter la présence de grandes bulles d'air. Un nombre excessif de grandes bulles d'air dans l'embout de la pipette à répétition peut entraîner des distributions inexactes. Ceci pourra être évité en amorçant plusieurs fois la pipette. Se reporter au manuel technique de pipette employée.
12. La distribution des réactifs de détection 1 et 2 avec une pipette multicanaux peut être réalisée en utilisant la méthode de pipetage inversé (voir la section *Détection des hybrides*). Vérifier que chaque embout de la pipette multicanaux est bien engagé et correctement rempli.
13. S'assurer que chaque micropuits est soigneusement lavé selon les instructions de lavage du manuel. Un lavage inadéquat entraînera un bruit de fond plus élevé et pourrait entraîner des faux positifs. Toute trace résiduelle de tampon de lavage dans les puits pourrait entraîner une diminution du signal et une faible reproductibilité.
14. S'il est froid, laisser l'Incubateur pour Microplaques I Hybrid Capture System s'équilibrer à 65 °C ± 2 °C pendant au moins 60 minutes. La microplaque d'hybridation peut fondre si ce délai n'est pas respecté. Se reporter au manuel d'utilisation de l'Incubateur pour Microplaques I pour plus de détails.

PRÉPARATION ET CONSERVATION DES RÉACTIFS

1. Dès réception, conserver le kit entre 2 et 8 °C. Le tampon de lavage concentré, le réactif de dénaturation et l'indicateur coloré peuvent être conservés entre 2 et 30 °C, suivant les besoins.
2. Ne pas utiliser après la date de péremption inscrite à côté du symbole  situé sur l'étiquette du conditionnement extérieur, ou après la date de péremption des réactifs préparés (voir ci-dessous).
3. Excepté le réactif de dénaturation, le mélange de sondes GC et le tampon de lavage, tous les réactifs sont fournis prêts à l'emploi.

Se référer au *manuel d'utilisation du système Rapid Capture* pour la préparation du mélange de sondes GC, du tampon de lavage et des réactifs de détection 1 et 2 car les instructions de ce manuel sont spécifiques à l'utilisation de ce système pour tester un grand nombre d'échantillons.

Méthode de préparation des réactifs

| <p>Réactif de dénaturation</p> | <p>À PRÉPARER EN PREMIER : Ajouter 5 gouttes d'indicateur coloré dans le flacon du réactif de dénaturation, et mélanger soigneusement. Le réactif de dénaturation doit être de coloration uniforme violet foncé.</p> <p>Une fois préparé, le réactif de dénaturation est stable pendant trois mois si on le conserve entre 2 et 8 °C. Inscrire la nouvelle date de péremption sur l'étiquette. Si la coloration s'atténue, ajouter 3 gouttes supplémentaires d'indicateur coloré et mélanger soigneusement avant emploi.</p> <p>Mise en garde : le réactif de dénaturation est corrosif. Porter un vêtement de protection approprié, des gants et des lunettes/une protection faciale. Manipuler avec précaution.</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---|-------------------------|-----------------------------|------------------|-------|--------|----------|------|--------|----------|------|--------|---------|------|--------|---------|-----------|----------|--------|
| <p>Mélange de sondes GC (préparé à partir des réactifs sonde GC et du diluant de sonde)</p> | <p>À PRÉPARER LORS DE L'ÉTAPE D'INCUBATION DE LA DÉNATURATION DES ÉCHANTILLONS : IMPORTANT : LA SONDE SE DÉPOSE PARFOIS DANS LE BOUCHON DU FLACON.</p> <p>Remarque : Faire preuve d'extrême précaution à cette étape de la préparation afin d'éviter une contamination de la sonde et du mélange de sondes par de la RNase. Utiliser des embouts pour pipette avec filtre aérosol pour pipeter la sonde. Le diluant de sonde est visqueux. S'assurer que le mélange est effectué avec beaucoup de soin lors de la préparation du mélange de sondes GC. Un tourbillon visible doit se former dans le liquide lors du mélange. Un mélange incomplet peut entraîner une réduction du signal.</p> <ul style="list-style-type: none"> Centrifuger le flacon de sonde GC brièvement afin d'attirer le liquide dans le fond du flacon. Tapoter légèrement pour mélanger. Déterminer le volume de mélange de sondes nécessaire (25 µl/test). Il est recommandé de préparer du mélange de sondes supplémentaire pour tenir compte du volume qui peut être perdu dans les embouts de pipette ou sur les bords du flacon. Se référer à la liste des volumes ci-dessous. Le plus petit nombre de puits recommandé pour chaque série est de 24. Si l'on a besoin de moins de 24 puits par test, le nombre total de tests par kit sera diminué du fait des volumes limités de sonde et de diluant de sonde. Transférer le volume de diluant de sonde nécessaire dans un nouveau récipient jetable. Selon le nombre de tests, un tube en polypropylène à fond rond et bouchon presseur de 5 ml ou de 15 ml est recommandé. Diluer la sonde GC au 1/25 avec le diluant de sonde pour préparer le mélange de sondes. <table border="1" data-bbox="597 884 1305 1066"> <thead> <tr> <th>Nbre de Tests/Barrettes</th> <th>Volume de Diluant de sonde*</th> <th>Volume de sonde*</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>96/12</td> <td>4,0 ml</td> <td>160,0 µl</td> </tr> <tr> <td>72/9</td> <td>3,0 ml</td> <td>120,0 µl</td> </tr> <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>Par puits</td> <td>0,045 ml</td> <td>1,8 µl</td> </tr> </tbody> </table> <p>*Ces valeurs incluent le volume supplémentaire recommandé.</p> <ul style="list-style-type: none"> Pipeter la sonde dans le diluant de sonde en plaçant l'embout de la pipette contre la surface interne du tube juste au-dessus du ménisque et en déchargeant son contenu. Ne pas immerger l'embout dans le diluant de sonde. Vortexer pendant au moins 5 secondes à vitesse maximale afin de parfaitement mélanger. Un tourbillon visible doit se produire. Étiqueter avec la mention « Mélange de sondes GC » et le conserver dans un récipient fermé jusqu'à l'emploi. Jeter le mélange de sondes inutilisé. | Nbre de Tests/Barrettes | Volume de Diluant de sonde* | Volume de sonde* | 96/12 | 4,0 ml | 160,0 µl | 72/9 | 3,0 ml | 120,0 µl | 48/6 | 2,0 ml | 80,0 µl | 24/3 | 1,0 ml | 40,0 µl | Par puits | 0,045 ml | 1,8 µl |
| Nbre de Tests/Barrettes | Volume de Diluant de sonde* | Volume de sonde* | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 96/12 | 4,0 ml | 160,0 µl | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 72/9 | 3,0 ml | 120,0 µl | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 48/6 | 2,0 ml | 80,0 µl | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 24/3 | 1,0 ml | 40,0 µl | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Par puits | 0,045 ml | 1,8 µl | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| Tampon de lavage | <p>À PRÉPARER LORS DE L'ÉTAPE DE CAPTURE :</p> <p>Pour le Laveur Automatique de Microplaques, le tampon de lavage peut être préparé comme décrit ci-dessous et conservé dans un récipient couvert, ou il peut être préparé par 1 litre à la fois et placé dans les réservoirs du Laveur Automatique de Microplaques. Voir le tableau ci-dessous pour les volumes de mélange.</p> <p>Voir le manuel d'utilisation du Laveur Automatique de Microplaques pour les instructions relatives aux soins et à l'entretien.</p> <p>Attention : Le tampon de lavage concentré est toxique en cas d'ingestion. Porter un vêtement de protection approprié, des gants et des lunettes/une protection faciale. Afin de s'exposer le moins possible, ajouter de l'eau au tampon de lavage concentré lors de la préparation.</p> <table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;"><u>Volume de tampon de lavage concentré</u></th> <th style="text-align: center;"><u>Volume d'eau distillée ou déminéralisée</u></th> <th style="text-align: center;"><u>Volume final de tampon de lavage</u></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">33,3 ml</td> <td style="text-align: center;">966,7 ml</td> <td style="text-align: center;">1 L</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">66,6 ml</td> <td style="text-align: center;">1.933,4 ml</td> <td style="text-align: center;">2 L</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">100,0 ml</td> <td style="text-align: center;">2.900,0 ml</td> <td style="text-align: center;">3 L</td> </tr> </tbody> </table> <p>Remarque : il est très important de maintenir le Laveur Automatique de Microplaques sous tension en permanence. Cela permet au rinçage d'entretien de se mettre en marche après huit heures d'inutilisation.</p> <p>Avant chaque test, s'assurer que le réservoir des déchets du Laveur Automatique de Microplaques est vide et que le réservoir de rinçage est rempli d'eau distillée ou déminéralisée.</p> <p>Voir le manuel d'utilisation du Laveur Automatique de Microplaques pour les instructions relatives aux soins et à l'entretien.</p> <p>Pour la méthode de lavage manuelle des microplaques :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bien mélanger le tampon de lavage concentré. • Diluer 100 ml de tampon de lavage concentré dans 2,9 litres d'eau distillée ou déminéralisée et bien mélanger (le volume final doit être de 3 litres). • Fermer le récipient afin d'éviter toute contamination ou évaporation. <p>Une fois préparé, le tampon de lavage est stable pendant 3 mois entre 2 et 30 °C. L'étiqueter avec la nouvelle date de péremption. Si le tampon de lavage a été réfrigéré, il doit être équilibré entre 20 et 25 °C avant utilisation.</p> <p>Il est recommandé de laver l'appareil de lavage et les tubulures avec une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5 % et de les rincer soigneusement avec de l'eau distillée ou déminéralisée une fois par trimestre afin d'éviter une contamination potentielle par la phosphatase alcaline présente dans les bactéries et les moisissures.</p> | <u>Volume de tampon de lavage concentré</u> | <u>Volume d'eau distillée ou déminéralisée</u> | <u>Volume final de tampon de lavage</u> | 33,3 ml | 966,7 ml | 1 L | 66,6 ml | 1.933,4 ml | 2 L | 100,0 ml | 2.900,0 ml | 3 L |
|---|--|---|--|---|---------|----------|-----|---------|------------|-----|----------|------------|-----|
| <u>Volume de tampon de lavage concentré</u> | <u>Volume d'eau distillée ou déminéralisée</u> | <u>Volume final de tampon de lavage</u> | | | | | | | | | | | |
| 33,3 ml | 966,7 ml | 1 L | | | | | | | | | | | |
| 66,6 ml | 1.933,4 ml | 2 L | | | | | | | | | | | |
| 100,0 ml | 2.900,0 ml | 3 L | | | | | | | | | | | |

Volumes pour les réactifs prêts à l'emploi

| Réactifs de détection 1 et 2 | <p>IMMÉDIATEMENT AVANT UTILISATION :</p> <p>Mélanger complètement le réactif, puis <u>mesurer</u> soigneusement le volume approprié de réactif de détection 1 ou de réactif de détection 2 dans un réservoir à réactif propre en suivant les indications données ci-dessous. Afin d'éviter une contamination, ces réactifs NE DOIVENT PAS être replacés dans leurs flacons d'origine. Jeter le matériel inutilisé après la procédure. Si on n'utilise pas une pipette à 8 canaux, une pipette à répétition appropriée peut lui être substituée. Dans ce cas-là, les aliquots du réactif devront être effectués dans un tube en polypropylène de taille suffisante pour contenir le volume nécessaire indiqué ci-dessous.</p> <table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;"><u>Nbre de Tests/Barrettes</u></th> <th style="text-align: center;"><u>Volume de réactif de détection 1 ou 2</u></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">96/12</td> <td style="text-align: center;">contenu du flacon</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">72/9</td> <td style="text-align: center;">7,0 ml</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">48/6</td> <td style="text-align: center;">5,0 ml</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">24/3</td> <td style="text-align: center;">3,0 ml</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1 test</td> <td style="text-align: center;">0,125 ml</td> </tr> </tbody> </table> | <u>Nbre de Tests/Barrettes</u> | <u>Volume de réactif de détection 1 ou 2</u> | 96/12 | contenu du flacon | 72/9 | 7,0 ml | 48/6 | 5,0 ml | 24/3 | 3,0 ml | 1 test | 0,125 ml |
|-------------------------------------|---|--------------------------------|--|-------|-------------------|------|--------|------|--------|------|--------|--------|----------|
| <u>Nbre de Tests/Barrettes</u> | <u>Volume de réactif de détection 1 ou 2</u> | | | | | | | | | | | | |
| 96/12 | contenu du flacon | | | | | | | | | | | | |
| 72/9 | 7,0 ml | | | | | | | | | | | | |
| 48/6 | 5,0 ml | | | | | | | | | | | | |
| 24/3 | 3,0 ml | | | | | | | | | | | | |
| 1 test | 0,125 ml | | | | | | | | | | | | |

PRÉLÈVEMENT ET MANIPULATION DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons cervicaux recueillis et transportés en utilisant le dispositif de prélèvement d'ADN *digene* HC2 (constitué d'une cytobrosse et du SMT *digene* et le kit de prélèvement féminin avec écouvillon *digene* (écouvillon et STM *digene*) ou les prélèvements collectés en utilisant un dispositif de prélèvement de type balai et placés dans de la solution Hologic PreservCyt sont les seuls types de prélèvements cervicaux recommandés pour le test ADN *digene* HC2 GC-ID. Les échantillons recueillis par d'autres systèmes de prélèvement ou transportés dans d'autres milieux de transport n'ont pas été validés pour être testés par cette méthode. La performance de ce kit a été établie uniquement pour les kits de prélèvement indiqués. Les échantillons cervicaux doivent être recueillis avant l'application d'acide acétique ou d'iode nécessaire à un examen colposcopique. Pour plus d'informations concernant les procédures de prélèvement et de manipulation des échantillons, consulter la notice du dispositif de prélèvement d'ADN *digene* HC2.

ÉCHANTILLONS CERVICAUX DANS LE STM

Les échantillons dans le STM peuvent être conservés pendant deux semaines à température ambiante et expédiés sans réfrigération au laboratoire. Les échantillons doivent être expédiés dans un conteneur calorifugé soit sur la nuit, soit dans les 48 heures. Au laboratoire, les échantillons doivent être conservés entre 2 et 8 °C s'ils doivent être testés dans la semaine qui suit. Si le test doit être différé, ils doivent être conservés à -20 °C pour une durée maximum de 3 mois. Un conservateur a été ajouté au STM *digene* de façon à retarder la croissance bactérienne et pour maintenir l'intégrité de l'ADN. **Il n'est pas destiné** à maintenir la viabilité des organismes ou des cellules. Les échantillons recueillis dans le STM *digene* ne peuvent pas être utilisés pour effectuer des cultures pour d'autres méthodes de test.

Des tests effectués sur 90 échantillons cliniques simulés ont permis de conclure que les échantillons dans le STM peuvent être conservés pendant 2 semaines à température ambiante et pendant une semaine supplémentaire entre 2 et 8 °C. Ces 90 échantillons comprenaient 40 échantillons contenant de faibles concentrations en organismes GC [à la limite ou proche de la limite de détection du test (LOD)], 35 échantillons de positivité modérée (approximativement 2 à 5 fois la LOD) et 5 échantillons de positivité élevée dépassant 10 fois la LOD. Les 10 échantillons restants étaient négatifs pour GC. Cependant, 5 d'entre eux contenaient un nombre élevé d'organismes GC. Les estimations de la performance du test sont basées sur des échantillons conservés entre 2 et 8 °C ou bien congelés et testés dans un délai de 1 à 2 semaines après le prélèvement.

Remarques :

1. Un aliquot non dénaturé de chacun des 90 échantillons a été soumis à des températures extrêmes dans le but de simuler les conditions de transport (conservation à -20 °C pendant 3 jours, puis à 50 °C pendant 5 jours, puis 2 semaines supplémentaires à température ambiante). Bien qu'on ait observé une perte de signal (RLU/CO) après 8 jours dans ces conditions, l'interprétation qualitative des résultats n'a pas été affectée. Après une incubation supplémentaire pendant 2 semaines à température ambiante, des différences qualitatives ont été observées sur les échantillons contenant de faibles taux en organismes.
2. Afin de maintenir les bouchons des tubes de prélèvement durant le transport et la conservation des échantillons congelés, suivre les recommandations suivantes :
 - Couvrir les bouchons des échantillons préalablement congelés de Parafilm® avant l'envoi. Les échantillons peuvent être expédiés congelés ou à une température comprise entre 20 et 25 °C.
 - Lorsque les échantillons sont retirés du congélateur avant le test, remplacer immédiatement le bouchon existant par un bouchon à vis.
3. Le dispositif de prélèvement d'ADN *digene* HC2 ne doit pas être utilisé chez les femmes enceintes. Chez les femmes enceintes, recueillir les échantillons uniquement à l'aide du kit de prélèvement féminin avec écouvillon *digene*.

ÉCHANTILLONS CERVICAUX EN SOLUTION HOLOGIC PRESERVCYT

Les échantillons recueillis en utilisant un dispositif de prélèvement de type balai et placés dans de la solution Hologic PreservCyt pour être utilisés dans la fabrication des lames de test Hologic ThinPrep Pap[®] peuvent être utilisés avec le test ADN *digene* HC2 GC-ID. Les échantillons doivent être collectés de la manière habituelle et les lames de test ThinPrep Pap préparées conformément aux instructions de Hologic.

Les échantillons en solution PreservCyt peuvent être maintenus pendant un mois maximum à température ambiante (20 à 25 °C) après le prélèvement et avant leur traitement en vue du test ADN *digene* HC2 GC-ID. Ne pas congeler les échantillons en solution PreservCyt. Pour traiter ces échantillons, se référer à la *Procédure de préparation des échantillons en solution PreservCyt*.

PROCÉDURE

Les échantillons peuvent contenir des agents infectieux et doivent donc être manipulés avec les précautions appropriées. Le test ADN *digene* HC2 GC-ID peut être effectué manuellement suivant les instructions de la présente notice ou en utilisant le système Rapid Capture pour tester un grand nombre d'échantillons.

TESTER UN GRAND NOMBRE D'ÉCHANTILLONS AVEC LE SYSTÈME RAPID CAPTURE

Le système Rapid Capture est un système de pipetage et de dilution automatique d'usage courant qui peut être utilisé avec le test ADN *digene* HC2 GC-ID pour tester un grand nombre d'échantillons. Ce système traite jusqu'à 352 échantillons en huit heures, durée pendant laquelle une période de 3,5 heures ne requiert aucune intervention de la part de l'utilisateur ; il peut produire jusqu'à 704 résultats d'échantillons en 13 heures. La dénaturation des échantillons précédant le test est effectuée indépendamment du RCS, dans le tube de prélèvement principal (comme avec la méthode manuelle du test ADN *digene* HC2 GC-ID décrite ci-dessous) avant de les placer sur la plate-forme du RCS. De surcroît, la détection du signal chimiluminescent et le rapport des résultats sont réalisés en utilisant le luminomètre approuvé par QIAGEN en mode manuel commun aux deux méthodes, manuelle et RCS. Chacune des étapes de la procédure du test ADN *digene* HC2 GC-ID est effectuée en suivant exactement la même séquence que pour la procédure de test manuelle. L'application RCS permet d'effectuer le traitement échelonné de 4 microplaques, chaque plaque contenant les échantillons, les Calibrateurs et les Contrôles de qualité nécessaires pour le test.

Lors de l'utilisation du système Rapid Capture, outre la consultation de la présente notice, se reporter au *Manuel d'utilisation du système Rapid Capture* fourni avec l'appareil pour des informations relatives à la description et à la procédure nécessaires.

MÉTHODE MANUELLE

Mise en place

1. Lorsque l'Incubateur pour Microplaques I est à l'arrêt et doit être utilisé, prévoir au moins 60 minutes pour l'équilibrage de la température à 65 ± 2 °C. Pour plus de détails, consulter le *Manuel d'utilisation de l'Incubateur de Microplaques*.
2. S'assurer que le bain-marie est à 65 °C et que le niveau d'eau est suffisant pour couvrir entièrement le volume d'échantillon contenu dans les tubes de prélèvement.
3. Retirer du réfrigérateur les échantillons et **tous** les réactifs nécessaires **avant de commencer le test**. Les laisser s'équilibrer à 20 à 25 °C pendant 15 à 30 minutes.
4. Créer un schéma de répartition du test en utilisant le logiciel d'analyse du test *digene* et les protocoles de test *digene* pour GC. Pour plus d'informations, consulter le manuel d'utilisation du logiciel correspondant.

5. Pour chaque test, le Calibrateur négatif, le Calibrateur positif et les Contrôles de qualité doivent être préparés **sur-le-champ**. Bien mélanger les Calibrateurs et les Contrôles de qualité. En cas d'utilisation du MST Vortexer 2, retirer 500 µl de chacun des Calibrateurs et des Contrôles de qualité et les placer dans des tubes de prélèvement d'échantillons vides et correctement étiquetés. L'autre méthode consiste à retirer 200 µl de chacun des Contrôles et des Calibrateurs et à les placer dans des tubes à microcentrifuger de 2 ml en polypropylène.
6. **Le Calibrateur négatif et le Calibrateur positif doivent être testés EN PREMIER** en triple pour chaque lot d'échantillons testés. Les Contrôles de qualité et les échantillons doivent être testés en simple. Les Calibrateurs, Contrôles de qualité et échantillons doivent être testés selon une configuration de colonnes constituées de huit micropuits, de manière à ce que les réplicats du Calibrateur Négatif (NC) soient placés en A1, B1, C1 ; le Calibrateur Positif (PC) en D1, E1, F1 ; le QC CT en G1 ; le QC GC en H1 ; puis les échantillons commençant en A2. Voir un exemple de schéma ci-dessous. Consulter le manuel d'utilisation du luminomètre approuvé par QIAGEN ainsi que le manuel d'utilisation du logiciel d'analyse du test *digene* pour des informations sur la configuration appropriée des Calibrateurs, des Contrôles de qualité et des échantillons dans le logiciel.

EXEMPLE DE SCHÉMA POUR UN TEST UTILISANT 24 MICROPUIITS :

| Rangée | Colonne | | |
|--------|---------|----------|-----------|
| | 1 | 2 | 3 |
| A | NC | Échan. 1 | Échan. 9 |
| B | NC | Échan. 2 | Échan. 10 |
| C | NC | Échan. 3 | Échan. 11 |
| D | PC | Échan. 4 | Échan. 12 |
| E | PC | Échan. 5 | Échan. 13 |
| F | PC | Échan. 6 | Échan. 14 |
| G | QC CT | Échan. 7 | Échan. 15 |
| H | QC GC | Échan. 8 | Échan. 16 |

DÉNATURATION

Remarques :

- **Attention** : le réactif de dénaturation est corrosif. Porter un vêtement de protection approprié, des gants et des lunettes/une protection faciale. Utiliser avec précaution et porter des gants sans talc lors de la manipulation.
- **Important** : certains prélèvements cervicaux peuvent contenir du sang ou d'autres composants biologiques qui peuvent masquer les changements de coloration lors de l'ajout du réactif de dénaturation. Les échantillons présentant une coloration foncée avant l'ajout du réactif de dénaturation peuvent ne pas donner les changements de coloration attendus à ces étapes, mais les résultats du test n'en seront pas affectés. Un mélange correct peut être vérifié en observant les changements de coloration des Calibrateurs et des Contrôles de qualité.
- Pendant l'étape de dénaturation, s'assurer que le niveau d'eau du bain-marie est suffisant pour couvrir la totalité du volume d'échantillon contenu dans le tube.
- Les échantillons peuvent être préparés pendant l'étape de dénaturation, puis conservés entre 2 et 8 °C pendant une nuit ou à -20 °C pour une durée maximum de 3 mois. Ils ne doivent subir que 3 cycles de congélation/décongélation, avec une durée maximum de 2 heures à température ambiante pendant chaque cycle de décongélation. Bien mélanger avant l'utilisation.
- Les Calibrateurs et les Contrôles de qualité peuvent être préparés pendant l'étape de dénaturation, puis conservés entre 2 et 8 °C pendant une nuit, **mais ils ne peuvent pas être congelés**. Si les Calibrateurs et les Contrôles de qualité ont été congelés, ils doivent être jetés.

- Après dénaturation et incubation, les échantillons ne sont plus considérés comme infectieux.¹³ Cependant, le personnel de laboratoire devra continuer à se conformer aux précautions de sécurité en vigueur sur le plan régional et national.

PROCÉDURE DE PRÉPARATION DES CALIBRATEURS, DES CONTRÔLES DE QUALITÉ ET DES ÉCHANTILLONS DANS LE STM

Remarques :

- Ne pas retirer le dispositif de prélèvement des échantillons avant la dénaturation.
 - Pour éviter les faux positifs, il est essentiel que tous les Calibrateurs, Contrôles de qualité et substances des échantillons dans le STM soient en contact avec le réactif de dénaturation. Le mélange effectué après l'ajout du réactif de dénaturation est une étape capitale : **assurez-vous que le MST Vortexer 2 est réglé sur 100 (vitesse maximale) et que l'on observe un tourbillon de liquide visible pendant le mélange, de sorte que le liquide lave la totalité de la surface interne du tube. En cas de vortexage manuel, assurez-vous que chaque Calibrateur, Contrôle de qualité et échantillon est mélangé individuellement en les vortexant chacun pendant au moins 5 secondes à vitesse maximale de manière à ce que le tourbillon de liquide nettoie toute la surface interne du tube, puis retourner le tube une fois.**
1. Retirer et jeter les bouchons des tubes des Calibrateurs, des Contrôles de qualité, et des échantillons dans le STM.
Remarque : Les bouchons retirés des tubes d'échantillons sont considérés comme potentiellement infectieux. Les jeter conformément aux réglementations nationales et régionales en vigueur.
 2. Distribuer le réactif de dénaturation contenant l'indicateur coloré dans chaque Calibrateur, Contrôle de qualité ou échantillon dans le STM en utilisant une pipette réglable ou à répétition. Prendre soin de ne pas toucher les parois du tube pour éviter les contaminations croisées entre échantillons. Le volume de réactif de dénaturation nécessaire est équivalent à la moitié du volume de l'échantillon. Le volume exact pour chaque type de Calibrateur, de Contrôle de qualité et d'échantillon est reporté dans le tableau ci-dessous.
 - **Diluer le réactif de dénaturation restant dans le flacon avant de le jeter, conformément aux procédures de laboratoire en vigueur sur le plan régional et national.**

| Calibrateur, Contrôle de qualité ou échantillon | Volumes de réactif de dénaturation nécessaire |
|---|---|
| Calibrateur négatif, calibrateur positif et contrôle de qualité, 200 µl | 100 µl |
| Calibrateur négatif, calibrateur positif et contrôle de qualité, 500 µl | 250 µl |
| Échantillons cervicaux, 1 ml | 500 µl |

3. Mélanger les échantillons selon l'une des deux méthodes suivantes.

Méthode utilisant le MST Vortexer 2

Note: Les échantillons QIAGEN mélangés à l'aide du MST Vortexer 2 **doivent** être hybridés selon la méthode utilisant la microplaque d'hybridation et l'Incubateur pour microplaques I. Si besoin, consulter le manuel d'utilisation du MST Vortexer 2 pour en savoir plus.

- a) Couvrir les Calibrateurs, Contrôles de qualité et les tubes d'échantillons dans le STM avec du film étanche pour tube DuraSeal[®] en appliquant celui-ci sur les tubes placés sur le portoir.
- b) Placer le couvercle pour portoir sur les tubes recouverts de film étanche et abaisser les deux attaches placées sur les côtés. Couper le film avec le cutter.

- c) Placer le portoir sur le MST Vortexer 2 et sécuriser le portoir avec l'attache. S'assurer que la vitesse est réglée sur 100 (vitesse maximale) et mettre l'agitateur sur la position "Marche" (ON). Vortexer les tubes pendant 10 secondes.

Méthode de vortexage de tube manuelle/individuelle

- a) Reboucher les Calibrateurs, les Contrôles de qualité et les tubes d'échantillons dans le STM avec des bouchons à vis pour tube de prélèvement d'échantillons propres.
 - b) Mélanger chaque tube soigneusement en le vortexant individuellement à vitesse maximale pendant 5 secondes.
 - c) Retourner chaque tube une fois de façon à laver l'intérieur du tube, le bouchon et le col du tube.
 - d) Replacer le tube sur le portoir.
4. Indépendamment de la méthode de vortexage des échantillons utilisée, **un tourbillon doit être visible à l'intérieur de chaque tube pendant le mélange afin que le liquide lave complètement la paroi interne du tube.** Les Calibrateurs, les Contrôles de qualité et les échantillons doivent virer au violet.
5. Incuber les tubes placés sur le portoir dans un bain-marie à 65 ± 2 °C pendant 45 ± 5 minutes (les Calibrateurs, les Contrôles de qualité et les échantillons dénaturés peuvent être testés immédiatement. Les Calibrateurs et les Contrôles de qualité peuvent être conservés entre 2 et 8 °C pendant une nuit comme décrit dans les **remarques** précédentes). Pour la conservation des échantillons, voir la section Étape d'arrêt facultative. Préparer le mélange de sondes GC durant cette incubation. Voir le chapitre *Préparation et conservation des réactifs*.

PROCÉDURE DE PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS EN SOLUTION PRESERVCYT

Remarques :

- Pour des détails complets, consulter la notice du kit de conversion des échantillons *digene* HC2.
- Traiter un aliquot de 4 ml de solution PreservCyt produit suffisamment de matériau pour 2 tests, lorsqu'ils sont testés manuellement. Le volume minimum pouvant être traité est de 4 ml. Se reporter à la section *Équivalence entre échantillons dans le STM et échantillons en solution PreservCyt* pour des détails concernant le volume résiduel minimum.
- Préparer les échantillons en solution PreservCyt par lots de 36 au maximum. Au-delà de 36, les culots pourraient être délogés lors du décantage du surnageant. Ceci est important pour maintenir l'intégrité des culots cellulaires pendant l'étape de décantation. Pour la préparation de flacons supplémentaires de solution PreservCyt, attendre d'avoir terminé la préparation du premier lot

Utiliser soit le réactif de dénaturation (RDN) fourni avec le test ADN *digene* HC2 GC-ID (voir la section *Préparation et conservation des réactifs*) ou le RDN fourni avec le kit de conversion d'échantillons *digene* HC2. Pour préparer le RDN fourni avec le kit de conversion des échantillons *digene* HC2, ajouter 3 gouttes d'indicateur coloré dans le flacon de RDN et bien mélanger. La solution doit alors avoir une coloration violet foncé uniforme. Pour déterminer les volumes nécessaires, se reporter au tableau 1.

Tableau 1. Volumes nécessaires : préparation des réactifs

| Nombre de tests | Volume de solution PreservCyt | Volume de tampon de conversion |
|-----------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 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 |

1. Indiquer à l'aide d'une étiquette le numéro d'identification approprié du prélèvement sur un tube de ml de la marque VWR ou Corning.conversion d'échantillons *digene* HC2, un tube conique Sarstedt de 10 ml ou un tube conique de 15 ml de la marque VWR ou Corning.
2. En manipulant les prélèvements un par un :
 - a. Agiter vigoureusement chaque flacon de solution PreservCyt jusqu'à ce que les cellules apparaissent dispersées de façon homogène.
 - b. Pipeter immédiatement le volume approprié d'échantillon en solution PreservCyt dans le tube étiqueté, car les cellules sédimentent au fond du tube très rapidement. Distribuer la solution de PreservCyt au fond du tube conique pour minimiser la matière cellulaire adhérant à l'intérieur du tube.
3. Ajouter le volume approprié de tampon de conversion d'échantillon dans chaque tube (se reporter au tableau 1).
4. Remettre le bouchon et mélanger soigneusement le contenu de chaque tube en utilisant un vortex avec des attaches pour les puits.

Remarque : La procédure utilisant le MST Vortexer 2 n'a pas été validée pour vortexer les prélèvements en solution PreservCyt avec du tampon de conversion des échantillons avant la centrifugation. Par conséquent, ne pas l'utiliser pour cette étape.

5. Centrifuger les tubes sur une centrifugeuse équipée d'un rotor libre à $2900 \pm 150 \times g$ pendant 15 ± 2 minutes.
6. Pendant la centrifugation, préparer le mélange milieu de transport des échantillons *digene*/réactif de dénaturation (STM/RDN) avec un rapport de 2/1, conformément au tableau 2.

Remarque : le mélange STM/RDN doit être préparé à chaque fois qu'un test est réalisé.

- a. Pour déterminer le volume total de mélange STM/RDN nécessaire, utiliser le volume de départ des échantillons en solution PreservCyt comme guide puis multiplier les volumes de STM et de RDN « par tube » par le nombre d'échantillons à traiter (voir le tableau 2).

Tableau 2. Volumes nécessaires : STM/RDN

| Nombre de Tests | Volume de solution PreservCyt | Volume de STM par tube pour le mélange STM/RDN final* | Volume de RDN par tube pour le mélange STM/RDN final* | Mélange STM/RDN ajouté par tube |
|-----------------|-------------------------------|---|---|---------------------------------|
| 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 |

*Les volumes indiqués dans ces colonnes ne doivent pas être ajoutés directement au tube d'échantillon.

- b. Mélanger soigneusement la solution en vortexant.
7. Retirer les tubes de la centrifugeuse un par un et les placer sur un portoir pour échantillons ou un portoir de conversion. Vérifier qu'un culot de coloration rose/orange est présent au fond de chaque tube.

Remarque : les échantillons ne comportant pas un culot visible après la centrifugation ne peuvent pas être soumis à un test et doivent être jetés.

8. En manipulant chaque tube individuellement :
 - a. Retirer le bouchon et le poser sur une serviette en papier faiblement pelucheux propre.
 - b. Décanter soigneusement le surnageant.
 - c. Maintenir le tube à l'envers et tapoter délicatement (environ 6 fois) sur les serviettes en papier absorbant faiblement pelucheux jusqu'à ce qu'aucun liquide ne s'égoutte du tube. Utiliser une

zone propre de la serviette à chaque fois. **Ne pas** laisser les culots cellulaires glisser hors du tube pendant cette opération.

Remarques :

- Ne pas tapoter le tube sur la même zone de la serviette en papier absorbant faiblement pelucheux plus d'une fois.
- Il est important d'éliminer la quantité maximale de solution PreservCyt en tapotant le tube. Cependant, il est normal d'observer de la solution PreservCyt résiduelle après le tapotage.

d. Placer le tube sur un portoir pour échantillons ou sur un portoir de conversion.

Vortexage et dénaturation

Procédure de vortexage manuelle

1. Ajouter le volume approprié de mélange STM/RDN à chaque culot (voir le tableau 2). Reboucher chaque tube et remettre les culots en suspension en vortexant chaque tube individuellement pendant au moins 30 secondes à vitesse maximale. Si un des culots s'avère difficile à remettre en suspension, vortexer pendant 10 à 30 secondes supplémentaires ou jusqu'à ce que le culot se détache du fond du tube. Si un des culots ne se dissout toujours pas après l'avoir vortexé à nouveau (2 minutes maximum), noter l'identification de l'échantillon et passer à l'étape suivante.
2. Placer les tubes sur un portoir.
3. Placer le portoir dans un bain-marie à 65 ± 2 °C pendant 15 ± 2 minutes. S'assurer que le niveau d'eau est suffisant pour couvrir tout le liquide dans les tubes.
4. Retirer le portoir avec les échantillons du bain-marie et vortexer les échantillons individuellement pendant 15 à 30 secondes.

Remarque : S'assurer que tous les culots sont entièrement remis en suspension à ce stade. Les échantillons contenant encore des culots visibles ne sont pas acceptables pour le test et doivent être jetés.

5. Remettre le portoir au bain-marie à 65 ± 2 °C et continuer la dénaturation pendant 30 ± 3 minutes supplémentaires.
6. Passer à l'étape d'hybridation ci-dessous ou, pour la conservation et le traitement des échantillons dénaturés, consulter la section *Étape d'arrêt facultative*.

Procédure de vortexage avec le MST Vortexer 2

Remarques :

- La méthode utilisant le MST Vortexer 2 est validée pour le traitement des échantillons en solution PreservCyt à la suite de la centrifugation et du décantage du surnageant.
- Seul le MST Vortexer 2 est conçu pour le traitement des échantillons en solution PreservCyt. Le MST Vortexer I n'est pas conçu pour le traitement en solution PreservCyt parce qu'il est incompatible avec le portoir de conversion et son couvercle. C'est pourquoi il ne faut pas utiliser le portoir de conversion avec le MST Vortexer I.
- Le portoir de conversion et son couvercle sont spécifiquement conçus pour recevoir les tubes de conversion d'échantillons *digene* HC2 (tubes coniques de 15 ml de marque VWR ou Corning). Il est recommandé d'utiliser un seul type de tubes à la fois sur le portoir de conversion. L'utilisation d'autres marques n'a pas été validée.
- Il est nécessaire de se conformer strictement aux temps de vortexage spécifiques au portoir de conversion et à son couvercle.
- Il n'est pas possible d'utiliser le portoir de conversion et son couvercle pour le vortexage des Calibrateurs ou des Contrôles de qualité des kits de test ADN *digene* HC2. La hauteur des tubes STM empêche le vortexage adéquat à l'aide du portoir de conversion muni de son couvercle.

1. Après avoir tapoté chaque tube conique de 15 ml étiqueté, placer chaque tube à sa position appropriée sur le portoir de conversion.
2. Ajouter le volume approprié de mélange STM/RDN à chaque culot (voir le tableau 2).
3. Couvrir les tubes coniques de 15 ml de film étanche pour tube DuraSeal en étirant le film au-dessus des tubes situés sur le portoir.
4. Placer le couvercle du portoir sur les tubes couverts par le film et bloquer le couvercle en place à l'aide des deux attaches latérales. Découper le film à l'aide du cutter une fois le couvercle bien attaché.
5. Soulever le levier à poignée rouge jusqu'à ce qu'il soit en position horizontale.
6. Placer le portoir de conversion et son couvercle sur le MST Vortexer 2 de manière à ce que le coin diagonal le plus grand du portoir de conversion soit situé dans le coin avant droit. Placer le portoir avec son couvercle sur la plate-forme du MST Vortexer 2 de manière à ce qu'il soit fermement ajusté dans les guides prévus à cet effet. Pousser ensuite le levier à poignée rouge complètement vers le bas jusqu'à ce qu'il soit en position verticale. Cela bloquera le portoir en place.
7. Vérifier que la vitesse est réglée sur 100 (vitesse maximale) et que le commutateur Pulser est sur la position OFF (éteinte).
8. Mettre le commutateur Power de l'agitateur sur la position ON. **Vortexer les tubes pendant 30 secondes.**
9. Mettre le commutateur Power de l'agitateur sur la position OFF.
10. Retirer le portoir de conversion avec son couvercle du MST Vortexer 2 en soulevant le levier à poignée rouge.
11. Placer le portoir dans le bain-marie à 65 ± 2 °C pendant 15 ± 2 minutes. S'assurer que le niveau d'eau couvre complètement tout le liquide dans les tubes.
12. Après l'incubation de 15 minutes, retirer le portoir avec les échantillons du bain-marie.
13. Pour éviter les projections, sécher tout excès d'eau présent sur le portoir avant de placer celui-ci dans le MST Vortexer 2.
14. Fixer le portoir de conversion avec son couvercle sur le MST Vortexer 2 de la manière décrite à l'étape 6.
15. Vérifier que la vitesse est réglée sur 100 puis mettre le commutateur Power de l'agitateur sur la position ON. **Vortexer les tubes pendant 1 minute.**
16. Mettre le commutateur à bascule Power de l'agitateur sur la position OFF.
Remarque : La procédure de vortexage à l'aide du MST Vortexer 2 standardise la vitesse, la durée et le processus de mélange, éliminant ainsi la nécessité de vérifier visuellement la présence de culots cellulaires qui est nécessaire lorsqu'on procède au vortexage manuel.
17. Remettre le portoir au bain-marie à 65 ± 2 °C et poursuivre la dénaturation pendant 30 ± 3 minutes.
18. Retirer le portoir du bain-marie, le sécher et le fixer sur l'agitateur.
19. Mettre le commutateur Power de l'agitateur sur la position ON. **Vortexer pendant 10 secondes à la vitesse maximum.**
20. Mettre le commutateur Power de l'agitateur sur la position OFF. Retirer le portoir.
21. Retirer immédiatement le couvercle du portoir et le film étanche pour tube DuraSeal des échantillons.
22. Passer à l'étape d'hybridation ci-dessous ou, pour la conservation et le traitement des échantillons dénaturés, consulter la section *Étape d'arrêt facultative*.

ÉTAPE D'ARRÊT FACULTATIVE

Après dénaturation, les échantillons dans le STM et les échantillons convertis en solution PreservCyt peuvent être conservés pendant une nuit entre 2 et 8 °C ou à -20 °C pendant une période maximale de 3 mois. Pour une réfrigération sur la nuit, on peut laisser les échantillons sur le portoir de conversion avec un nouveau film DuraSeal et en remettant le couvercle du portoir en place. Avant la mise en conservation à -20 °C, retirer le couvercle du portoir et le film DuraSeal et mettre des bouchons sur les tubes. Dans tous les cas, les échantillons doivent être équilibrés entre 20 et 25 °C et soigneusement vortexés avant de passer à l'étape d'*hybridation*.

Remarque : Ne pas conserver ou transporter les échantillons dénaturés sur de la carboglace.

Un maximum de 3 cycles de congélation/décongélation peut être effectué avec un maximum de 2 heures à température ambiante pendant chaque cycle de décongélation.

HYBRIDATION

Remarques :

- Le mélange de sondes GC est visqueux. Veiller à obtenir une dilution parfaite et de façon à s'assurer que le volume nécessaire a été entièrement distribué dans chaque puits de la microplaque d'hybridation. Voir le chapitre *Préparation et conservation des réactifs*.
- Lorsque les échantillons dénaturés ont été conservés à -20 °C, ils doivent être décongelés entre 20 et 25 °C, et doivent être vortexés soigneusement avant l'étape d'hybridation.
- Préchauffer l'Incubateur pour Microplaques I à 65 ± 2 °C pendant au moins 60 minutes avant emploi. Pour des informations supplémentaires, voir le *Manuel d'utilisation de l'Incubateur pour Microplaques I*.

1. Se procurer une microplaque d'hybridation et l'étiqueter.
2. Après l'incubation, retirer du bain-marie les Calibrateurs, les Contrôles de qualité et les échantillons. En cas d'utilisation de l'agitateur pour tubes multi-échantillons (MST Vortexer 2), vortexer tout le portoir d'échantillons dans le STM pendant au moins 5 secondes à vitesse maximale. Pour les échantillons en solution PreservCyt, vortexer tout le portoir de conversion pendant au moins 10 secondes à vitesse maximale. Sinon, vortexer chaque tube individuellement pendant au moins 5 secondes.
3. Transférer 75 µl de chaque Calibrateur, Contrôle de qualité ou échantillon **au fond** d'un puits de la microplaque d'hybridation vide en respectant le schéma de configuration informatisé de la microplaque créée sous *Mise en place*. Éviter de toucher les parois des puits et limiter la formation de bulles d'air. Utiliser un embout pour pipette extra-long et propre pour chaque transfert afin d'éviter la contamination croisée des Calibrateurs, des Contrôles de qualité ou des échantillons. Pour les échantillons dans le STM, ne pas retirer le dispositif de prélèvement du tube de transport des échantillons. Les échantillons dénaturés peuvent être bouchés avec un bouchon à vis pour tubes de prélèvement d'échantillons et conservés avec le système de prélèvement dans le tube. Les échantillons en solution PreservCyt peuvent être rebouchés avec leur bouchon d'origine.

Remarques :

- **Des faux positifs peuvent apparaître si les aliquots d'échantillon ne sont pas transférés avec précaution. Pendant le transfert des échantillons, ne pas toucher l'intérieur du tube avec l'embout de la pipette, lorsque les 75 µl d'aliquots sont retirés.**
4. Une fois le dernier échantillon transféré, couvrir la plaque à l'aide du couvercle de plaque et **incuber la microplaque d'hybridation pendant 10 minutes entre 20 et 25 °C.**

- Aliquoter le mélange de sondes préparé et soigneusement vortexé dans un réservoir à réactif jetable. Distribuer soigneusement 25 µl de mélange de sondes dans chaque puits contenant les Calibrateurs, les Contrôles de qualité et les échantillons à l'aide d'une pipette à 8 canaux et d'embouts neufs pour chaque rangée. Distribuer le volume de mélange de sondes dans chaque puits d'hybridation, en s'assurant de ne pas éclabousser. Éviter de toucher les parois des puits.

Remarque : pour l'étape ci-dessus, utiliser une pipette à 8 canaux munie d'embouts de 25 à 200 µl et pouvant distribuer de 25 à 75 µl. Pour un petit nombre de puits, utiliser une pipette monocanal (munie d'embouts de 25 à 200 µl) à la place de la pipette à 8 canaux.

- Couvrir la microplaque d'hybridation d'un couvercle et mélanger sur l'Agitateur Rotatif I (Rotary Shaker I) à 1100 ± 100 tours/min. pendant 3 ± 2 minutes. *Les Calibrateurs, Contrôles de qualité et échantillons doivent virer au jaune après avoir été mélangés sur l'agitateur rotatif.* Les puits dont la coloration violette persiste, peuvent ne pas avoir reçu la quantité exacte de mélange de sondes. Ajouter 25 µl supplémentaires de mélange de sondes dans les échantillons qui ont conservé une coloration violette et mélanger à nouveau. Si les puits demeurent violets après avoir suivi cette procédure, tester de nouveau les échantillons.
- Incuber sur l'Incubateur pour Microplaques I préchauffé et équilibré à 65 ± 2 °C pendant 60 ± 5 minutes.

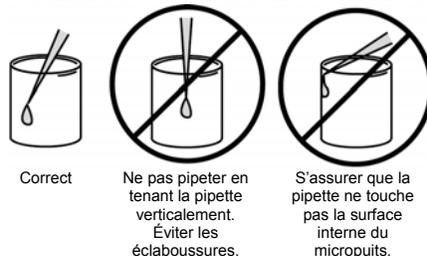
Remarques :

- Veiller à ne pas provoquer d'éclaboussures lorsque la microplaque d'hybridation est placée sur l'Incubateur pour Microplaques I.
- Après avoir été agités, les échantillons en solution PreservCyt doivent virer au rose à la place du jaune.

CAPTURE DES HYBRIDES

- Retirer de la microplaque tous les puits de microplaque de capture sauf le nombre de puits nécessaires pour la série. Remettre les micropuits non utilisés dans le sac d'origine et refermer hermétiquement. Numéroter chaque colonne 1, 2, 3 etc. au stylo-feutre et étiqueter la microplaque avec la mention appropriée. Les échantillons seront ajoutés dans les puits en respectant le schéma de microplaque d'exemple préparé auparavant sous « Mise en place ».
- Avec précaution, retirer de l'Incubateur pour Microplaques I la microplaque d'hybridation contenant les Calibrateurs, les Contrôles de qualité et les échantillons. Retirer immédiatement le couvercle de la microplaque et le placer sur une surface propre.
- À l'aide d'une pipette à 8 canaux, transférer la totalité du contenu (environ 100 µl) des Calibrateurs, des Contrôles de qualité et des échantillons des puits de la microplaque d'hybridation dans le fond des micropuits de capture correspondants. Utiliser des embouts de pipette neufs pour chaque colonne transférée et laisser chaque embout se vider entièrement dans le puits afin d'obtenir un transfert complet de l'échantillon. Si cela est nécessaire, la pipette peut être stabilisée en appuyant le **milieu** de l'embout sur le bord supérieur des micropuits de capture (voir le Schéma 1).

SCHÉMA 1 : PIPETAGE CORRECT



- Recouvrir la microplaque avec le couvercle de microplaque et incuber sur l'Agitateur Rotatif I (Rotary Shaker I) à 1100 ± 100 tours/min, entre 20 et 25 °C pendant 60 ± 5 minutes.

5. Durant cette étape d'incubation, préparer le tampon de lavage. Si nécessaire, vérifier les réservoirs des déchets et de rinçage du Laveur Automatique de Microplaques. Voir le chapitre *Préparation et conservation des réactifs*.
6. Lorsque l'étape de capture est terminée, retirer la microplaque de capture de l'Agitateur Rotatif I et retirer avec précaution le couvercle pour microplaque. Éliminer le liquide des puits en retournant complètement la microplaque au-dessus d'un évier et en la secouant vers le bas. Prendre des précautions pour ne pas décanter trop près du fond de l'évier ce qui pourrait causer des éclaboussures. **Ne pas retourner à nouveau la microplaque** ; la sécher en la tapotant fermement 2 ou 3 fois sur du papier absorbant Kimtowels® Wipers propre ou un papier faiblement pelucheux équivalent. S'assurer que tout le liquide est éliminé des puits et que le dessus de la microplaque est sec.

DÉTECTION DES HYBRIDES

Remarques :

- À l'aide d'une pipette à 8 canaux, effectuer les distributions dans la microplaque de gauche à droite.
 - La méthode de pipetage inversé est recommandée afin d'obtenir une distribution constante de réactif. Avec cette technique, en se servant du deuxième cran du bouton d'aspiration/distribution de la pipette (piston), les embouts de pipette débordent initialement. Voir la procédure ci-dessous. Essuyer les embouts sur le réservoir à réactif ou un papier absorbant faiblement pelucheux afin de retirer l'excès de réactif avant la distribution dans la microplaque.
 - Si cela est nécessaire, la pipette peut être stabilisée en appuyant le milieu de l'embout sur le bord supérieur des micropuits. Pour éviter une contamination croisée des échantillons, s'assurer que la pipette ne touche pas les parois des micropuits. Se reporter au schéma 1 précédent.
1. Aliquoter le volume approprié de réactif de détection 1 dans un réservoir à réactif (pour des instructions, voir le chapitre « *Préparation et conservation des réactifs* »). Distribuer soigneusement 75 µl de réactif de détection 1 dans chaque puits de la microplaque de capture à l'aide d'une pipette à 8 canaux et de la méthode de pipetage inversé décrite ci-dessous.

Procédure de pipetage inversé :

- a) Fixer les embouts sur une pipette à 8 canaux ; s'assurer qu'ils sont correctement enfoncés.
 - b) Appuyer sur le piston de la pipette (passer le premier cran jusqu'au deuxième cran).
 - c) Immerger les embouts dans la solution du réactif de détection 1.
 - d) Relâcher lentement le piston de la pipette de façon à remplir les embouts de solution.
 - e) Distribuer la solution dans les micropuits (75 µl) en appuyant sur le piston jusqu'au premier cran. Ne pas relâcher le piston avant d'avoir immergé les embouts de la pipette dans la solution de réactif de détection 1.
 - f) Remplir à nouveau les embouts et répéter l'opération jusqu'à ce que tous les puits soient remplis. Remplir les puits de la microplaque de gauche à droite. *Vérifier que tous les puits sont remplis correctement en observant l'intensité de la coloration rose. Tous les puits doivent présenter la même intensité.*
2. Couvrir les plaques avec un couvercle et incubé entre 20 et 25 °C pendant 30 à 45 minutes.

LAVAGE

Laver la microplaque de capture selon l'une des deux méthodes suivantes.

METHODE DE LAVAGE AVEC LE LAVEUR AUTOMATIQUE DE MICROPLAQUES :

Remarque : Maintenir le Laveur Automatique de Microplaques sous tension en permanence. S'assurer que le réservoir de rinçage est rempli et que le réservoir des déchets est vide. Le Laveur Automatique de Microplaques amorcera régulièrement la procédure d'entretien. Pour obtenir des instructions supplémentaires, se reporter au *Manuel d'utilisation du Laveur Automatique de Microplaques*.

AVANT CHAQUE UTILISATION :

- Vérifier que le réservoir de lavage est rempli au moins jusqu'à la marque 1L avec de la solution de tampon de lavage. S'il ne l'est pas, préparer de la solution de tampon de lavage. Voir le chapitre *Préparation et conservation des réactifs*.
- Vérifier que le réservoir de rinçage est rempli d'eau distillée ou déminéralisée.
- Vérifier que le réservoir des déchets est vide et que le bouchon est hermétiquement fermé.
- Le Laveur Automatique de Microplaques s'amorcera automatiquement avant chaque lavage et se rincera après chaque lavage.

1. Retirer le couvercle de la microplaque et placer la microplaque sur la plate-forme du Laveur Automatique de Microplaques.
2. Vérifier que l'appareil est sous tension et qu'il affiche « Digene Wash Ready » (Prêt pour lavage) ou « P1 ».

Remarque : Si une barrette de puits de capture est partiellement utilisée, il sera nécessaire de placer des puits de microplaque vides sur la microplaque de capture de façon à compléter la colonne avant l'opération de lavage. Se reporter au chapitre *Accessoires* pour obtenir des informations pour passer commande.

3. Choisir le nombre de barrettes qui doivent être lavées en appuyant sur la touche « Rows » (Rangées), puis ajuster avec « + » ou « - ». Appuyer sur la touche « Rows » pour retourner à l'affichage « Digene Wash Ready » ou « P1 ».
4. Appuyer sur la touche « Start/Stop » pour commencer l'opération.
5. Le Laveur Automatique de Microplaques effectuera six cycles de remplissage/aspiration qui prendront environ 10 minutes. Durant cette période, il s'arrêtera brièvement, mais ne pas retirer la microplaque prématurément. Lorsque le lavage sera terminé, l'appareil affichera « Digene Wash Ready » ou « P1 ».
6. Retirer la microplaque du laveur lorsque le cycle est terminé. La microplaque doit être de couleur blanche sans liquide résiduel rose dans les micropuits.

MÉTHODE DE LAVAGE MANUELLE

Remarque : Un lavage inadéquat peut causer un bruit de fond élevé et des faux positifs (dus à la phosphatase alcaline résiduelle). Pour obtenir un lavage efficace lors de l'utilisation de l'appareil de lavage, cet appareil doit être placé entre 61 cm et 91 cm au-dessus de la zone réservée au lavage de façon à ce que la microplaque se trouve entre 61 cm et 91 cm en dessous de l'appareil de lavage lors du lavage. Le cran d'arrêt de l'appareil de lavage doit être placé sur la position « Open » lors de l'usage de l'appareil et placé sur la position « Off » lorsque celui-ci n'est pas utilisé. Au moins 1 L de tampon de lavage doit se trouver dans l'appareil de lavage pendant son utilisation afin d'assurer une pression adéquate.

1. Éliminer le réactif de détection 1 des puits en plaçant un papier absorbant propre (Kimtowels Wipers ou un papier absorbant faiblement pelucheux équivalent) sur la microplaque, puis en la retournant délicatement. Avant de la retourner, s'assurer que le papier est en contact avec toute la surface de la microplaque. Laisser la microplaque s'égoutter pendant 1 à 2 minutes, puis bien sécher à l'aide d'un papier absorbant (Kimtowels Wipers ou papier absorbant faiblement pelucheux équivalent). Jeter le papier utilisé afin d'éviter une contamination par de la phosphatase alcaline lors des étapes suivantes.
2. Laver la microplaque manuellement 6 fois à l'aide de l'appareil de lavage. L'eau dans chaque puits doit déborder de façon à retirer le conjugué de la partie supérieure des puits. Laver en commençant en A1 et continuer en dessinant un serpent de gauche à droite et de haut en bas. Lorsque tous les puits sont remplis, renverser la microplaque vigoureusement dans l'évier pour en décanter le liquide. Commencer le second lavage dans le puits H12 en dessinant un serpent de droite à gauche et de bas en haut. Cette séquence de 2 cycles de lavage est répétée encore 2 fois pour obtenir un total de 6 cycles de lavage par puits.

- Après le cycle de lavage final, sécher la microplaque en la retournant sur du papier absorbant (Kimtowels Wipers ou un papier absorbant faiblement pelucheux équivalent) et en la tapotant fermement 3 ou 4 fois. Remplacer le papier absorbant et recommencer l'opération. Laisser la microplaque retournée pendant 5 minutes pour lui permettre de s'égoutter. Essuyer la microplaque une dernière fois.
- La microplaque doit être de couleur blanche sans liquide résiduel rose dans les micropuits.

AMPLIFICATION DU SIGNAL

Remarques :

- Utiliser une paire de gants propre sans talc pour la manipulation du réactif de détection 2.
 - Aliquoter **uniquement** le volume de réactif nécessaire pour effectuer le test dans le réservoir à réactif afin d'éviter la contamination du réactif de détection 2. Voir le chapitre *Préparation et conservation des réactifs*. **NE PAS remettre le réactif de détection 2 dans son flacon d'origine. Après l'opération, jeter le réactif inutilisé.**
 - La distribution du réactif de détection 2 doit être faite sans interruption. Dans la mesure du possible, la durée d'incubation doit être la même pour tous les puits.
 - Prendre soin de ne pas toucher les parois des micropuits ou d'éclabousser les pipettes de réactif ce qui pourrait provoquer des contaminations croisées entre échantillons. (Voir le Schéma 1).
- Distribuer avec soin 75 µl de réactif de détection 2 dans chaque puits de la microplaque de capture à l'aide d'une pipette à 8 canaux et de la technique de pipetage inversé, comme décrit ci-dessus. *Tous les micropuits doivent virer au jaune. Vérifier que tous les puits ont été correctement remplis en observant l'intensité de la coloration. Tous les puits doivent présenter la même intensité.*
 - Couvrir les microplaques avec un couvercle pour microplaque ou un film étanche et propre (Parafilm ou équivalent), et incuber à 20-25°C pendant 15 minutes. Éviter toute lumière directe intense.
 - Après 15 minutes d'incubation (et pas au-delà de 30 minutes d'incubation), lire la microplaque avec le luminomètre approuvé par QIAGEN.
 - Le logiciel d'analyse du test *digene* permettra d'entrer les informations pertinentes concernant le test directement dans le logiciel.
 - Si la totalité de la microplaque n'a pas été utilisée, retirer du support pour microplaque les puits utilisés, rincer le support soigneusement à l'eau déminéralisée, le sécher et le conserver pour le prochain test.

CRITÈRES DE VÉRIFICATION DE LA CALIBRATION DU TEST

La vérification de la calibration du test est effectuée pour s'assurer que les réactifs et les échantillons de la calibration et du contrôle de qualité fonctionnent correctement, permettant ainsi une détermination précise de la valeur seuil du test. Les critères de vérification sont calculés et attestés valides ou invalides automatiquement par le logiciel d'analyse du test *digene*. Le test ADN *digene* HC2 GC-ID nécessite une calibration pour chaque test, c'est pourquoi il est obligatoire de vérifier chaque test en utilisant les critères qui suivent. La procédure de vérification n'est pas destinée à être un substitut aux tests internes de contrôle de qualité.

1. Calibrateur négatif

Le Calibrateur négatif doit être testé en triple avec chaque test. La valeur RLU moyenne du Calibrateur négatif doit être ≥ 10 et ≤ 150 RLU pour pouvoir commencer le test. Le coefficient de variation (CV%) pour les répliqués du Calibrateur négatif doit être ≤ 25 %. Si le CV% est > 25 %, le logiciel éliminera le répliquat avec la valeur RLU la plus éloignée de la moyenne, comme valeur aberrante, et recalculera la moyenne et le CV% en utilisant les deux répliqués restants. Le CV% recalculé doit être ≤ 25 %. Dans le cas contraire, **la vérification de la calibration du test est invalide et le test doit être recommencé pour tous les échantillons de patientes. Par conséquent, les résultats de ces échantillons ne doivent pas faire l'objet d'un rapport.**

2. Calibrateur positif

Le Calibrateur positif doit être testé en triple avec chaque test. Le CV% pour les réplicats du Calibrateur positif doit être ≤ 20 %. Si le CV% est > 20 %, le logiciel éliminera le réplicat avec la valeur RLU la plus éloignée de la moyenne, comme valeur aberrante, et recalculera la moyenne et le CV% en utilisant les deux réplicats restants. Le CV% recalculé doit être ≤ 20 %. Dans le cas contraire, **la vérification de la calibration du test est invalide et le test doit être recommencé pour tous les échantillons de patientes. Par conséquent, les résultats de ces échantillons ne devront pas faire l'objet d'un rapport.**

3. Rapport moyenne PC/moyenne NC

La moyenne des réplicats du Calibrateur positif (moyenne PC) et la moyenne des réplicats du Calibrateur négatif (moyenne NC) sont utilisées pour calculer le rapport moyenne PC/moyenne NC. Le logiciel calculera le rapport moyenne PC/moyenne NC. Ce rapport doit remplir les critères suivants de façon à vérifier la calibration du test **avant que les résultats des échantillons ne puissent être interprétés**. Si le rapport est $\geq 2,0$ et ≤ 20 , le logiciel calculera alors la valeur seuil. Si le rapport est $< 2,0$ ou > 20 , **la vérification de la calibration du test est invalide et le test doit être recommencé pour tous les échantillons de patientes. Par conséquent, les résultats des échantillons de patientes ne doivent pas faire l'objet d'un rapport.**

Remarque : Afin de déterminer la reproductibilité des Calibrateurs pour le test ADN *digene* HC2 GC-ID, les résultats obtenus avec le luminomètre de microplaques *digene* 2000 (DML 2000) lors d'études internes, portant sur 62 tests effectués avec l'application du système Rapid Capture, et 43 tests effectués avec la méthode manuelle, ont été analysés (voir le tableau 3). Les résultats montrent que la moyenne du CV% pour le Calibrateur positif portant sur ces 105 tests était égale ou inférieure à 6,5 % et que le CV% moyen pour le Contrôle négatif était égal ou inférieur 14,6 %. Comme l'indique la valeur RLU moyenne du Calibrateur négatif de 43 obtenue pour les tests manuels, comparée à la moyenne de 54 pour l'application RCS, il a été démontré que l'application RCS produit des valeurs de RLU pour le Calibrateur négatif qui sont légèrement supérieures par rapport à la méthode manuelle. Il a été démontré que cette augmentation est sans effet sur les résultats des tests produits en utilisant l'une ou l'autre des méthodes disponibles. Le seuil RLU moyen pour le Calibrateur négatif a été défini à 250 RLU, d'après un calcul statistique de $\pm 3DS$ de la valeur RLU moyenne pour le Calibrateur négatif observé pour le test ADN *digene* HC2 CT/GC lors de tests extensifs qui ont été effectués pendant le développement de l'application RCS. La tranche supérieure de cette marge $\pm 3DS$ a été augmentée de 20 % supplémentaires pour s'assurer que le seuil RLU NC puisse être atteint dans la pratique clinique de routine.

La valeur RLU moyenne du NC doit être régulièrement observée à ≤ 150 et le CV à ≤ 25 %. Chaque laboratoire doit surveiller la performance du contrôle de qualité et de la calibration, conformément au document C24-2A du National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). La moyenne RLU qui utilise l'application RCS peut parfois dépasser 150, avec l'éventualité d'une diminution correspondante du rapport PC/NC, pour lequel d'après le tableau 3, il a été démontré qu'il produisait une valeur moyenne de 8,29 lors de la calibration. Dans ce cas, les résultats sont acceptables, à condition que la moyenne RLU NC se maintienne ≤ 250 et que le rapport PC/NC soit $\geq 2,0$. Au cas où la moyenne RLU NC dépasse 250 ou que le rapport PC/NC tombe en dessous de 2,0 ou qu'il soit supérieur à 20, le test est invalide.

Tableau 3. Résumé des statistiques pour les valeurs du Calibrateur négatif et du Calibrateur positif pour l'application RCS et les tests par méthode manuelle.

| Méthode | Nbre de Plaques | Moyennes calculées PC/NC | | | | Contrôles de qualité du kit de test (Moyenne RLU/CO) | |
|----------|-----------------|--------------------------|---------|------|-------|---|-------|
| | | Moyenne | Médiane | Min | Max | QC CT | QC GC |
| RCS | 62 | 8,29 | 8,99 | 3,95 | 12,72 | 0,22 | 4,73 |
| Manuelle | 43 | 8,22 | 8,83 | 2,59 | 12,88 | 0,23 | 4,07 |

| Méthode | Calibrateur | Moyennes calculées RLU | | | | Moyenne du CV% calculé |
|----------|-------------|------------------------|---------|-----|-----|---------------------------|
| | | Moyenne | Médiane | Min | Max | |
| RCS | Négatif | 54 | 46 | 24 | 127 | 14,4 |
| | Positif | 399 | 405 | 179 | 606 | 6,5 |
| Manuelle | Négatif | 43 | 36 | 16 | 120 | 14,6 |
| | Positif | 295 | 309 | 167 | 415 | 4,7 |

CALCUL DE LA VALEUR SEUIL

Une fois qu'un test a été vérifié selon les critères mentionnés ci-dessus, les réplicats du Calibrateur positif valides seront utilisés pour établir les valeurs seuil en RLU afin de déterminer les échantillons positifs. Les valeurs seuil en RLU sont calculées comme suit :

Valeur seuil en RLU = Valeur RLU moyenne du Calibrateur positif

Exemple de calcul de la valeur seuil :

| | Valeurs RLU NC | Valeurs RLU PC |
|---------------------------|----------------|----------------|
| | 97 | 312 |
| | 101 | 335 |
| | 91 | 307 |
| Valeur moyenne | 96 | 318 |
| CV% | 4,9 | 4,7 |
| moyenne PC/ moyenne NC | N/A | 3,31 |

Par conséquent, la valeur seuil en RLU est (moyenne PC) = 318

Toutes les valeurs RLU des échantillons seront converties par le logiciel d'analyse du test *digene* en un rapport par rapport à la valeur seuil (CO) RLU appropriée. Par exemple, tous les tests doivent s'exprimer en RLU échantillon/CO.

Remarque : Les valeurs RLU/CO et les résultats positifs/négatifs de tous les échantillons testés sont rapportés dans le rapport d'analyse de données du logiciel d'analyse du test *digene*.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Les échantillons de contrôle de qualité sont fournis avec le test ADN *digene* HC2 GC-ID. Afin d'obtenir les instructions pour entrer les numéros de lot et les dates de péremption des Contrôles de qualité, consulter le manuel d'utilisation du logiciel d'analyse du test *digene* correspondant. Pour que le test soit considéré valide, ces contrôles doivent être inclus avec chaque test, et le rapport RLU/CO de chaque Contrôle de qualité doit être compris dans les marges acceptables suivantes. **Si les Contrôles de qualité se trouvent en dehors de ces marges, le test est invalide et doit être répété.** Par conséquent, ne pas reporter les résultats de patientes obtenus lors d'un test invalide.

| | QC CT | QC GC |
|----------------|--------|-------|
| RLU/CO Minimum | 0 | 1,0 |
| RLU/CO Maximum | 0,9999 | 20,00 |
| CV% Maximum | 20,00 | 20,00 |

1. Les Contrôles de qualité fournis dans le kit sont des cibles d'ADN de CT et de GC clonés composés de la même construction plasmidique (une pour CT et une pour GC) pour chaque organisme que le Calibrateur positif fourni avec le test ADN *digene* HC2 GC-ID.
2. Ces échantillons de contrôle de qualité ne sont pas les mêmes que ceux de l'organisme GC dans la matrice d'échantillons et ne peuvent pas servir de contrôle de qualité approprié pour le traitement des échantillons *digene* dans le STM ou en solution PreservCyt.
3. Le Calibrateur positif est utilisé pour régulariser les résultats des échantillons en déterminant la valeur seuil RLU. Les Contrôles de qualité fournis avec ce kit de test doivent être utilisés pour un contrôle de qualité interne. Des Contrôles de qualité supplémentaires peuvent être testés conformément aux directives ou aux recommandations des réglementations locales, départementales et/ou nationales, ou des organismes d'accréditation.
4. Pour tester l'efficacité de la lyse et de la dénaturation des échantillons, les laboratoires doivent régulièrement fabriquer des contrôles de la préparation des échantillons en ajoutant à un nouveau tube de STM une quantité égale ou supérieure à 5 000 CFU/ml de *Neisseria gonorrhoeae* (auxotypes 1, 5 ou de souche Type provenant de chez ATCC). Incuber l'échantillon pendant au moins 1 heure avant de le tester de la même façon qu'un échantillon clinique normal. Un rapport RLU/CO $\geq 2,50$ doit être obtenu si l'échantillon est traité correctement. Sinon, des panels de test d'échantillons disponibles dans le commerce contenant des organismes GC peuvent être utilisés.
5. Des marges acceptables pour les Calibrateurs et les Contrôles de qualité ont été déterminées uniquement pour les luminomètres approuvés par QIAGEN. Le Calibrateur négatif et les Contrôles de qualité assurent une surveillance dans le cas d'un mauvais fonctionnement des réactifs mais n'assurent pas la précision du test.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS DES ÉCHANTILLONS

Suivant les critères du test ADN *digene* HC2 GC-ID :

1. Les échantillons avec des rapports RLU/CO $\geq 2,50$ sont considérés comme « Positif pour l'ADN de *Neisseria gonorrhoeae* ». On ne peut pas en déduire la viabilité et/ou l'infectiosité des organismes car l'ADN cible peut persister en l'absence d'organismes viables.
2. Les échantillons avec des rapports RLU/CO $< 1,00$ ne contiennent pas d'ADN de *Neisseria gonorrhoeae* ou contiennent un taux d'ADN inférieur à la limite de détection du test. Ces résultats doivent être interprétés comme « ADN de *Neisseria gonorrhoeae* non-déecté ». Un résultat négatif n'exclut pas une infection à *Neisseria gonorrhoeae* car les résultats dépendent du prélèvement approprié de l'échantillon et d'un taux d'ADN à détecter suffisant.
3. Les échantillons avec des rapports RLU/CO $\geq 1,00$ et $< 2,50$ sont considérés équivoques. Les résultats peuvent être considérés comme présumés positifs pour l'ADN de *Neisseria gonorrhoeae*. Il est cependant recommandé de répéter le test sur un nouvel échantillon du même patient ou de procéder à un test supplémentaire à l'aide d'une autre procédure de test en raison de la valeur prédictive réduite d'un résultat positif avec ces valeurs RLU/valeurs seuil.*
4. Il est recommandé de vérifier les résultats positifs par une autre méthode si la possibilité d'une infection à *Neisseria gonorrhoeae* est incertaine ou douteuse lorsque l'on prend en compte les résultats cliniques ou du laboratoire. Des études analytiques avec ce test ont montré une réaction croisée limitée avec certaines autres séquences ADN qui peuvent entraîner des faux positifs. Se reporter au chapitre *Spécificité analytique* pour des informations supplémentaires.

* Lors de l'évaluation clinique du test ADN *digene* HC2 GC-ID, 3/17 résultats dans la zone équivoque ont été vérifiés comme positifs par culture de GC ; les 14 résultats restants étaient à l'évidence des

faux positifs. Lors d'une évaluation ultérieure, 5 échantillons avec un rapport RLU/CO initial compris entre 1,00 et 2,50, ont été observés, dont trois étaient positifs par culture de GC. L'analyse répétée en double de ces trois échantillons avec le test ADN *digene* HC2 GC-ID a donné des résultats de RLU/CO \geq 1,00. Les deux échantillons restants étaient négatifs avec le test de culture et ils étaient également négatifs avec le test ADN *digene* HC2 GC-ID répété deux fois.

LIMITES DE LA TECHNIQUE

Se reporter au *Manuel d'utilisation du système Rapid Capture pour des limites supplémentaires relatives à la technique, spécifiques à l'utilisation de ce système de test pour l'analyse d'un grand nombre d'échantillons.*

- Pour diagnostic *in vitro* uniquement.
- La procédure du test ADN *digene* HC2 GC-ID, le contrôle de qualité et l'interprétation des résultats des échantillons doivent être suivis à la lettre pour obtenir des résultats de test fiables.
- Le test ADN *digene* HC2 GC-ID peut être utilisé uniquement avec des échantillons cervicaux recueillis à l'aide du dispositif de prélèvement d'ADN *digene* HC2 et placés dans le STM, avec des échantillons cervicaux recueillis à l'aide du kit de prélèvement féminin avec écouvillon *digene* et placés dans le STM ou avec des échantillons collectés à l'aide d'un dispositif de prélèvement de type balai puis placés dans de la solution Hologic PreservCyt.
- Les résultats de ce test doivent être uniquement interprétés conjointement avec les informations de l'évaluation clinique de la patiente et à partir d'autres méthodes disponibles.
- Le test ADN *digene* HC2 GC-ID fournit des résultats qualitatifs. La valeur numérique (rapport) au-dessus de la valeur seuil déterminée pour l'échantillon de la patiente n'a pas été démontrée être en corrélation avec la quantité d'ADN de GC présente dans l'échantillon de la patiente.
- Un résultat négatif n'exclut pas la possibilité d'une infection à *Neisseria gonorrhoeae* car la détection dépend du nombre d'organismes présents dans l'échantillon et peut être influencée par les méthodes de prélèvement d'échantillon, les facteurs propres à la patiente, le stade de l'infection et/ou la souche de *Neisseria gonorrhoeae*.
- Le but du test ADN *digene* HC2 GC-ID n'est pas de déterminer le succès thérapeutique.
- Le test ADN *digene* HC2 GC-ID a été validé uniquement pour être utilisé en association avec le Laveur Automatique de Microplaques en utilisant les réglages indiqués dans la notice d'instruction du test. Cette étude de validation a été effectuée par nos soins et les données pour appuyer son utilisation sont archivées par QIAGEN. Il n'est pas permis d'utiliser d'autres laveurs de microplaque ou d'autres réglages pour le laveur de microplaques avec le test ADN *digene* HC2 GC-ID.
- Dans le but de minimiser la variabilité des résultats obtenus avec le test ADN *digene* HC2 GC-ID, il s'avère nécessaire que le personnel de laboratoire effectuant le test atteigne un niveau de compétence technique acceptable. Chaque laboratoire doit également assurer la surveillance de la compétence technique lors de la réalisation du test. Pour cela, il est recommandé que des panels de test d'échantillons contenant des organismes GC ou de l'ADN de GC commercialement disponibles soient régulièrement testés, en accord avec les procédures de qualité des institutions.

RÉSULTATS ATTENDUS

PRÉVALENCE

La prévalence des échantillons positifs pour *Neisseria gonorrhoeae* varie en fonction des caractéristiques de la population telles que l'âge, le sexe ou les facteurs de risque. La prévalence de *Neisseria gonorrhoeae* observée dans la population de l'étude clinique, utilisant le test ADN *digene* HC2 GC-ID varie entre 1,1 % et 13,0 %. La prévalence a été calculée en supposant que les 17 échantillons ayant des

résultats équivoques dans l'étude étaient positifs pour l'ADN de GC (tableau 4). La positivité de huit de ces 17 échantillons a été confirmée par culture de GC ou par PCR.

Tableau 4. Prévalence des résultats positifs pour le test ADN *digene* HC2 GC-ID par site de test.

| Site de test | Nbre Positifs/Nbre Testés | % de prévalence |
|--------------|---------------------------|-----------------|
| 1 | 60/460 | 13,0 |
| 2 | 34/302 | 11,3 |
| 3 | 23/324 | 7,1 |
| 4 | 10/390 | 2,6 |
| 5 | 4/349 | 1,1 |
| Total | 131/1825 | 7,2 |

VALEURS PRÉDICTIVES POSITIVES ET NÉGATIVES

Les valeurs prédictives positives et négatives (PPV et NPV) hypothétiques pour différents taux de prévalence résultants de l'utilisation du test ADN *digene* HC2 GC-ID ont été calculées en utilisant la sensibilité et la spécificité globales déterminées individuellement pour les échantillons prélevés à l'aide du dispositif de prélèvement d'ADN *digene* HC2 (cytobrosse) et pour les échantillons prélevés à l'aide du kit de prélèvement féminin avec écouvillon *digene* (écouvillon). Le tableau 5 présente les PPV et NPV hypothétiques pour les échantillons prélevés avec la cytobrosse (sensibilité globale de 92,6 % et spécificité globale de 98,5 %) et le tableau 6 présente les PPV et NPV hypothétiques pour les échantillons prélevés avec l'écouvillon (sensibilité globale de 93,0 % et spécificité globale de 98,8 %).

Tableau 5. Valeurs prédictives hypothétiques du test ADN *digene* HC2 GC-ID à des taux de prévalence différents (cytobrosse).

| Taux de prévalence (%) | Sensibilité (%) | Spécificité (%) | PPV (%) | NPV (%) |
|------------------------|-----------------|-----------------|---------|---------|
| 5 | 92,6 | 98,5 | 76,5 | 99,6 |
| 10 | 92,6 | 98,5 | 87,3 | 99,2 |
| 15 | 92,6 | 98,5 | 91,6 | 98,7 |
| 20 | 92,6 | 98,5 | 76,3 | 99,6 |

Tableau 6. Valeurs prédictives hypothétiques du test ADN *digene* HC2 GC-ID à des taux de prévalence différents (écouvillon).

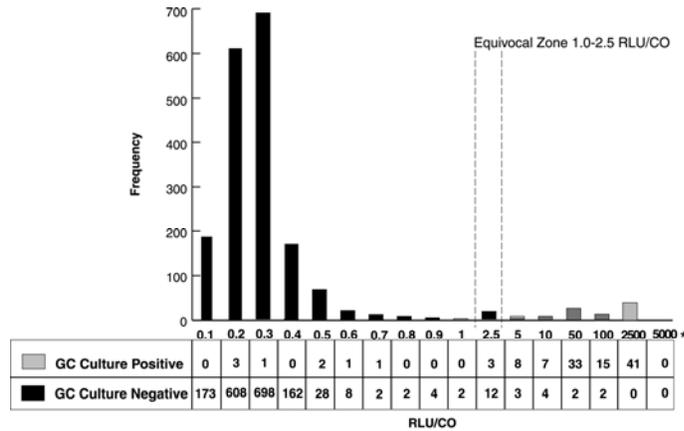
| Taux de prévalence (%) | Sensibilité (%) | Spécificité (%) | PPV (%) | NPV (%) |
|------------------------|-----------------|-----------------|---------|---------|
| 5 | 93,0 | 98,8 | 79,8 | 99,7 |
| 10 | 93,0 | 98,8 | 88,3 | 99,4 |
| 15 | 93,0 | 98,8 | 91,6 | 99,1 |
| 20 | 93,0 | 98,8 | 93,3 | 98,7 |

DISTRIBUTION DE LA FRÉQUENCE : RÉSULTATS RLU/CO DU TEST ADN *digene* HC2 GC-ID

La distribution des rapports RLU/CO du test ADN *digene* HC2 GC-ID observée lors d'une étude clinique multicentrique est présentée ci-dessous (Schéma 2). Ces données comprennent tous les échantillons pour lesquels le test ADN *digene* HC2 GC-ID a été effectué et pour lesquels les résultats de cultures GC étaient disponibles (n=1826). L'interprétation des résultats a été effectuée selon les critères suivants : les échantillons avec des valeurs de RLU/CO < 1,00 ont été interprétés comme négatifs ; les échantillons avec des valeurs RLU/CO ≥ 2,50 ont été interprétés comme positifs ; les échantillons avec des rapports RLU/CO ≥ 1,00 et < 2,50 ont été interprétés comme équivoques.

On observe une séparation nette des rapports RLU/CO entre les résultats positifs et les résultats négatifs du test ADN *digene* HC2 GC-ID. Quarante vingt dix neuf pour cent (1676/1690) des résultats négatifs avec le test ADN *digene* HC2 GC-ID ont des valeurs RLU/CO comprises entre 0,0 et 0,5. Cinq (5/1690) des résultats négatifs avec le test ADN *digene* HC2 GC-ID ont un rapport RLU/CO compris entre 0,6 et 0,8. Globalement, moins de un pour cent (< 0,9 % (17/1825) des résultats des échantillons tombent dans la zone équivoque du test, dont 47 % (8/17) étaient positifs par culture GC ou par PCR. Quarante vingt neuf pour cent (93/104) des résultats positifs avec le test ADN *digene* HC2 GC-ID ont des valeurs RLU/CO comprises entre 10 et 2500.

Schéma 1. Distribution de la fréquence des résultats RLU/CO du test ADN *digene* HC2 GC-ID.



* Indique l'extrémité supérieure de la gamme, la valeur indiquée y comprise.

PERFORMANCE DU TEST

RÉSULTATS DE L'ESSAI CLINIQUE PAR ÉCHANTILLON

Les caractéristiques de performance du test ADN *digene* HC2 GC-ID ont été déterminées en comparant les résultats du test avec les résultats de culture de Gonorrhoea. Mille huit cent vingt cinq (1825) échantillons ont été recueillis puis testés sur des patientes dans 5 sites différents, y compris des cliniques pour les MST, des centres de planning familial et des cliniques obstétriques/gynécologiques. Une PCR a été réalisée sur les échantillons qui étaient à la fois positifs avec le test ADN *digene* HC2 GC-ID et négatifs avec la culture. Les résultats du test ADN *digene* HC2 GC-ID n'ont pas été résolus par les résultats de la PCR et par conséquent la PCR n'a eu aucun impact sur le calcul de la performance du test ADN *digene* HC2 GC-ID. Les résultats de l'essai clinique portant sur des échantillons prélevés à l'aide du dispositif de prélèvement d'ADN *digene* HC2 (cytobrosse) sont présentés au tableau 7 et ceux des échantillons prélevés à l'aide du kit de prélèvement féminin avec écouvillon *digene* (écouvillon) au tableau 8.

Les caractéristiques de performance du test ADN *digene* HC2 GC-ID ont été calculées en appliquant les deux valeurs seuil de 1,0 et de 2,5, sans prendre en compte les échantillons présumés positifs tombant dans la zone équivoque décrite ci-dessus dans le chapitre *Interprétation des résultats* de la présente notice. C'est pourquoi la performance du test ADN *digene* HC2 GC-ID peut varier dans votre laboratoire en fonction de la distribution des valeurs qui tombent dans la zone équivoque et des résultats répétés obtenus lors d'un nouveau test effectué sur les échantillons présumés positifs (zone équivoque). Comme point de référence, moins de 0,9 % des échantillons (17/1825) testés pendant l'étude clinique multicentrique utilisés pour établir la performance du test ADN *digene* HC2 GC-ID sont tombés dans cette gamme. Voir la distribution de la fréquence des résultats RLU/CO au chapitre *Résultats attendus* de la présente notice pour de plus amples informations.

Il n'y a pas eu suffisamment de données créées pour pouvoir déterminer de manière précise s'il y a équivalence de la sensibilité et de la valeur prédictive positive du test ADN *digene* HC2 GC-ID en cas de prélèvement des échantillons à l'aide du kit de prélèvement féminin avec écouvillon *digene* et en cas de prélèvement des échantillons à l'aide du dispositif de prélèvement d'ADN *digene* HC2. Puisque l'utilisation du dispositif de prélèvement d'ADN *digene* HC2 est contre-indiquée pour le prélèvement des échantillons cervicaux chez les femmes enceintes, la capacité du test à détecter la présence d'ADN de GC peut être réduite chez cette population de patientes ou à chaque fois qu'un écouvillon est utilisé pour prélever des échantillons. Les estimations de la performance pour le test sont basées sur des échantillons conservés entre 2 et 8 °C ou congelés, et testés 1 à 2 semaines après le prélèvement.

La sensibilité et la spécificité cliniques du test ADN *digene* HC2 GC-ID pour détecter les patientes atteintes d'une infection cliniquement active pouvant être transmise à leurs partenaires ou pouvant entraîner des séquelles liées au GC n'ont pas été déterminées par rapport à toutes les méthodes d'amplification des acides nucléiques (NAA) disponibles dans le commerce pour la détection de l'ADN de GC. Dans les études cliniques, les tests effectués avec un test NAA modifié disponible dans le commerce ont montré une positivité pour certains des échantillons positifs avec le test ADN *digene* HC2 GC-ID obtenus chez des patientes négatives avec le test de culture. La sensibilité estimée est basée sur le nombre de résultats positifs avec le test ADN *digene* HC2 GC-ID trouvés chez les patientes positives avec le test de culture de *Neisseria gonorrhoeae*. C'est pourquoi on peut seulement déduire la sensibilité du test ADN *digene* HC2 GC-ID par rapport à la positivité du test de culture d'une sensibilité de 60 à 85 %.

Tableau 7. Comparaison des résultats du test ADN *digene* HC2 GC-ID avec les tests de culture de GC pour les échantillons prélevés à la cytobrosse. Les caractéristiques de performance calculées en utilisant des valeurs seuil RLU/CO de 1,0 sont présentées ci-dessous. Les valeurs indiquées entre parenthèses représentent la performance en utilisant une valeur seuil RLU/CO de 2,5. Les intervalles de confiance à 95 % comprennent les deux valeurs lorsque les estimations de point différaient à chacune des valeurs seuil RLU/CO évaluées.

| | Site ² | <i>digene</i> HC2 GC-ID: Culture: n= | POS POS | POS NÉG | NÉG POS | NÉG NÉG | Sensibilité | PPV | Spécificité | NPV | <i>digene</i> HC2 GC-ID+ Culture- PCR ¹ + |
|-------------------------------------|-------------------|---|----------------|----------------|---------------|--------------------|--|--|--|--|---|
| Symptomatique | | | | | | | | | | | |
| IC à 95 % | 1 | 351 | 39 (38) | 7 (3) | 1 (2) | 304 (308) | 97,50 (95,00) 83,1-99,9 | 84,78 (92,68) 80,1-98,5 | 97,75 (99,04) 97,2-99,8 | 99,67 (99,35) 98,2-100 | 5/7 (2/3) |
| IC à 95 % | 2 | 188 | 13 | 2 | 4 | 169 | 76,47 | 86,67 | 98,83 | 97,69 | 1/2 |
| IC à 95 % | 3 | 233 | 14 | 6 (3) | 1 | 212 (215) | 50,1-93,2 93,33 | 59,5-98,3 70,00 (82,35) | 95,8-99,9 97,25 (98,62) | 94,2-99,4 99,54 | 0 ³ /6 |
| IC à 95 % | 4 | 163 | 4 | 0 | 0 | 159 | 68,1-99,8 100,00 | 56,6-96,2 100,00 | 96,0-99,7 100,00 | 97,4-100 100,00 | N/A |
| | Tous | 935 | 70 (69) | 15 (8) | 6 (7) | 844 (851) | 92,11 (90,79) 83,6-97,1 | 82,35 (89,61) 80,1-95,4 | 98,25 (99,07) 98,2-99,6 | 99,29 (99,18) 98,5-99,7 | 6³/15 |
| IC à 95 % Asymptomatique | | | | | | | | | | | |
| IC à 95 % | 1 | 101 | 10 (9) | 2 | 0 (1) | 89 | 100,00 (90,00) | 83,33 (81,82) | 97,80 | 100,00 (98,89) | 2/2 |
| IC à 95 % | 2 | 12 | 2 | 0 | 0 | 10 | 69,2-100 100,00 | 51,6-97,9 100,00 | 92,3-99,7 100,00 | 95,9-100 100,00 | N/A |
| IC à 95 % | 3 | 84 | 1 (0) | 0 | 0 (1) | 83 | 15,8-100 100,00 (0,00) | 15,8-100 100,00 | 69,2-100 100,00 | 69,2-100 (98,81) | N/A |
| IC à 95 % | 4 | 226 | 4 | 2 (0) | 1 | 219 (221) | 2,5-100 80,00 | 2,5-100 66,67 (100,00) | 95,7-100 99,10 (100,00) | 95,7-100 99,55 | 1/2 |
| IC à 95 % | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 28,4-99,5 N/A | 39,8-100 N/A | 98,3-100 100,00 | 97,5-100 100,0 | (N/A) N/A |
| | Tous | 424 | 17 (15) | 4 (2) | 1 (3) | 402 (404) | 94,44 (83,33) 72,7-99,9 | 80,95 (88,24) 63,6-98,5 | 99,01 (99,51) 98,2-99,9 | 99,75 (99,26) 98,6-100 | 3/4 (2/2) |
| IC à 95 % TOUS | | | | | | | | | | | |
| IC à 95 % | 1 | 452 | 49 (47) | 9 (5) | 1 (3) | 393 (397) | 98,00 (94,00) 89,4-100 | 84,48 (90,38) 79,0-96,8 | 97,76 (98,76) 97,1-99,6 | 99,75 (99,25) 98,6-100 | 7/9 (4/5) |
| IC à 95 % | 2 | 200 | 15 | 2 | 4 | 179 | 78,95 54,4-94,0 | 88,24 63,6-98,5 | 98,90 96,1-99,9 | 97,81 94,5-99,4 | 1/2 |
| IC à 95 % | 3 | 317 | 15 (14) | 6 (3) | 1 (2) | 295 (298) | 93,75 (87,50) 69,8-99,8 | 71,43 (82,35) 56,6-96,2 | 98,01 (99,00) 97,1-99,8 | 99,66 (99,33) 98,1-100 | 0 ³ /6 |
| IC à 95 % | 4 | 389 | 8 | 2 (0) | 1 | 378 (380) | 88,89 80,00 (100,00) | 80,00 63,1-100 N/A | 99,74 (100,00) | 99,74 | 1/2 (N/A) |
| IC à 95 % | 5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 51,8-99,7 N/A | 63,1-100 N/A | 99,0-100 100,00 | 98,5-100 100,00 | N/A |
| | Tous | 1359 | 87 (84) | 19 (10) | 7 (10) | 1246 (1255) | 92,55 (89,36) 85,3-97,0 | 82,08 (89,36) 81,3-94,8 | 98,50 (99,21) 98,6-99,6 | 99,44 (99,21) 98,9-99,8 | 9³/19 |

¹ Cette indication est fournie à titre informatif uniquement ; les résultats de l'échantillon n'ont pas été résolus à l'aide de la PCR.

² Le site numéro 5 ne disposait d'aucun échantillon prélevé à la cytobrosse provenant de patientes asymptomatiques.

³ Dans deux cas, la PCR n'a pas été effectuée.

N/A = Not Applicable (pas applicable)

Tableau 8. Comparaison des résultats du test ADN *digene* HC2 GC-ID avec les tests de culture de GC pour les échantillons prélevés à l'écouvillon. Les caractéristiques de performance calculées en utilisant des valeurs seuil RLU/CO de 1,0 sont présentées ci-dessous. Les valeurs indiquées entre parenthèses représentent la performance en utilisant une valeur seuil RLU/CO de 2,5. Les intervalles de confiance à 95 % comprennent les deux valeurs lorsque les estimations de point différaient à chacune des valeurs seuil RLU/CO évaluées.

| | Site ² | <i>digene</i> HC2 GC-ID: Culture: n= | POS POS | POS NÉG | NÉG POS | NÉG NÉG | Sensibilité | PPV | Spécificité | NPV | <i>digene</i> HC2 GC-ID+ Culture- PCR ¹⁺ |
|-------------------------------------|-------------------|---|----------------|---------------|--------------|------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--|
| Symptomatique | | | | | | | | | | | |
| IC à 95 % | 1 | 354 | 34 (31) | 2 (3) | 2 (5) | 316 (315) | 94,44 (87,18) 81,34-99,32 | 94,44 (91,18) 81,34-99,32 | 99,37 (99,06) 97,75-99,92 | 99,37 (98,44) 97,75-99,92 | N/A |
| IC à 95 % | 2 | 92 | 13 | 2 (0) | 1 | 76 (78) | 92,86 66,1-99,8 | 86,67 (100) 75,3-100 | 97,44 (100) 95,4-100 | 98,70 (98,73) 93,2-100 | 0/2 |
| IC à 95 % | 3 | 5 | 2 | 0 | 0 | 3 | 100 15,8-100 | 100 15,8-100 | 100 29,2-100 | 100 29,2-100 | N/A |
| IC à 95 % | 5 | 162 | 0 | 3 (1) | 0 | 159 (161) | N/A 2,5-100 | 0,00 2,5-100 | 98,15 (99,38) 96,6-100 | 100 97,7-100 | 1 ³ /3 |
| | Tous | 613 | 49 (46) | 7 (4) | 3 (6) | 554 (557) | 94,23 (88,46) 84,05-98,79 | 87,50 (92,00) 75,93-94,82 | 98,75 (99,29) 97,45-99,50 | 99,46 (98,93) 98,43-99,89 | 1³/5 |
| IC à 95 % Asymptomatique | | | | | | | | | | | |
| IC à 95 % | 1 | 61 | 1 | 0 | 1 | 59 | 50,00 1,26-98,74 | 100 2,50-100 | 100 93,94-100 | 98,33 91,06-99,96 | N/A |
| IC à 95 % | 2 | 10 | 2 | 0 | 0 | 8 | 100 15,8-100 | 100 15,8-100 | 100 63,1-100 | 100 63,1-100 | N/A |
| IC à 95 % | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | N/A N/A | N/A N/A | 100 15,8-100 | 100 15,8-100 | N/A |
| IC à 95 % | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | N/A N/A | N/A N/A | 100 2,5-100 | 100 2,5-100 | N/A |
| IC à 95 % | 5 | 186 | 1 | 0 | 0 | 185 | 100 2,5-100 | 100 2,5-100 | 100 98,0-100 | 100 98,0-100 | N/A |
| | Tous | 260 | 4 | 0 | 1 | 255 | 80,00 28,36-99,49 | 100 39,76-100 | 100 98,56-100 | 99,61 97,84-99,89 | N/A |
| IC à 95 % TOUS | | | | | | | | | | | |
| IC à 95 % | 1 | 415 | 35 (32) | 5 (3) | 3 (6) | 372 (374) | 92,11 (84,21) 78,62-98,34 | 87,50 (91,43) 73,20-95,81 | 98,67 (99,20) 96,93-99,57 | 99,20 (98,42) 97,68-99,83 | N/A |
| IC à 95 % | 2 | 102 | 15 | 2 (0) | 1 | 84 (86) | 93,75 69,8-99,8 | 88,24 (100) 63,6-100 | 97,67 (100) 91,9-100 | 98,82 (98,85) 93,6-100 | 0/2 |
| IC à 95 % | 3 | 7 | 2 | 0 | 0 | 5 | 100 15,8-100 | 100 15,8-100 | 100 47,8-100 | 100 47,8-100 | N/A |
| IC à 95 % | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | N/A N/A | N/A N/A | 100 2,5-100 | 100 2,5-100 | N/A |
| IC à 95 % | 5 | 348 | 1 | 3 (1) | 0 | 344 (346) | 100 2,5-100 | 25,00 (50,00) 1,3-98,7 | 99,14 (99,71) 98,4-100 | 100 98,9-100 | 1 ³ /3 |
| | Tous | 873 | 53 (50) | 10 (4) | 4 (7) | 806 (812) | 92,98 (87,72) 83,00-98,05 | 84,13 (92,59) 72,74-92,12 | 98,77 (99,51) 97,76-99,41 | 99,51 (92,59) 98,74-99,87 | 1³/5 |

1 Cette indication est fournie à titre indicatif uniquement ; les résultats des échantillons n'ont pas été résolus en utilisant un test PCR.

2 Le site numéro 4 ne disposait d'aucun échantillon prélevé à l'écouvillon pour les patientes asymptomatiques.

3 Dans deux cas, la PCR n'a pas été effectuée.

N/A = Not Applicable (pas applicable)

REPRODUCTIBILITÉ

Dans le cadre de l'étude clinique multicentrique, une étude de LA reproductibilité a été conduite pour déterminer la reproductibilité entre les tests, les jours et les sites ainsi que la reproductibilité totale du test ADN *digene* HC2 GC-ID en utilisant un panel composé de cibles ADN de *Neisseria gonorrhoeae* et d'échantillons cliniques positifs et négatifs avec le test ADN *digene* HC2 GC-ID.

Un panel de 10 éléments composé d'échantillons et cliniques non-cliniques dénaturés et masqués, comportant 8 échantillons positifs et 2 échantillons négatifs, ont été testés en réplicat de six, deux fois par jour sur une période de trois jours dans chacun des 4 sites (3 sites extérieurs et QIAGEN). Chaque site a produit 36 points de données pour chaque cible testée. Tous les échantillons étaient dénaturés et conservés congelés avant le test. On a observé une concordance de 100 % pour les 1152 résultats positifs attendus (1152/1152) et une concordance de 100 % pour les 288 résultats négatifs attendus (288/288). La concordance globale était de 100 % (1440/1440), avec un intervalle de confiance à 95 % compris entre 99,7 et 100 et Kappa = 1,00. On n'a pas observé de variation notable entre les tests, les jours ou les sites ; pour cette raison, les données de tous les tests de chaque site ont été groupées et sont présentées ci-dessous (Tableau 9).

Tableau 9. Reproductibilité du test ADN *digene* HC2 GC-ID dans l'étude multicentrique.

| Numéro de cible | Site 1 | | Site 2 | | Site 3 | | Site 4 | | Total | | |
|-----------------|-------------------|-------------|-------------------|-------------|-------------------|-------------|-------------------|-------------|-------------------|-----------------|-------------|
| | \bar{X} RLU /CO | % Con-cord. | \bar{X} RLU /CO | Observé/Attendu | % Con-cord. |
| 1 | 2,5 | 100 | 2,1 | 100 | 2,7 | 100 | 2,6 | 100 | 2,5 | 144/144 | 100 |
| 2 | 4,8 | 100 | 4,2 | 100 | 5,0 | 100 | 5,2 | 100 | 4,8 | 144/144 | 100 |
| 3 | 29,4 | 100 | 23,3 | 100 | 30,1 | 100 | 30,4 | 100 | 28,3 | 144/144 | 100 |
| 4 | 51,5 | 100 | 43,0 | 100 | 52,1 | 100 | 54,1 | 100 | 50,2 | 144/144 | 100 |
| 5 | 2,5 | 100 | 2,0 | 100 | 2,5 | 100 | 2,5 | 100 | 2,4 | 144/144 | 100 |
| 6 | 4,7 | 100 | 3,5 | 100 | 4,9 | 100 | 4,8 | 100 | 4,5 | 144/144 | 100 |
| 7 | 14,0 | 100 | 10,6 | 100 | 13,9 | 100 | 14,1 | 100 | 13,2 | 144/144 | 100 |
| 8 | 16,7 | 100 | 12,7 | 100 | 17,4 | 100 | 18,2 | 100 | 16,3 | 144/144 | 100 |
| 9 | 0,2 | 100 | 0,2 | 100 | 0,2 | 100 | 0,2 | 100 | 0,2 | 144/144 | 100 |
| 10 | 0,2 | 100 | 0,2 | 100 | 0,2 | 100 | 0,2 | 100 | 0,2 | 144/144 | 100 |
| TOTAL | | | | | | | | | | 1440/1440 | 100 |

Une seconde étude de la compétence/reproductibilité effectuée avec des organismes entiers de *Neisseria gonorrhoeae* (GC) implantés dans une matrice d'échantillons cliniques simulés composée de cellules épithéliales a été conduite dans trois sites extérieurs. Les 25 échantillons testés comprenaient des échantillons négatifs, faiblement positifs (à la limite ou proche de la limite de détection) et moyennement positifs pour 2 souches de GC, des échantillons présentant une co-infection avec *Chlamydia trachomatis* (CT) et des échantillons contenant du sang. On s'attendait à ce que douze échantillons soient positifs et treize négatifs. Le pourcentage de concordance entre les résultats observés et les résultats attendus du test ADN *digene* HC2 GC-ID dans les trois sites de test individuel et pour tous les sites groupés est présentée au tableau 10. Les valeurs relatives à la sensibilité, à la spécificité, à la concordance et à kappa pour chaque site sont indiquées au tableau 11.

Tableau 10. % de concordance du test ADN *digene* HC2 GC-ID par site.

| Site | Observé/Attendu | % Concordance* |
|---------------|-----------------|-----------------------|
| 1 | 25/25 | 100 % (86,28 %-100 %) |
| 2 | 25/25 | 100 % (86,28 %-100 %) |
| 3 | 25/25 | 100 % (86,28 %-100 %) |
| Sites groupés | 75/75 | 100 % (95,20 %-100 %) |

* Les chiffres entre parenthèses indiquent les intervalles de confiance à 95 %.

Tableau 11. Résultats des statistiques du test ADN *digene* HC2 GC-ID (valeur seuil de 1,0).

| Mesure statistique | Site 1 | Site 2 | Site 3 | Global |
|--------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Sensibilité | 100 % (73,54 %-100 %)* | 100 % (73,54 %-100 %) | 100 % (73,54 %-100 %) | 100 % (90,26 %-100 %) |
| Spécificité | 100 % (75,29 %-100 %) | 100 % (75,29 %-100 %) | 100 % (75,29 %-100 %) | 100 % (90,97 %-100 %) |
| Concord. | 100 % (86,28 %-100 %) | 100 % (86,28 %-100 %) | 100 % (86,28 %-100 %) | 100 % (95,20 %-100 %) |
| K | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |

* Les chiffres entre parenthèses indiquent les intervalles de confiance à 95%.

Lors du test de compétence de routine, 12 échantillons équivoques présentés au tableau 10, tous contenant de faibles concentrations en organismes GC (~ 5 x 10⁴ organismes/ml) seront interprétés conformément au chapitre *Interprétation des résultats* de la présente notice comme présumés positifs. Par conséquent, le test a prouvé sa capacité à détecter l'ADN de GC dans des échantillons possédant une concentration en organismes détectable à la limite ou proche de la limite de détection du test. Des preuves supplémentaires ont été observées lorsque l'on a testé un panel disponible qui contenait des échantillons avec un nombre peu élevé d'organismes dans une marge destinée à une détection par test d'amplification des acides nucléiques. Le test effectué dans trois sites extérieurs et chez QIAGEN a donné 100 % de résultats positifs (ou présumés positifs) pour les échantillons du panel contenant des organismes GC. Dans deux cas, les valeurs RLU/CO étaient comprises dans la zone équivoque (voir le tableau 12 ci-dessous).

Tableau 12. Résultats du panel d'échantillons CT et GC

| Résultat du test ADN <i>digene</i> HC2 GC-ID | | | |
|--|--------|----------------|------------------|
| Site | RLU/CO | Interprétation | Résultat attendu |
| 1 | 0,12 | NÉG | NÉG |
| | 10,45 | POS | POS |
| | 10,26 | POS | POS |
| | 9,74 | POS | POS |
| | 0,14 | NÉG | NÉG |
| 2 | 0,09 | NÉG | NÉG |
| | 9,31 | POS | POS |
| | 9,93 | POS | POS |
| | 9,69 | POS | POS |
| | 0,09 | NÉG | NÉG |
| 3 | 0,11 | NÉG | NÉG |
| | 11,00 | POS | POS |
| | 12,08 | POS | POS |
| | 9,45 | POS | POS |
| | 0,10 | NÉG | NÉG |
| 4 | 0,07 | NÉG | NÉG |
| | 8,54 | POS | POS |
| | 7,27 | POS | POS |
| | 8,09 | POS | POS |
| | 0,08 | NÉG | NÉG |

PRÉCISION

Une étude de la précision a été effectuée dans trois sites afin de déterminer la précision intra-essai et la précision totale du test ADN *digene* HC2 GC-ID en utilisant un panel d'échantillons cliniques simulés et masqués positifs et négatifs. De plus, la précision intra-appareil et inter-appareils observée à l'aide de deux luminomètres différents, a été évaluée en utilisant le même panel. Les deux modèles de luminomètres comprenaient le luminomètre DML 2000, qui est l'un des appareils recommandés lors de l'utilisation du test ADN *digene* HC2 GC-ID, et le luminomètre MLX, l'un des modèles de luminomètres utilisés lors de l'évaluation clinique mais qui n'est désormais plus disponible. L'un des trois sites a rencontré des difficultés avec les autres tests ADN *digene* HC2 effectués, liées à la technique du test, vraisemblablement en raison d'une formation inappropriée ou inadéquate. Bien que les résultats du test

de précision pour le test ADN *digene* HC2 GC-ID n'en aient pas été affectés, le technicien procédant au test a été de nouveau formé à la technique de test appropriée.

Le tableau 13 montre la performance du test ADN *digene* HC2 GC-ID pour l'ensemble des sites (y compris le site qui a rencontré des problèmes techniques avant la nouvelle formation du technicien à la technique de test appropriée). Le test a montré une précision équivalente après que le technicien ait été reformé. Cependant, l'élément 3 du panel (qui contenait de faibles concentrations en organismes GC), les valeurs RLU/CO observées étaient comprises dans ou étaient proches de la zone équivoque du test, allant de 1,0 à 2,5. Dans le cadre des présentes analyses de données, toutes les valeurs RLU/CO comprises dans la zone équivoque ou qui dépassaient 2,5 ont été interprétées comme positives. Bien que cela n'apparaisse pas clairement sur le tableau, les résultats qualitatifs sont 100 % (54/54) (IC à 95 % : 93,4 % à 100 %), en concordance avec les résultats attendus aux trois sites.

Tableau 13. Estimations de la précision intra-appareil, inter-appareils, intra-essai et totale pour le rapport RLU/CO par test et par cible

| Élément du panel | n | Moyenne RLU/CO | Intra-appareil | | Inter-appareils | | Intra-essai | | Totale | |
|------------------|----|----------------|-----------------------|---------|-----------------|--------|-------------|---------|--------|---------|
| | | | Déviat. standard (DS) | (CV%) | (DS) | (CV%) | (DS) | (CV%) | (DS) | (CV%) |
| 1 | 54 | 0,0974 | 0,0104 | 10,6818 | 0,0017 | 1,7328 | 0,0275 | 28,2556 | 0,0275 | 28,1978 |
| 2 | 54 | 0,0967 | 0,0111 | 11,5031 | 0,0015 | 1,5618 | 0,0338 | 34,9362 | 0,0342 | 35,4230 |
| 3 | 54 | 3,2335 | 0,1502 | 4,6462 | 0,0356 | 1,0997 | 0,3520 | 10,8869 | 0,3866 | 11,9551 |
| 4 | 54 | 3,8407 | 0,2078 | 5,4092 | 0,0525 | 1,3671 | 0,3401 | 8,8541 | 0,3487 | 9,0802 |
| 5 | 54 | 16,1676 | 1,0507 | 6,4986 | 0,1122 | 0,6940 | 2,1788 | 13,4766 | 2,1437 | 13,2589 |
| 6 | 54 | 18,0704 | 1,0539 | 5,8321 | 0,3456 | 1,9124 | 2,3701 | 13,1158 | 2,3316 | 12,9027 |

Dans le cadre des présentes analyses de données, toutes ces valeurs RLU/CO comprises dans la zone équivoque ou dépassant 2,5 ont été interprétées comme positives. Une étude supplémentaire de la précision a été effectuée par QIAGEN pour déterminer la précision totale du test ADN *digene* HC2 GC-ID en utilisant le luminomètre DML 2000. Un panel de précision composé de six éléments a été préparé en utilisant une matrice d'échantillons cliniques simulée se composant de cellules épithéliales en culture suspendues dans le STM *digene* et composé de deux échantillons négatifs, deux échantillons de faible positivité et deux échantillons de positivité intermédiaire, et contenant tous une cytotresse de prélèvement. Chaque panel a été testé en triple, deux panels par microplaque, par deux techniciens différemment pendant 5 jours. Pour chaque microplaque, un panel fraîchement dénaturé a été utilisé. Les résultats de la précision totale pour le test ADN *digene* HC2 GC-ID, groupés pour chacun des cinq jours de test, sont présentés au tableau 14. Bien que cela n'apparaisse pas clairement sur ces tableaux, l'interprétation qualitative des résultats concordait à 100 % avec le résultat attendu (120/120 ; IC à 95 % : 96,97 %-100 %), lorsque l'on a utilisé un rapport RLU/CO de 1,0.

Tableau 14. Précision totale pour le test ADN *digene* HC2 GC-ID.

| Élément du panel | n | RLU/CO moyenne | DS | CV% | Moyenne -2xDS | Moyenne +2xDS |
|------------------|-----|----------------|--------|-------|---------------|---------------|
| 1 | 120 | 0,11 | 0,0361 | 32,28 | 0,04 | 0,18 |
| 2 | 120 | 0,11 | 0,0283 | 26,45 | 0,05 | 0,16 |
| 3 | 120 | 3,03 | 0,3212 | 10,62 | 2,38 | 3,67 |
| 4 | 120 | 4,06 | 0,4151 | 10,23 | 3,23 | 4,89 |
| 5 | 120 | 14,41 | 2,2239 | 15,44 | 9,96 | 18,85 |
| 6 | 120 | 13,34 | 1,7298 | 12,97 | 9,88 | 16,80 |

PRÉCISION AVEC DES ÉCHANTILLONS EN SOLUTION PRESERV CYT

Une étude multicentrique a été réalisée pour déterminer la précision du test entre les laboratoires et les jours pour l'analyse d'échantillons en solution PreservCyt. Deux sites externes à QIAGEN ont testé un panel de douze éléments composés de prélèvements de patientes simulés collectés en solution PreservCyt. Chaque laboratoire a ensuite testé le panel en triple, deux fois par jour pendant trois jours en utilisant le même lot de réactifs. Le panel de douze éléments de prélèvements simulés en solution PreservCyt a été préparé avec des quantités variables de GC (Auxotype 22 ; ATCC 27631) pour créer un panel tel qu'indiqué au tableau 15.

Tableau 15. Panel de précision d'échantillons simulés en solution PreservCyt pour le test ADN *digene* HC2 GC-ID.

| Série de prélèvements | Éléments du panel* | Résultat anticipé du test ADN <i>digene</i> HC2 GC-ID | RLU/CO approximatif |
|-----------------------|--------------------|---|---------------------|
| A | 1P, 2P, 7P, 8P | GC Faiblement positif | ~5 |
| B | 3P, 4P, 9P, 10P | GC Moyennement positif | ~10 |
| C | 5N, 11N | Négatif | ~0,20 |
| D | 6N, 12N | Négatif | ~0,20 |

*L'identifiant du prélèvement indique le statut connu de *Neisseria gonorrhoeae* [positif (P) or négatif (N)]

Dans le but d'analyser les données, les éléments du panel dérivés de la même série de prélèvements ont été regroupés.

Tableau 16. Résultats qualitatifs par série de prélèvements – Procédure du test ADN *digene* HC2 GC-ID.

| Pool de séries de prélèvements | GC Positif n (%) | Équivoque n (%) | Négatif n (%) | Total |
|---------------------------------------|------------------|-----------------|---------------|-------|
| Négatif (5N, 11N) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 108 (100) | 108 |
| Négatif (6N, 12N) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 108 (100) | 108 |
| Totaux des négatifs | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 216 (100) | 216 |
| Faiblement positif (1P, 2P, 7P, 8P) | 216 (100) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 216 |
| Moyennement positif (3P, 4P, 9P, 10P) | 216 (100) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 216 |
| Totaux des positifs | 432 (100) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 432 |

Tableau 17. Déviation standard (DS) et Coefficients de Variation (CV) pour la précision par laboratoire et par jour : test ADN *digene* HC2 GC-ID en solution PreservCyt

| Prélèvement | N | RLU/CO Moyenne | DS intra-série | DS inter-séries | DS entre jours | DS entre sites | DS totale | CV% |
|--|-----|----------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|-----------|------|
| Négatif (5N, 11N) | 108 | 0,201 | 0,037 | 0,019 | 0* | 0,032 | 0,052 | 25,9 |
| Négatif (6N, 12N) | 108 | 0,198 | 0,055 | 0,016 | 0,019 | 0,021 | 0,064 | 32,3 |
| GC Moyennement positif (3P, 4P, 9P, 10P) | 216 | 7,981 | 0,906 | 1,203 | 0 | 0,243 | 1,526 | 19,1 |
| GC Faiblement positif (1P, 2P 7P, 8P) | 216 | 4,648 | 0,675 | 0,478 | 0,308 | 0 | 0,883 | 19,0 |

*Les composants à variance négative sont indiqués par un zéro.

SENSIBILITÉ ANALYTIQUE

La sensibilité analytique (limites de détection) du test ADN *digene* HC2 GC-ID a été déterminée en testant directement les dilutions d'un panel d'échantillons se composant de 114 isolats séparés de *Neisseria gonorrhoeae*. Les 114 isolats représentaient 13 auxotypes, 5 sérovars et 10 souches résistantes aux antibiotiques, 6 isolats de souches sans plasmide et 2 isolats non caractérisés trouvés discordants dans l'étude multicentrique. Des séries de dilution à quatre points de chacun des isolats ont été testées une fois en utilisant le test ADN *digene* HC2 GC-ID afin de déterminer les limites de détection du test. La limite de détection pour chaque auxotype de *Neisseria* est résumée au tableau 18. La limite

de détection indiquée est la dilution de chaque auxotype détectée dans ou très proche de la zone équivoque du test, zone comprise entre 1,0 et 2,5 RLU/CO.

La sensibilité analytique du test ADN *digene* HC2 GC-ID variait entre 25 et 50 000 CFU/test pour les 114 isolats de *Neisseria* testés, y compris les auxotypes, les sérovars, les souches sans plasmide et celles résistantes aux antibiotiques. Seule une des souches sans plasmide et un des cinq sérovars IA-5 de *Neisseria gonorrhoeae* testés ont été détectés à 50 000 CFU/test ; aucun des autres 112 isolats n'a été détecté à des concentrations dépassant 5000 CFU/test. La limite de détection moyenne pour les 114 isolats était comprise entre 974 et 2887 CFU/test en prenant en considération les dilutions d'isolats comprises dans la zone équivoque du test ainsi que celles situées au-dessus de 2,5 RLU/CO. La limite de détection moyenne globale était de 1931 CFU/test ($3,8 \times 10^4$ CFU/ml). Pour les échantillons cliniques qui contiennent des organismes à la limite de détection ou proche de celle-ci, il peut être nécessaire de procéder à un nouveau test à l'aide d'une autre procédure de test ou sur un nouvel échantillon provenant de la même patiente, comme indiqué au chapitre *Interprétation des résultats* de la présente notice.

Tableau 18. Résumé des limites de sensibilité détectables pour les auxotypes, sérovars, souches sans plasmide et souches résistantes aux antibiotiques de GC.

| Auxotype | Concentration détectable | |
|---|----------------------------------|--------------|
| | CFU/ml | CFU/test |
| <i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype 1 | 1000 | 50 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype 12 | 500-5000 | 25 - 250 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype 16 | 10 ³ -10 ⁴ | 50 - 500 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype 22 | 10 ⁴ -10 ⁵ | 500 - 5000 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype 5 | 500-5000 | 25 - 250 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype 9 | 5 x10 ⁴ | 2500 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype AHU (5 isolats) | 10 ⁴ -10 ⁵ | 500 - 5000 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype Arg (5 isolats) | 10 ⁴ -10 ⁵ | 500 - 5000 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype AU (5 isolats) | 10 ³ -10 ⁴ | 50 - 500 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype PAU (5 isolats) | 10 ³ -10 ⁵ | 50 - 5000 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype Pro (5 isolats) | 10 ⁴ -10 ⁵ | 500 - 500 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> Auxotype Proto (5 isolats) | 10 ³ -10 ⁴ | 50 - 500 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> intermédiaire de la Ciprofloxacine (Cipl) (5 isolats) | 10 ³ -10 ⁵ | 50 - 5000 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> résistant à la Ciprofloxacine (Cip R) (4 isolats) | 10 ³ -10 ⁴ | 50 - 500 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> CMRNG (5 isolats) | 10 ⁴ -10 ⁵ | 50 - 5000 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> Autre-5423 | 10 ⁴ -10 ⁵ | 50 - 5000 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> Autre-5658 | 10 ³ -10 ⁴ | 50 - 500 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> PenR (5 isolats) | 10 ⁴ -10 ⁵ | 500 - 5000 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> PenR (5 isolats) | 10 ³ -10 ⁶ | 50 - 50 000 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> souches sans plasmide (6 isolats) | 10 ⁴ -10 ⁵ | 500 - 5000 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> PPNG 3.05 (5 isolats) | 10 ⁴ -10 ⁵ | 500 - 5000 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> PPNG 3.2 | 10 ³ -10 ⁵ | 50 - 5000 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> PPNG 4.4 (4 isolats) | 10 ⁴ -10 ⁵ | 500 - 5000 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> Sérovar I A-1 ou IA-2 (5 isolats) | 10 ⁴ -10 ⁶ | 500 - 50 000 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> Sérovar I A-5 (4 isolats) | 10 ³ -10 ⁴ | 50 - 500 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> Sérovar I B-1 (5 isolats) | 10 ³ -10 ⁵ | 50 - 5000 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> Sérovar I B-4 ou IB-15 (5 isolats) | 10 ³ -10 ⁵ | 50 - 5000 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> résistant à la Spectinomycine (SpecR) | 10 ⁵ | 5000 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> TetR (5 isolats) | 10 ³ -10 ⁵ | 50 - 5000 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> TRNG américain (5 isolats) | 10 ⁴ -10 ⁵ | 500 - 5000 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> TRNG hollandais (5 isolats) | 10 ⁴ -10 ⁵ | 500 - 5000 |
| <i>N. gonorrhoeae</i> Souche Type | 500-5000 | 25 - 250 |

CONSIDÉRATIONS SUPPLÉMENTAIRES POUR LES PRÉLÈVEMENTS EN SOLUTION PRESERVCYT

Les études de limite de détection décrites dans la section précédente pour le STM n'ont pas été répétées en utilisant des échantillons en solution PreservCyt puisqu'on s'attend à ce que la sensibilité analytique du test soit indépendante du type de prélèvement dans le STM ou en solution PreservCyt, en particulier parce que les échantillons en solution PreservCyt sont soumis à une procédure de conservation (pour plus de détails, consulter les instructions d'utilisation du kit de conversion d'échantillon *digene* HC2) qui rend les échantillons en solution PreservCyt similaires en ce qui concerne leur composition aux échantillons dans le STM avant l'utilisation du test ADN *digene* HC2 GC-ID.

Cependant, parce que les échantillons en solution PreservCyt sont soumis à une étape de centrifugation pendant la procédure de conversion, il a été nécessaire d'évaluer l'éventuel impact de la centrifugation sur la sensibilité analytique du test ADN *digene* HC2 GC-ID. Pour évaluer cet éventuel impact de la centrifugation sur la sensibilité analytique, quatre vingt huit (88) paires d'échantillons dans le STM et en solution PreservCyt négatifs pour l'ADN de *Neisseria gonorrhoeae* ont été préparés avec des quantités correspondantes d'organismes de *Neisseria gonorrhoeae* (souche sans plasmide NRL 33151). Les échantillons appariés ont été testés et leur sensibilité analytique a été estimée en comparant les valeurs RLU/CO moyennes obtenues [(PreservCyt/STM) x 100].

Tableau 19. Comparaison de la sensibilité analytique du test ADN *digene* HC2 GC-ID – Échantillons en solution PreservCyt (PC) et dans le STM appariés

| | Test ADN <i>digene</i> HC2 GC-ID | | PreservCyt/STM RLU/CO |
|------------------------------|----------------------------------|------------|--------------------------|
| | STM | PreservCyt | |
| Nombre d'échantillons | 88 | 88 | - |
| Moyenne RLU/CO | 3,97 | 4,91 | 1,24 |
| RLU/CO médiane | 4,01 | 4,93 | 1,23 |
| Déviation standard | 0,34 | 1,00 | - |
| RLU/CO minimum | 3,06 | 2,30 | - |
| RLU/CO maximum | 4,77 | 7,10 | - |

Une étude supplémentaire a fourni une comparaison similaire avec des échantillons de patientes simulés appariés. Des échantillons de patientes prélevés en solution PreservCyt ont été obtenus dans un site extérieur à QIAGEN et analysés avec le test ADN *digene* HC2 GC-ID pour identifier les échantillons positifs. Ces échantillons positifs de patientes ont ensuite été combinés pour générer un total de 10 pools d'échantillons PreservCyt concentrés. À partir de ces pools, deux aliquots ont été préparés et ont été traités pour former des culots cellulaires. Les culots cellulaires ont été remis en suspension dans de la solution saline tamponnée phosphate (PBS). L'aliquot A a été préparé en ajoutant le culot resuspendu au STM et l'aliquot B a été préparé en ajoutant le culot resuspendu au PreservCyt. Les deux aliquots ont été testés avec le test ADN *digene* HC2 GC-ID avec les résultats suivants :

Tableau 20. Comparaison de la sensibilité analytique du test ADN *digene* HC2 GC-ID -Échantillons de patientes simulés (en pools) en solution PreservCyt (PC) appariés avec des échantillons dans le STM.

| | Test ADN <i>digene</i> HC2 GC-ID | | PreservCyt:STM RLU/CO |
|------------------------------|----------------------------------|------------|--------------------------|
| | STM | PreservCyt | |
| Nombre d'échantillons | 10 | 10 | - |
| Moyenne RLU/CO | 4,80 | 4,32 | 0,90 |
| RLU/CO médiane | 2,66 | 2,47 | 0,93 |
| Déviation standard | 5,44 | 5,08 | - |
| RLU/CO minimum | 1,16 | 1,02 | - |
| RLU/CO maximum | 18,97 | 17,26 | - |

SPÉCIFICITÉ ANALYTIQUE

Un grand nombre de bactéries, virus et plasmides, et du matériel cellulaire humain ou des produits sanguins potentiellement trouvés dans l'appareil anogénital féminin ont été testés afin de déterminer si des réactions croisées pouvaient exister avec le test ADN *digene* HC2 GC-ID. Tous les micro-organismes ont été testés à des concentrations de 10^5 et 10^7 organismes par ml ou CFU par ml, et lorsque cela était possible à 10^9 organismes par ml ou CFU par ml, sauf indication ci-dessous. L'ADN purifié des virus et des plasmides a été testé à diverses concentrations comme indiqué ci-dessous.

Liste des bactéries testées ci-dessous.

| | |
|--|--|
| <i>Acinetobacter anitratus</i> | <i>Neisseria caviae</i> (2 isolats) ^e |
| <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | <i>Neisseria cuniculi</i> (3 isolats) ^f |
| <i>Acinetobacter Iwoffii</i> | <i>Neisseria cinera</i> (6 isolats) |
| <i>Achromobacter xerosis</i> | <i>Neisseria flavescens</i> (4 isolats) |
| <i>Actinomyces israelii</i> | <i>Neisseria espèces g</i> * |
| <i>Alcaligenes faecalis</i> | <i>Neisseria lactamica</i> (6 isolats) ^d |
| <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Neisseria meningitidis</i> (Grpes A, B, C, W135, Y) |
| <i>Bacteroides fragilis</i> | <i>Neisseria mucosa</i> (6 isolats) ^d |
| <i>Bacteroides melaninogenicus</i> | <i>Neisseria polysaccharea</i> |
| <i>Branhamella catarrhalis</i> (6 isolats) | <i>Neisseria sicca</i> (6 isolats) |
| <i>Candida albicans</i> | <i>Neisseria subflava</i> |
| <i>Candida glabrata</i> | <i>Neisseria subflava biovar flava</i> (5 isolats) |
| <i>Chlamydia pneumoniae</i> ^b | <i>Neisseria subflava biovar perflava</i> (4 isolats) ^h |
| <i>Chlamydia psittaci</i> ^a (2 souches) | <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> ^b (sérovar B, Ba, E, J, L3) ^c | <i>Peptostreptococcus asaccharalyicus</i> |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | <i>Peptostreptococcus productus</i> |
| <i>Enterococcus avium</i> | <i>Proteus mirabilis</i> |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | <i>Proteus vulgaris</i> |
| <i>Escherichia coli</i> (isolat clinique) [†] | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^a |
| <i>Escherichia coli</i> (HB101) [†] | <i>Salmonella minnesota</i> |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> | <i>Salmonella typhimurium</i> |
| <i>Gardnerella vaginalis</i> | <i>Serratia marcescens</i> |
| <i>Gemella heamolysans</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> (ProtA +) |
| <i>Haemophilus ducreyi</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | <i>Streptococcus agalactiae</i> (Grpe B) |
| <i>Kingella denitrificans</i> ^d | <i>Streptococcus pyogenes</i> (Grpe A) |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Streptomyces griseus</i> |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | <i>Treponema pallidum</i> |
| <i>Mobiluncus curtisii</i> | <i>Trichomonas vaginalis</i> ⁱ |
| <i>Mobiluncus mulieris</i> | <i>Ureaplasma urealyticum</i> |
| <i>Moraxella lacunata</i> | |
| <i>Mycoplasma hominis</i> | |
| <i>Mycoplasma hyorhinis</i> | |

Concentrations testées (organismes/ml ou CFU/ml pour les espèces de *Neisseria*) :

^a 5×10^6 , 5×10^7 , 5×10^8 , 8×10^4 , 8×10^6 , 8×10^8 , 9×10^4 , 9×10^6 , 9×10^8

^b 2×10^5 , 2×10^7 et 2×10^8

^c 1×10^5 , 1×10^7 et 1×10^8

^d 5×10^6 , 5×10^7 , 5×10^8

^e $1,1 \times 10^5$, $1,1 \times 10^7$, $1,1 \times 10^9$

^f $9,7 \times 10^5$, $9,7 \times 10^6$, $9,7 \times 10^8$

^g 2×10^7 , 2×10^8 et 2×10^9

^h $4,8 \times 10^4$, $4,8 \times 10^6$, $4,8 \times 10^8$

ⁱ 1×10^5 et 1×10^6

[†] La souche de *E. coli* utilisée pour cultiver les plasmides (HB101) et un isolat clinique de *E. coli* ont été testés.

* La souche de *Neisseria* de ATCC a les caractéristiques du *Neisseria gonorrhoeae* et du *Neisseria meningitidis* (ATCC Réf. 43831).

Toutes les bactéries autres que *Neisseria gonorrhoeae* potentiellement trouvées dans l'appareil urogénital, à l'exception des trois souches commensales de *Neisseria* et *Chlamydia psittaci*, ont été testés négatives avec le test ADN *digene* HC2 GC-ID. Seule une réactivité croisée modérée interprétée comme présumée positive a été observée avec *Chlamydia psittaci* et *Neisseria lactamica*. Une telle réactivité croisée ne doit pas avoir d'impact sur l'interprétation des résultats du test ADN *digene* HC2 GC-

ID des échantillons urogénitaux. Les organismes qui ont présenté un certain degré de réactivité croisée sont les suivants :

| | Interprétation | Concentration à laquelle la réactivité croisée a été observée |
|---|-------------------|---|
| <i>Chlamydia psittaci</i> (1 isolat sur 2) | Présumée positif* | 1 x 10 ⁷ organismes/ml |
| <i>Neisseria lactamica</i> (1 isolat sur 6) | Présumée positif* | 1 x 10 ⁹ CFU/ml |
| <i>Neisseria meningitidis</i> (Groupe Y, 1 isolat sur 2) | Positif | 1 x 10 ⁷ CFU/ml |
| <i>Neisseria mucosa</i> (1 isolat sur 6) | Positif | 5 x 10 ⁵ CFU/ml |

* RLU/CO compris dans la zone équivoque du test allant de 1,00 à 2,50.

Les trois souches commensales de *Neisseria*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria meningitidis*, et *Neisseria mucosa*, sont toutes principalement retrouvées dans le nasopharynx et dans les voies supérieures du système respiratoire. Elles sont rarement, voire pas du tout, isolées dans le système urogénital.^{13, 14} De plus, la réaction croisée de l'isolat *Neisseria meningitidis* de Groupe Y a été définie comme de type lipopolysaccharide non-caractérisable et est rarement retrouvé dans la population générale. *Chlamydia psittaci* peut être détecté sur la peau de certaines personnes travaillant ou manipulant des espèces aviaires, mais n'a pu être détecté dans l'appareil anogénital.¹⁵

En outre, tous les isolats d'une souche spécifique ne présentaient pas tous de réaction croisée avec le test ADN *digene* HC2 GC-ID, ce qui diminue la probabilité d'apparition d'un faux positif avec un échantillon clinique si cette souche est présente. Par exemple, cinq des 6 isolats de *Neisseria lactamica* ou de *Neisseria mucosa* analysés étaient négatifs avec le test ADN *digene* HC2 GC-ID, ainsi que l'était une des deux souches de *Chlamydia psittaci* testées. Ainsi, la réactivité croisée observée du test ADN *digene* HC2 GC-ID avec les trois souches commensales de *Neisseria* et *Chlamydia psittaci* ne devrait pas entraîner une fausse interprétation clinique d'un résultat positif lors de tests effectués sur des échantillons anogénitaux.

Une liste d'ADN viral, d'ADN plasmidique et de matériaux cellulaires humains ou de produits sanguins testés, ainsi que les concentrations utilisées se trouve ci-dessous :

| | |
|--|---|
| Cytomégalovirus ^a | Papillomavirus humain de type 6 ^f |
| Virus d'Epstein Barr ^b | Papillomavirus humain de type 11 ^f |
| Sérum positif à l'antigène de surface de l'hépatite B ^c | Papillomavirus humain de type 16 ^f |
| Herpès Simplex I ^d | Papillomavirus humain de type 18 ^f |
| Herpès Simplex II ^d | pBR322 ⁱ |
| Virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ^{b,g} | SV40 ^j |
| ADN génomique humain ^e | PGEM [®] 3Z ⁱ |
| ADN placentaire humain ^e | PGEM [®] 3Zf(-) |
| Sang total humain ^h | Cellules épithéliales humaines ^k |

Concentrations testées :

^a 1 x 10⁵, 1 x 10⁷, 1 x 10⁹ particules virales/ml

^b 1 x 10⁵, 1 x 10⁷, 1 x 10⁸ particules virales/ml

^c 2,9 x 10⁸, 1,1 x 10⁹ particules virales/ml

^d 6,1 x 10⁶, 2,4 x 10⁷ particules virales/ml

^e 2,7 x 10², 1,1 x 10³ copies/ml

^f 1,1 x 10⁸, 4,6 x 10⁸ particules virales/ml

^g 2 x 10⁶, 2 x 10⁷, 2 x 10⁸ particules virales/ml

^h 5 %, 10 %, 50 %

ⁱ 2,1 x 10⁸, 8,3 x 10⁸ copies/ml

^j 1 ng/ml, 4 ng/ml

^k 1 x 10⁵, 1 x 10⁶, 1 x 10⁷ cellules/ml

Aucun des virus testés n'a présenté de réaction croisée avec le test ADN *digene* HC2 GC-ID. Cependant, une réactivité croisée a été observée avec les plasmides pBR322, pGEM[®] 3Z et pGEM[®]3Zf(-). Toutes les autres préparations d'ADN testées, y compris l'ADN humain, étaient négatives. Le sang humain et les cellules épithéliales n'ont pas présenté de réaction croisée avec le test ADN *digene* HC2 GC-ID. Une

réaction croisée entre pBR322 et le test ADN *digene* HC2 GC-ID n'est pas inattendue en raison de la manière dont la sonde GC a été fabriquée. La présence de séquences homologues au pBR322 a été reportée dans des échantillons génitaux humains, et de faux positifs peuvent se produire en présence de taux élevés de plasmide bactérien. Cependant, sur les 103 échantillons d'une étude multicentrique menée aux États-Unis trouvés positifs pour *Neisseria gonorrhoeae* avec le test ADN *digene* HC2 GC-ID, aucun n'a été identifié comme faussement positif en raison d'une réaction croisée avec les séquences de pBR322. Par conséquent, la possibilité de faux positifs avec le test ADN *digene* HC2 GC-ID effectué sur des échantillons cliniques dus à la réactivité croisée avec les séquences homologues au pBR322 dans ces échantillons, s'avère faible. Bien que le test ADN *digene* HC2 GC-ID puisse potentiellement présenter une réaction croisée avec *Chlamydia psittaci*, pBR322, pGEM et plusieurs espèces commensales, la probabilité que ces organismes affectent l'interprétation du test est faible, comme le démontrent les résultats de l'étude clinique multicentrique.

HOMOLOGIE DES SONDAS AVEC L'ADN PLASMIDIQUE TOTAL ET L'ADN GÉNOMIQUE TOTAL

Les sondes génomiques sont homologues à approximativement 0,5 % du génome de *Neisseria gonorrhoeae*. Le détail de chaque sonde du test ADN *digene* HC2 GC-ID est le suivant:

| Sonde | Type | Taille approximative de l'insert (pdb) | % du génome |
|-------|--------------------|--|-------------|
| pGC1 | Génomique | 6400 | 0,34% |
| pGC2 | | 3300 | 0,17% |
| | | 9700 (Total) | 0,51% |
| pGC3 | Plasmide cryptique | 4200 | N/A* |

* Ceci représente toute la séquence de la sonde.

IMPACT DU SANG ET D'AUTRES SUBSTANCES SUR LES ÉCHANTILLONS DANS LE STM

L'effet du sang et d'autres substances potentiellement définies comme interférentes a été évalué dans le test ADN *digene* HC2 GC-ID. Du sang total, une douche vaginale commercialisée, de la crème contre les mycoses et du gel contraceptif (agents fréquemment présents dans les échantillons cervicaux) ont été ajoutés à des échantillons positifs (pools d'échantillons cliniques) à des concentrations que l'on rencontre dans les échantillons cervicaux (voir le tableau 21). Aucun faux positif n'a été observé avec les quatre agents quelle que soit la concentration. Une étude des substances indéfinies présentes dans une population de 100 échantillons cliniques négatifs montre que ces substances n'entravent pas la production d'un signal positif avec le test ADN *digene* HC2 GC-ID comparé au signal engendré lors d'un test pour la recherche d'organismes GC dans le STM.

Tableau 21. Effet des substances interférentes sur les résultats du test.

| | | Résultat du test ADN <i>digene</i> HC2 GC-ID | | | | Milieu de transport des échantillons (STM) | |
|--------------------------|-------|--|----------|----------|----------|--|---------|
| Substance d'interférence | Conc. | Pools d'échantillons cliniques | | | | Positif* | |
| | | Négatif | Positif* | Positif* | Positif* | RLU/CO | Observé |
| | | RLU/CO | Observé | RLU/CO | Observé | RLU/CO | Observé |
| Aucune (Contrôle) | | 0,15 | NA | 3,41 | NA | 2,70 | NA |
| Sang | 1 % | 0,21 | +37 % | 3,17 | -7 % | 3,21 | +19 % |
| | 5 % | 0,19 | +22 % | 3,11 | -9 % | 3,05 | +13 % |
| Douche | 1 % | 0,21 | +37 % | 3,48 | +2 % | 2,80 | +4 % |
| | 5 % | 0,18 | +20 % | 3,47 | +2 % | 3,20 | +18 % |
| Crème contre les mycoses | 1 % | 0,19 | +20 % | 3,60 | +5 % | 2,95 | +9 % |
| | 5 % | 0,20 | +30 % | 3,52 | +3 % | 3,09 | +14 % |
| Gel contraceptif | 1 % | 0,08 | -54 % | 3,18 | -7 % | 2,98 | +10 % |
| | 5 % | 0,08 | -54 % | 3,24 | +5 % | 3,10 | +15 % |

* Inoculé avec 10³ CFU/ml d'organisme de *Neisseria gonorrhoeae* d'auxotype 1.

IMPACT DU SANG ET D'AUTRES SUBSTANCES SUR LES ÉCHANTILLONS EN SOLUTION PRESERVCYT

Aucune évaluation de substances interférentes spécifiques, comme cela est décrit dans la section précédente pour les échantillons dans le STM, n'a été réalisée pour les échantillons en solution PreservCyt. Cependant, on ne s'attend pas à ce que les échantillons en solution PreservCyt montrent des profils d'interférence différents de ceux des échantillons dans le STM puisque le site anatomique pour le prélèvement des échantillons endocervicaux est identique pour les échantillons en solution PreservCyt et les échantillons dans le STM. De plus, les échantillons en solution PreservCyt sont soumis à un traitement de conversion (dont les détails sont fournis dans la notice d'instructions du kit de conversion des échantillons *digene* HC2) qui les rend comparables aux échantillons dans le STM.

Il est possible que du tampon de conversion des échantillons (TCE)¹ résiduel soit présent, sous forme de trace, dans les échantillons en solution PreservCyt totalement convertis. C'est pourquoi une étude analytique a été effectuée pour vérifier la performance analytique du test ADN *digene* HC2 GC-ID en présence de diverses quantités de TCE. Diverses concentrations d'ADN plasmidique de GC ont été préparées dans le STM. Des volumes en excès de TCE ont ensuite été ajoutés aux échantillons et trois aliquots de chaque échantillon ont été testés pour en déduire le rapport RLU/CO moyen pour chaque échantillon en présence soit de solution PreservCyt soit de TCE. La comparaison de ces valeurs RLU/CO moyennes pour chaque échantillon comparées aux valeurs RLU/CO moyennes pour chaque échantillon de contrôle dans le STM n'a fait apparaître aucun faux positif ou faux négatif.

PRÉCISION À LA VALEUR SEUIL DU TEST *digene* HC2 GC-ID AVEC LES ÉCHANTILLONS CLINIQUES RECUEILLIS DANS LE STM

La reproductibilité du test ADN *digene* HC2 GC-ID avec des échantillons cliniques recueillis dans le STM a été déterminée dans une étude utilisant 30 pools d'échantillons cliniques (15 positifs et 15 négatifs) préparés en regroupant des échantillons cervicaux prélevés à la cytobrosse préalablement dénaturés et testés et conservés dans le STM. Les échantillons ont été testés en réplicats de quatre pendant cinq jours pour un total de 20 réplicats par échantillon. Le test a été effectué en utilisant le test ADN *digene* HC2 GC-ID. La valeur RLU/CO moyenne, les intervalles de confiance à 95 % autour de la moyenne (IC) et le pourcentage de résultats positifs ont été calculés pour chaque échantillon pour la période de cinq jours et sont indiqués au tableau 22.

¹ Le tampon de conversion des échantillons est une solution tamponnée avec de l'éosine Y et de l'azide de sodium à 0,05 % (p/v), nécessaire pour la conversion d'un échantillon en PreservCyt. Voir la notice du kit de conversion des échantillons *digene* HC2 de QIAGEN pour des détails spécifiques.

Tableau 22. RLU/CO moyen avec intervalles de confiance et pourcentage de tests ADN *digene* HC2 GC-ID positifs (par ordre décroissant de RLU/CO moyen).

| No. | RLU/CO | IC à 95% | % Positif |
|-----|--------|-----------|-------------|
| 1 | 1,92 | 1,31-2,00 | 100 (20/20) |
| 2 | 1,22 | 1,16-1,29 | 100 (20/20) |
| 3 | 1,21 | 1,16-1,25 | 100 (20/20) |
| 4 | 1,21 | 1,16-1,25 | 90 (18/20) |
| 5 | 1,17 | 1,03-1,28 | 100 (20/20) |
| 6 | 1,14 | 1,09-1,18 | 90 (18/20) |
| 7 | 1,08 | 1,04-1,12 | 80 (16/20) |
| 8 | 1,05 | 1,00-1,09 | 70 (14/20) |
| 9 | 1,05 | 1,01-1,09 | 70 (14/20) |
| 10 | 1,02 | 0,98-1,06 | 65 (13/20) |
| 11 | 1,00 | 0,96-1,03 | 65 (13/20) |
| 12 | 1,00 | 0,97-1,03 | 45 (9/20) |
| 13 | 1,00 | 0,96-1,03 | 40 (8/20) |
| 14 | 0,98 | 0,95-1,02 | 45 (9/20) |
| 15 | 0,91 | 0,89-0,94 | 10 (2/20) |
| 16 | 0,90 | 0,87-0,92 | 0 (0/20) |
| 17 | 0,87 | 0,84-0,91 | 5 (1/20) |
| 18 | 0,86 | 0,83-0,89 | 0 (0/20) |
| 19 | 0,84 | 0,82-0,85 | 0 (0/20) |
| 20 | 0,82 | 0,79-0,85 | 0 (0/20) |
| 21 | 0,79 | 0,75-0,82 | 0 (0/20) |
| 22 | 0,77 | 0,78-0,80 | 0 (0/20) |
| 23 | 0,76 | 0,74-0,79 | 0 (0/20) |
| 24 | 0,75 | 0,78-0,79 | 0 (0/20) |
| 25 | 0,73 | 0,70-0,75 | 0 (0/20) |
| 26 | 0,56 | 0,54-0,59 | 0 (0/20) |
| 27 | 0,56 | 0,54-0,59 | 0 (0/20) |
| 28 | 0,56 | 0,53-0,59 | 0 (0/20) |
| 29 | 0,54 | 0,52-0,56 | 0 (0/20) |
| 30 | 0,12 | 0,11-0,13 | 0 (0/20) |

Les échantillons avec un RLU/CO moyen supérieur ou égal à 20 % au-dessus de la valeur seuil étaient positifs ou présumés positifs dans 97 % des cas, tandis que les échantillons avec un RLU/CO moyen de 20 % ou plus en dessous de la valeur seuil étaient négatifs dans 100 % des cas. Ces résultats indiquent que l'on peut s'attendre à des résultats cohérents avec le test ADN *digene* HC2 GC-ID pour les échantillons qui s'éloignent de 20 % ou plus de la valeur seuil.

Les échantillons ayant des valeurs proches de la valeur seuil du test sont demeurés largement positifs ou négatifs ; ceux qui étaient au-dessus de la valeur seuil dans une limite de 20 % demeuraient positifs ou présumés positifs dans 69,4 % des cas. Les échantillons en dessous de la valeur seuil mais dans la limite des 20 % en dessous de celle-ci demeuraient négatifs dans 91,4 % des cas.

Ces résultats démontrent que le test ADN *digene* HC2 GC-ID produit des résultats reproductibles avec les échantillons cliniques recueillis dans le STM dont les valeurs RLU/CO sont comprises dans une fourchette de 20 % au-dessus ou en dessous de la valeur seuil.

INFORMATION SUR LA PHASE PRÉCÉDENTE

Traditionnellement, le luminomètre Dynex Model MLX était utilisé en complément du luminomètre DML 2000 afin de produire des données et de déterminer la performance du test ADN *digene* HC2 GC-ID. Le luminomètre MLX n'est désormais plus disponible, et seul le luminomètre DML 2000 est encore utilisé pour obtenir des résultats. Les données qui suivent ont été créées à partir de l'étude clinique multicentrique afin de déterminer la reproductibilité du Calibrateur positif et du Calibrateur négatif. Elles sont fournies ci-dessous à titre d'information.

Pour déterminer la reproductibilité du Calibrateur positif et du Calibrateur négatif et estimer à quelle fréquence il peut être nécessaire de procéder manuellement de nouveau aux calculs, les résultats des évaluations cliniques impliquant 79 tests effectués avec le test ADN *digene* HC2 GC-ID ont été regroupés (voir le tableau 23). Les résultats démontrent que le CV% moyen pour ces 79 tests était de 5,79 % et qu'aucun test n'avait de valeurs de moyenne du Calibrateur négatif dépassant 150 RLU. En prenant en considération les 3 réplicats du Calibrateur positif par test, on a observé une reproductibilité du Calibrateur avec un CV% dépassant 20 % dans seulement 1 test sur 79 (1,3 %) et on a recalculé le CV%. À la suite de ce nouveau calcul, le CV% des tests est resté inférieur à 15 %, ce qui indiquait que tous les tests étaient valides.

Tableau 23. Performance du Calibrateur positif et du Calibrateur négatif. Données regroupées à partir de l'étude clinique multicentrique et de l'étude de la précision. (n = 79 tests)

| Appareil | Nbre de tests | Moyenne des rapports S/N | Type de Calibrateur | Moyenne des moyennes calculées (RLU) | | Moyenne des CV% calculés | |
|----------|---------------|--------------------------|---------------------|--------------------------------------|---|--------------------------|---|
| | | | | Trois réplicats | Ajusté en raison d'aberrances possibles | Trois réplicats | Ajusté en raison d'aberrances possibles |
| DML2000 | 9 | 7,71 | Négatif | 40,300 | 34,470 | 18,960 | 12,240 |
| | | | Positif | 292,370 | 292,370 | 6,670 | 6,670 |
| MLX* | 70 | 4,52 | Négatif | 0,076 | 0,070 | 13,830 | 12,360 |
| | | | Positif | 0,292 | 0,292 | 5,674 | 5,674 |

*Plus disponible.

ÉQUIVALENCE ENTRE ÉCHANTILLONS DANS LE STM ET ÉCHANTILLONS EN SOLUTION PRESERVCYT

L'équivalence entre les échantillons dans le STM et ceux en solution PreservCyt a été examinée lors d'une évaluation clinique de 1252 échantillons cervicaux appariés. Un échantillon en solution PreservCyt a été traité conformément à la notice du kit de conversion des échantillons *digene* HC2 et testé avec un échantillon dans le STM apparié à l'aide du test ADN *digene* HC2 GC-ID. Les résultats de cette évaluation sont indiqués au tableau 24. La performance clinique a été établie à l'aide d'échantillons en solution PreservCyt ayant un volume résiduel supérieur à 6,5 ml. L'analyse d'échantillons ayant des volumes résiduels allant de 4,0 à 6,5 ml doit être validée par le laboratoire.

Tableau 24. Résumé des données statistiques pour la concordance du test ADN *digene* HC2 GC-ID entre les échantillons cervicaux appariés prélevés dans le STM et ceux en solution PreservCyt

| Cohorte | Kappa IC à 95 % | Concordance positive (n/N) IC à 95 % | Concordance négative (n/N) IC à 95 % | Concordance globale (n/N) IC à 95 % |
|--|--------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Exclusion des données de la zone équivoque | 0,96 0,92, 0,99 | 98,00 (49/50) 89,35, 99,95 | 99,75 (1181/1184) 99,26, 99,95 | 99,68 (1230/1234) 99,17, 99,91 |
| Algorithme de repassage du test pour la zone équivoque * | 0,93 0,88, 0,98 | 91,80 (56/61) 81,90, 97,28 | 99,75 (1188/1191) 99,27, 99,95 | 99,36 (1244/1252) 98,74, 99,72 |

* Les échantillons dans la plage RLU/CO comprise entre 1,0 et 2,5 ont été testés de nouveau en double. La classification des échantillons a ensuite été déterminée en utilisant une règle de deux sur trois.

La reproductibilité du test ADN *digene* HC2 GC-ID a été évaluée dans le cadre d'une évaluation clinique visant à démontrer que l'on obtient des résultats de test ADN *digene* HC2 GC-ID équivalents lorsque l'on effectue un test sur un panel de 20 échantillons en solution PreservCyt pendant 3 jours dans trois laboratoires. Les résultats de cette étude de reproductibilité sont présentés au tableau 25 ci-dessous.

Tableau 25. Pourcentage de concordance du test ADN *digene* HC2 GC-ID – Par site.

| Site | Observé/Attendu | % de concordance (IC à 95 %) |
|---------------------------------|------------------------|---|
| 1 | 60/60 | 100 (94,04, 100) |
| 2 | 60/60 | 100 (94,04, 100) |
| 3 | 59/60 | 98,33 (91,06, 99,96) |
| Tous les sites regroupés | 179/180 | 99,44 (96,94, 99,99) |

*20 éléments x 3 jours x 3 sites.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Roongpisuthipong A, Lewis JS, Kraus SJ, Morse SA. Gonococcal urethritis diagnosed from enzyme immunoassay of urine sediment. *Sex Transm Dis* 1988;15(4):192-5.
2. Schachter J, McCormack WM, Smith RF, Parks RM, Bailey R, Ohlin AC. Enzyme immunoassay for diagnosis of gonorrhoea. *J Clin Microbiol* 1984;19(1):57-9.
3. Knapp JS, Rice RJ. *Neisseria* and *Branhamella*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 6 ed. Washington,DC: ASM Press; 1995. p 324-40.
4. Kingsbury DT. Estimate of the genome size of various microorganisms. *J Bacteriol* 1969 Jun;98(3):1400-1.
5. U.S.Department of Labor OSHA. Occupational exposure to bloodborne pathogens; final rule. *Federal Register* 1991;56(235):64175-82.
6. Centers for Disease Control, National Institutes of Health. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 3rd ed. Washington: U.S. Government Printing Office; 1993.
7. World Health Organization. *Laboratory biosafety manual*. Geneva: World Health Organization; 1993.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Protection of laboratory workers from instrument biohazards and infectious disease transmitted by blood, body fluids, and tissue; approved guideline*. Wayne,PA: NCCLS; 1997.
9. Centers for Disease Control. Recommendations for prevention of HIV transmission in health-care settings. *MMWR* 1987 Aug;36(suppl. 2S):3S-17S.
10. Schulster LM, Hollinger FB, Dreesman GR, Melnick JL. Immunological and biophysical alteration of hepatitis B virus antigens by sodium hypochlorite disinfection. *Appl Environ Microbiol* 1981 Nov;42(5):762-7.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Clinical laboratory waste management: approved guideline*. Villanova,PA: NCCLS; 1993. 1;-29-42 p.
12. U.S.Environmental Protection Agency. *EPA guide for infectious waste management*. Washington,DC: U.S. Environmental Protection Agency; 1986. 1-5-5, R1-R3, A1-A24 p.
13. [Anonyme]. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994.
14. [Anonyme]. *Textbook of diagnostic microbiology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1995.
15. Schachter J. Chlamydiae. in: Balows A, Hausler WJ, Jr., Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Washington,d.c.: american society for microbiology; 1991. p 1045-53.

GUIDE DES ERREURS

TEST ADN *digene* HC2 GC-ID

| OBSERVATION | CAUSES PROBABLES | SOLUTIONS |
|---|--|--|
| Aucun changement ou changement de coloration incorrect observé au cours de la dénaturation. | Le réactif de dénaturation n'a pas été ajouté ou Préparation incorrecte du réactif de dénaturation. | <ol style="list-style-type: none"> Vérifier que le réactif de dénaturation contient l'indicateur coloré et qu'il est de couleur violet foncé. Vérifier que le réactif de dénaturation a bien été ajouté à l'échantillon en mesurant le volume de l'échantillon (1,5 ml). Si le volume indique que le réactif de dénaturation n'a pas été ajouté, ajouter le volume approprié, mélanger et procéder au test si le changement de coloration observé est correct. |
| | Le sang contenu dans les échantillons peut masquer le changement de coloration. | Le changement de coloration exact décrit n'est pas attendu avec ces types d'échantillons ; les résultats du test n'en seront pas affectés. |
| | Le pH des échantillons est peut-être anormalement acide. | Les échantillons peuvent être anormalement acides ; par conséquent le changement de coloration attendu ne se produira pas. Prélever un nouvel échantillon <u>avant</u> l'application d'acide acétique sur le col utérin car un pH incorrect de l'échantillon affectera défavorablement les résultats du test. |
| Les Contrôles de qualité donnent des résultats incorrects. | Protocole de logiciel choisi pour le test incorrect | Si le protocole de logiciel est incorrect pour le test effectué, la microplaque devrait être relue dans un délai de 30 minutes après l'ajout du réactif 2 de détection et avec le protocole approprié. |
| | Placement inversé de QC CT et de C GC. | Tester de nouveau les échantillons. |
| Changement de coloration incorrect observé au cours de l'hybridation. | <ul style="list-style-type: none"> Mélange inadéquat du mélange de sondes avec les Calibrateurs, Contrôles de qualité et/ou échantillons dénaturés. Mélange de sondes pas ajouté. Volume de réactif ajouté incorrect. | Agiter la microplaque d'hybridation pendant 2 minutes supplémentaires. Si certains puits restent violet ou gris, ajouter 25 µl de mélange de sondes et bien mélanger. Si après avoir ajouté la sonde et avoir mélangé, le changement de coloration correct ne se produit pas et que l'échantillon ne contient pas de sang ou d'autres substances, tester de nouveau l'échantillon. |
| | Le sang contenu dans les échantillons peut masquer le changement de coloration. | Le changement de coloration exact décrit n'est pas attendu avec ces types d'échantillons ; les résultats du test ne devraient pas en être affectés. |
| | L'échantillon contient < 1000 µl de STM <i>digene</i> . | Vérifier le volume de l'échantillon d'origine. Le volume doit être de 1425 µl ± 20 µl (après avoir retiré 75 µl). Si le volume est < 1405 µl, l'échantillon d'origine contenait < 1000 µl de STM. Se procurer un nouvel échantillon. |
| Le test ne remplit pas les critères de vérification de la calibration. Aucun signal observé pour le Calibrateur positif, les Contrôles de qualité ou les échantillons. | La sonde n'a pas été ajoutée au diluant de sonde. | Préparer le mélange de sondes GC de la manière décrite au chapitre <i>Préparation et conservation des réactifs</i> de la présente notice d'instructions. Mélanger soigneusement. Étiqueter le tube correctement. Répéter le test en utilisant du mélange de sondes fraîchement préparé. |
| | La sonde a été contaminée par de la RNase au cours de la préparation. | Utiliser des embouts pour pipette avec filtre aérosol lors du pipetage de la sonde, et porter des gants sans talc. Diluer la sonde dans un récipient stérile. Utiliser uniquement de nouveaux réservoirs propres et jetables. |
| | Mélange inadéquat du mélange de sondes et du diluant de sonde. | Après avoir ajouté de la sonde au diluant de sonde, mélanger vigoureusement au vortex à vitesse maximale pendant au moins 5 secondes. Un tourbillon visible doit se produire. |

TEST ADN *digene* HC2 GC-ID

| OBSERVATION | CAUSES PROBABLES | SOLUTIONS |
|--|---|---|
| | Mélange inadéquat de la sonde diluée et de l'échantillon dénaturé. | Après avoir ajouté le mélange de sondes à l'échantillon dénaturé, couvrir la microplaque d'hybridation et mélanger sur l'Agitateur Rotatif I réglé à 1100 ±100 tours/min. pendant 3 ± 2 minutes, comme décrit à la section Hybridation, partie sur la procédure de test, étape 6 de la présente notice d'instructions. Vérifier que la coloration change du violet au jaune dans chaque puits. |
| | Durée ou température incorrecte au cours de l'étape d'hybridation. | Hybrider pendant 60 ± 5 minutes à 65 ± 2 °C de la manière décrite dans la présente notice à la section Hybridation, partie sur la procédure de test, étape 7. Vérifier la température de l'Incubateur pour Microplaques I. S'assurer que l'Incubateur pour Microplaques I est à la bonne température pour chauffer les échantillons et qu'il a été préchauffé pendant 1 heure avant emploi. |
| | Mélange inadéquat au cours de l'étape de capture. | Mélanger sur l'Agitateur Rotatif I réglé à 1100 ± 100 tours/min. pendant 60 ± 5 minutes à 20-25 °C, de la manière décrite dans la présente notice d'instructions à la section Captures des hybrides, partie sur la procédure de test, étape 4. Vérifier la vitesse de l'Agitateur Rotatif I par calibration selon les indications fournies dans le Manuel d'utilisation de l'Agitateur Rotatif I au chapitre Calibration de la vitesse de l'Agitateur. |
| | <ul style="list-style-type: none"> Erreur du volume de réactif de détection 1 ajouté. Temps d'incubation différent du temps spécifié. | <p>Distribuer 75 µl de réactif de détection 1 dans chaque puits en utilisant une pipette à 8 canaux.</p> <p>Incuber à 20-25 °C pendant 30 à 45 minutes.</p> |
| | <ul style="list-style-type: none"> Erreur du volume de réactif de détection 2 ajouté. Temps d'incubation différent du temps spécifié. | Distribuer 75 µl de réactif de détection 2 dans chaque puits en utilisant une pipette à 8 canaux. Incuber à 20-25 °C pendant 15 à 30 minutes. |
| | Mauvais fonctionnement du luminomètre ou programmation incorrecte. | Pour plus d'informations, se référer au chapitre Entretien & Guide des erreurs du manuel d'utilisation du logiciel d'analyse du test <i>digene</i> correspondant ou contacter les Services techniques de QIAGEN . |
| Valeurs RLU élevées des Calibrateurs, des Contrôles de qualité et/ou des échantillons (≥ 150 RLU dans de nombreux puits ou dans tous les puits). Le test ne remplit pas les critères de validation. | <ul style="list-style-type: none"> Le réactif de dénaturation n'a pas été ajouté; ou un volume incorrect de réactif a été ajouté ; ou le mélange du réactif de dénaturation avec les Calibrateurs, les Contrôles de qualité et/ou les échantillons a été inadéquat. Température et niveau d'eau du bain-marie inadéquats. | <ul style="list-style-type: none"> Vérifier que la pipette à répétition distribuée avec précision avant d'ajouter le réactif de dénaturation. Les pipettes doivent être calibrées. Ajouter un demi-volume de réactif de dénaturation dans chaque tube et bien mélanger. Afin d'éviter les faux positifs, s'assurer que le liquide lave toute la surface interne du tube (retourner le tube une fois si le mélange est effectué manuellement). Les Calibrateurs, les Contrôles de qualité et les échantillons doivent virer au violet après l'ajout de réactif de dénaturation. Vérifier la calibration de la vitesse du MST Vortexer 2. Vérifier la température et le niveau d'eau du bain-marie. |
| | <ul style="list-style-type: none"> Fuite de lumière dans le luminomètre. Étanchéité de la porte défectueuse. Porte pas hermétiquement fermée. | Effectuer une lecture du bruit de fond (mesure des données brutes) du luminomètre en lisant les puits de microplaque vides. Une valeur supérieure à 50 RLU indique qu'une fuite de lumière peut exister. Pour plus d'informations, se référer au chapitre Entretien & Guide des erreurs du manuel d'utilisation du logiciel d'analyse du test <i>digene</i> correspondant ou contacter les Services techniques de QIAGEN . |
| | Contamination du réactif de détection 2 ou des puits de la microplaque de capture par le réactif de détection 1 ou par la phosphatase alcaline exogène. | Se reporter à la section « Vérification des contaminations » de ce chapitre « Guide des erreurs ». |

TEST ADN *digene* HC2 GC-ID

| OBSERVATION | CAUSES PROBABLES | SOLUTIONS |
|--|---|---|
| | Tampon de lavage contaminé. | Se reporter à la section « Vérification des contaminations » de ce chapitre « Guide des erreurs ». |
| | Laveur Automatique de microplaques contaminé. | Se reporter à la section « Vérification des contaminations » de ce chapitre « Guide des erreurs ». |
| | Lavage inadéquat des puits de la microplaque de capture après incubation du réactif de détection 1. | Laver soigneusement les puits de la microplaque 6 fois avec du tampon de lavage, en les remplissant à chaque fois jusqu'à ce qu'ils débordent ou en utilisant le Laveur Automatique de Microplaques. Il ne doit pas y avoir de liquide résiduel rose visible dans les puits après le lavage. Pour des instructions sur les tests de contamination et de mauvais fonctionnement, voir le chapitre <i>Guide des erreurs</i> du <i>Manuel d'utilisation du Laveur Automatique de Microplaques</i> . |
| | Contamination des puits de la microplaque par le réactif de détection 1. | S'assurer que toutes les surfaces de travail sont propres et sèches. Prendre des précautions lorsque le réactif de détection 1 est utilisé. Éviter les aérosols. |
| | Solution d'hybridation séchée sur la même surface de papier absorbant Kimtowels Wipers ou sur papier faiblement pelucheux équivalent. | Ne pas sécher sur la même surface de papier absorbant Kimtowels Wipers ou d'un équivalent faiblement pelucheux déjà utilisée. |
| | Utilisation d'un papier absorbant inapproprié. | Pour sécher, utiliser un papier absorbant Kimtowels Wipers ou un équivalent faiblement pelucheux. |
| | Échantillons du Contrôle de qualité GC utilisé comme Calibrateur positif. Échec de la validation du test. | S'assurer que les Calibrateurs et les Contrôles de qualité sont placés correctement. |
| Rapports PC/NC faibles ou nombre important d'échantillons faiblement positifs (> 20% du total des échantillons) avec un rapport RLU/CO < 2,0. Le test peut ne pas remplir les critères de validation. | Préparation inadéquate des échantillons. | Ajouter le volume approprié de réactif de dénaturation et mélanger soigneusement au vortex. Afin d'éviter des faux positifs, s'assurer que le liquide lave la totalité de la surface interne du tube en utilisant la méthode MST Vortexer 2 pendant au moins 5 secondes (pour la méthode manuelle, vortexer pendant au moins 5 secondes et retourner le tube une fois). Un changement sensible de coloration de violet clair à violet foncé devrait être visible. Incuber pendant 45 ± 5 minutes à 65 ± 2 °C. Lors de l'utilisation d'échantillons en solution PreservCyt, il est probable que ces hybrides soient présents sur les parois internes du tube de conversion de l'échantillon. Afin d'empêcher une potentielle contamination d'un échantillon à l'autre par ce matériel cellulaire non dénaturé, l'embout de la pipette ne doit pas toucher les parois du tube de conversion de l'échantillon au cours du transfert de l'échantillon dénaturé dans le puits de la microplaque utilisé pour l'hybridation de la sonde GC. Se reporter à la notice d'instructions du kit de conversion des échantillons <i>digene</i> HC2 pour des détails sur la procédure. |
| | Sonde mélangée de manière inadéquate ou quantité insuffisante de sonde ajoutée. | Préparer le mélange de sondes de la manière décrite. Mélanger soigneusement en vortexant en s'assurant qu'un tourbillon visible se produise. Le mélange de sondes doit être ajouté aux puits à l'aide d'une pipette multicanaux afin d'assurer une distribution précise. |
| | Volume inadéquat de mélange de sondes ajoutée dans chaque puits de la microplaque d'hybridation. | Vérifier que la pipette à 8 canaux distribue de façon précise avant d'ajouter le mélange de sondes à la microplaque d'hybridation. Ajouter 25 µl de mélange de sondes à l'échantillon dénaturé au fond de chaque micropuits. Vérifier que la distribution à l'aide de la pipette à 8 canaux est précise avant d'ajouter le mélange de sondes aux puits d'hybridation. La coloration violet foncé devrait virer au jaune après avoir ajouté et bien mélangé le mélange de sondes. |
| | Perte de l'activité du réactif de détection 1. | Conserver le réactif de détection 1 entre 2 et 8 °C. Utiliser avant la date de péremption figurant sur l'étiquette du conditionnement extérieur du kit. |

| TEST ADN <i>digene</i> HC2 GC-ID | | |
|--|---|--|
| OBSERVATION | CAUSES PROBABLES | SOLUTIONS |
| | Capture insuffisante des hybrides ARN:ADN. | L'étape de capture doit être effectuée en utilisant l'agitateur rotatif I à une vitesse de 1100 ± 100 tours/min. Vérifier la vitesse de l'Agitateur en se reportant au chapitre sur la calibration de la vitesse de l'Agitateur du Manuel d'utilisation de l'Agitateur Rotatif I. |
| | Lavage inadéquat. | Laver soigneusement 6 fois les puits de la microplaque avec du tampon de lavage, en les remplissant à chaque fois jusqu'à ce qu'ils débordent ou en utilisant le Laveur Automatique de Microplaques. |
| | Tampon de lavage contaminé. | Se reporter à la section « Vérification des contaminations » de ce chapitre « Guide des erreurs ». |
| Séries d'échantillons positifs avec des valeurs RLU approximativement identiques. | Contamination des puits de la microplaque de capture lors de la manipulation du test. | Couvrir les puits de la microplaque de capture pendant toutes les incubations. Éviter d'exposer les puits de la microplaque à une contamination d'aérosol pendant le test. Porter des gants sans talc pendant les manipulations. |
| | Contamination du réactif de détection 2. | Prendre soin de ne pas contaminer le stock lors de la distribution du réactif de détection 2 dans les puits de la microplaque de capture. Éviter de contaminer le réactif de détection 2 avec des aérosols du réactif de détection 1 ou avec de la poussière provenant du laboratoire, etc. |
| | Mauvais fonctionnement du Laveur Automatique de Microplaques. | Se reporter à la section « Vérification des contaminations » de ce chapitre « Guide des erreurs » ou voir le chapitre <i>Guide des erreurs</i> du <i>Manuel d'utilisation du Laveur Automatique de Microplaques</i> pour des instructions relatives au test de contamination ou à l'identification de mauvais fonctionnements. |
| CV% élevé entre les répliqués. | Pipetage inexact (c.-à-d. bulles d'air, pipette non calibrée). | Vérifier que la pipette distribue des volumes reproductibles. Calibrer les pipettes régulièrement. |
| | Mélange insuffisant. | Mélanger soigneusement à toutes les étapes. Vortexer avant et après l'incubation de l'étape de dénaturation. S'assurer qu'un tourbillon visible se produise. |
| | Transfert incomplet du liquide de la microplaque d'hybridation aux puits de la microplaque de capture. | Effectuer avec précaution le transfert entre la microplaque d'hybridation et la microplaque de capture afin de garantir le transfert de volumes reproductibles. |
| | Conditions de lavage incorrectes. | Laver soigneusement les puits de la microplaque 6 fois avec du tampon de lavage, en les remplissant à chaque fois jusqu'à ce qu'ils débordent ou en utilisant le Laveur Automatique de Microplaques et les protocoles appropriés pour le Laveur Automatique de Microplaques. |
| | Contamination des puits de la microplaque par le réactif de détection 1. | S'assurer que toutes les surfaces de travail sont propres et sèches. Manipuler le réactif de détection 1 avec précaution. Éviter les aérosols. |
| | Contamination de l'embout de la pipette avec du matériel non dénaturé pendant le transfert des échantillons dénaturés vers les puits de la microplaque utilisés pour l'hybridation de la sonde GC | L'étape de dénaturation de la procédure de traitement des échantillons doit être effectuée conformément aux instructions. Le vortexage des échantillons, le retournement du tube et l'agitation inappropriés peuvent avoir pour conséquence une dénaturation incomplète des hybrides ARN:ADN non spécifiques endogènes aux échantillons cervicaux. En particulier lorsqu'on utilise des échantillons en solution PreservCyt, il est probable que ces hybrides soient présents sur les parois intérieures du tube de conversion des échantillons. Afin d'éviter l'éventuel transfert de ce matériau cellulaire non dénaturé, l'embout de la pipette ne doit pas toucher les parois du tube de conversion des échantillons pendant le transfert des échantillons dénaturés dans le microtube ou le puits de microplaque utilisé pour l'hybridation de la sonde GC. |
| | Plusieurs rangées séchées sur la même surface de papier absorbant Kimtowels Wipers. | Ne pas sécher sur la même surface de papier absorbant Kimtowels Wipers. |

TEST ADN *digene* HC2 GC-ID

| OBSERVATION | CAUSES PROBABLES | SOLUTIONS |
|---|---|---|
| Faux positifs obtenus à partir d'échantillons reconnus comme étant négatifs. | Contamination du réactif de détection 2. | Lorsque vous ajoutez le réactif de détection 2 entre les échantillons, faire attention de ne pas créer de contamination croisée. Si seulement une partie du kit est utilisée, aliquoter le volume nécessaire pour ce test dans un réservoir à réactif propre avant de remplir la pipette. |
| | Contamination des puits de la microplaque par le réactif de détection 1. | Laver soigneusement les puits de la microplaque 6 fois avec du tampon de lavage, en les remplissant à chaque fois jusqu'à ce qu'ils débordent ou en utilisant le Laveur Automatique de Microplaques. Il ne devrait pas y avoir de liquide résiduel rose visible dans les puits de la microplaque après lavage. |
| | Contamination de l'embout de la pipette avec du matériau non dénaturé pendant le transfert des échantillons dénaturés vers les puits de la microplaque utilisée pour l'hybridation de la sonde GC | L'étape de dénaturation de la procédure de traitement des échantillons doit être effectuée conformément aux instructions. Le vortexage des échantillons, le retournement du tube et l'agitation inappropriés peuvent avoir pour conséquence une dénaturation incomplète des hybrides ARN:ADN non spécifiques endogènes aux échantillons cervicaux. En particulier lorsqu'on utilise des échantillons en solution PreservCyt, il est probable que ces hybrides soient présents sur les parois intérieures du tube de conversion des échantillons. Afin d'éviter l'éventuel transfert de ce matériau cellulaire non dénaturé, l'embout de la pipette ne doit pas toucher les parois du tube de conversion des échantillons pendant le transfert des échantillons dénaturés dans le microtube ou le puits de la microplaque utilisé pour l'hybridation de la sonde GC. |
| | Préparation inadéquate des échantillons. | Ajouter le volume approprié de réactif de dénaturation et mélanger vigoureusement en vortexant. Afin d'éviter des faux positifs, s'assurer que le liquide lave la totalité de la surface interne du tube en vortexant avec la méthode du MST Vortexer 2 pendant au moins 5 secondes (pour la méthode manuelle, retourner le tube une fois). Un changement sensible de coloration de violet clair à violet foncé devrait être visible. Incuber pendant 45 ± 5 minutes à 65 ± 2 °C. Lors de l'utilisation d'échantillons en solution PreservCyt, il est probable que ces hybrides soient présents sur les parois internes du tube de conversion de l'échantillon. Afin d'empêcher une potentielle contamination d'un échantillon à l'autre par ce matériel cellulaire non dénaturé, l'embout de la pipette ne doit pas toucher les parois du tube de conversion de l'échantillon au cours du transfert de l'échantillon dénaturé dans le puits de la microplaque utilisé pour l'hybridation de la sonde GC. Se reporter à la notice d'instructions du kit de conversion des échantillons <i>digene</i> HC2 pour des détails sur la procédure. |
| | Conditions de lavage inappropriées. | Laver soigneusement les puits de la microplaque 6 fois avec du tampon de lavage, en les remplissant à chaque fois jusqu'à ce qu'ils débordent ou en utilisant le Laveur Automatique de Microplaques et les protocoles spécifiques à l'appareil. |
| Valeurs RLU élevées du Calibrateur négatif (> 150 RLU). Les autres critères du test sont remplis. | Le réactif de détection 2 a été incubé à une température supérieure à 20-25 °C. | Le test est invalide du fait des valeurs élevées du Calibrateur négatif. Refaire le test et s'assurer que les étapes de capture et de détection sont incubées à 20-25 °C. |
| | Le réactif de détection 2 a été incubé pendant plus de 30 minutes. | Lire la microplaque après 15 minutes d'incubation (ne pas dépasser 30 minutes d'incubation) à 20-25 °C. |
| | Le réactif de détection 2 ou le tampon de lavage ont été contaminés par de la phosphatase alcaline ou du réactif de détection 1. | Se reporter à la section « Vérification des contaminations » de ce chapitre « Guide des erreurs ». |

VÉRIFICATION DES CONTAMINATIONS

| Réactif évalué | Procédure de vérification des contaminations | Interprétation des résultats |
|--|--|--|
| <p>Remarque : Prendre des précautions lors du pipetage du réactif de détection 2 afin d'éviter une contamination. Porter des gants et éviter de faire toucher les embouts de pipette sur les surfaces de travail.</p> | | |
| <p>Réactif de détection 2</p> | <ul style="list-style-type: none"> Distribuer 75 µl de réactif de détection 2 provenant d'un aliquot, d'un résidu et/ou du flacon d'origine dans un puits vide d'une microplaque de capture. Incuber à 20-25 °C pendant 15 minutes. Éviter une exposition à la lumière directe du soleil. Lire les puits de la microplaque à l'aide du luminomètre. <p>Remarque : Tester le réactif de détection 2 par réplicats de 3 fournit une évaluation optimale de la performance.</p> | <ul style="list-style-type: none"> Le contrôle du réactif de détection 2 doit être < 50 RLU. Si les valeurs du réactif de détection 2 sont < 50 RLU, le réactif de détection 2 peut être utilisé pour répéter le test. S'il est contaminé (> 50 RLU), obtenir un nouveau kit et répéter le test. |
| <p>Appareil de lavage et/ou eau d'origine</p> | <ul style="list-style-type: none"> Distribuer 75 µl de réactif de détection 2 dans 4 puits distincts d'une microplaque de capture. Numéroter les puits de 1 à 4. Le puits 1 sert de contrôle du réactif de détection 2. Distribuer 10 µl de tampon de lavage du flacon de lavage dans le puits 2. Laisser du tampon de lavage s'écouler dans les tubulures du laveur. Distribuer 10 µl de tampon de lavage des tubulures dans le puits 3. Obtenir un aliquot de l'eau utilisée pour préparer le tampon de lavage. Distribuer 10 µl de cette eau dans le puits 4. Incuber à 20-25 °C pendant 15 minutes. Éviter une exposition à la lumière directe du soleil. Lire les puits de la microplaque à l'aide du luminomètre. | <ul style="list-style-type: none"> Le contrôle du réactif de détection 2 (puits 1) doit être < 50 RLU. Comparer la valeur RLU des puits 2, 3 et 4 à la valeur RLU du contrôle du réactif de détection 2 (puits 1). Les valeurs RLU individuelles des puits 2, 3 et 4 ne doivent pas être supérieures de 50 RLU par rapport à la valeur RLU du contrôle du réactif de détection 2 (puits 1). Les valeurs supérieures de 50 RLU par rapport au contrôle du réactif de détection 2 indique la présence d'une contamination. Voir le chapitre <i>Préparation et conservation des réactifs</i> pour des instructions sur le nettoyage et l'entretien de l'appareil de lavage. |
| <p>Laveur de plaques automatisé</p> | <ul style="list-style-type: none"> Distribuer 75 µl de réactif de détection 2 dans 5 puits distincts d'une microplaque de capture. Numéroter les puits de 1 à 5. Le puits 1 sert de contrôle du réactif de détection 2. Distribuer 10 µl de tampon de lavage du flacon du laveur de plaques étiqueté <i>Lavage</i> dans le puits 2. Distribuer 10 µl de liquide de rinçage du flacon du laveur de plaques étiqueté <i>Rinçage</i> dans le puits 3. Appuyer sur la touche Amorcer sur le clavier du laveur de plaques, permettant au tampon de lavage de s'écouler dans les tuyaux. Distribuer 10 µl de tampon de lavage de la cuve dans le puits 4. Appuyer sur la touche Rincer sur le clavier du laveur de plaques, permettant au liquide de rinçage de s'écouler dans les tuyaux. Distribuer 10 µl de tampon de lavage de la cuve dans le puits 5. Couvrir et incuber pendant 15 minutes à 20-25 °C. Éviter une exposition à la lumière directe du soleil. Lire les puits de la microplaque à l'aide du luminomètre. | <ul style="list-style-type: none"> Le contrôle du réactif de détection 2 (puits 1) doit être < 50 RLU. Comparer la valeur RLU des puits 2, 3, 4 et 5 à la valeur RLU du contrôle du réactif de détection 2 (puits 1). Les valeurs RLU individuelles des puits 2, 3, 4 et 5 ne doivent pas être supérieures de 50 RLU par rapport à la valeur RLU du contrôle du réactif de détection 2 (puits 1). Les valeurs supérieures de 50 RLU par rapport au contrôle du réactif de détection 2 indique la présence d'une contamination dans le laveur de plaques. Voir la <i>procédure de décontamination du manuel d'utilisation du Laveur Automatique de plaques</i>. |

CONTACTER QIAGEN

Se reporter à la page « Contacter QIAGEN » fournie avec ce produit pour contacter votre représentant local QIAGEN .

QIAGEN[®], *digene*[®], Hybrid Capture[®] et Rapid Capture[®] sont des marques déposées de QIAGEN.

La technologie Hybrid Capture est protégée par le brevet européen n°. 0 667 918 déposé en Autriche, Belgique, Suisse, Lichtenstein, Allemagne, Danemark, Espagne, France, Royaume-Uni, Grèce, Irlande, Italie, Luxembourg, Pays Bas et Suède.

Brevet américain pour Hybrid Capture n°. 6 228 578B1

Marques mentionnées :

ThinPrep[®] et PreservCyt[®] : Hologic Corporation
Kimtowels[®] : Kimberly-Clark Corporation
Eppendorf[®] et Repeater[®] : Eppendorf-Netheler-Hinz
CDP-Star[®] : Tropix, Inc.
Parafilm[®] : American Can Co.
DuraSeal[®] : Diversified Biotech, Inc.
Sarstedt[®] : SARSTEDT AG & Co.
pGEM[®] : Promega Corporation
VWR[®] : VWR International, Inc.
Corning[®] : Corning, Inc.

RÉSUMÉ DU TEST ADN *digene* HC2 GC-ID

Important : *Il est important de se familiariser parfaitement avec la procédure détaillée du test avant d'utiliser ce résumé.*

| PROCÉDURE | | |
|---|---|--|
| <p>Dénaturation (Pour les échantillons en solution PreservCyt, voir la Procédure de préparation des échantillons en solution PreservCyt)</p> | <p>Méthode de vortexage manuelle</p> <p>Créer schéma de plaque Étiqueter la plaque d'hybridation. Préparer le réactif de dénaturation</p> <p>↓</p> <p>Distribuer le réactif de dénaturation (volume équivalent à la moitié du volume de l'échantillon) dans les Calibrateurs, les Contrôles de qualité et les échantillons. Vortexer chaque échantillon, calibrateur et contrôle de qualité individuellement pendant 5 secondes à grande vitesse et retourner (voir la présente notice pour des détails).</p> <p>↓</p> <p>Vérifier que tous les tubes présentent une coloration violette.</p> <p>↓</p> <p>Incuber à 65 ± 2 °C pendant 45 ± 5 minutes.</p> <p>↓</p> <p>Préparer mélange de sondes GC.</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p> | <p>Méthode avec le MST Vortexer 2</p> <p>Créer schéma de plaque Étiqueter la microplaque d'hybridation. Préparer le réactif de dénaturation.</p> <p>↓</p> <p>Distribuer le réactif de dénaturation (volume équivalent à la moitié du volume de l'échantillon) dans les Calibrateurs, les Contrôles de qualité et les échantillons.</p> <p>↓</p> <p>Vérifier que tous les tubes présentent une coloration violette.</p> <p>↓</p> <p>Couvrir le portoir avec du film et un couvercle.</p> <p>↓</p> <p>Vortexer pendant 10 secondes à vitesse maximale.</p> <p>↓</p> <p>Incuber à 65 ± 2 °C pendant 45 ± 5 minutes.</p> <p>↓</p> <p>Préparer mélange de sondes GC.</p> <p>↓</p> <p>↓</p> |
| <p>Hybridation</p> | <p>Bien mélanger les échantillons dénaturés, puis distribuer 75 µl d'échantillon dénaturé, de Calibrateur ou de Contrôle de qualité dans les puits de la microplaque.</p> <p>↓</p> <p>Incuber pendant 10 minutes à 20-25 °C.</p> <p>↓</p> <p>Distribuer 25 µl de mélange de sondes GC dans les puits de la microplaque.</p> <p>↓</p> <p>Couvrir la microplaque avec un couvercle de microplaque et mélanger sur l'Agitateur Rotatif I à 1100 ± 100 tours/min. pendant 3 ± 2 minutes. <i>Vérifier que tous les puits présentent une coloration jaune. (Les échantillons en solution PreservCyt deviendront roses)</i></p> <p>↓</p> <p>Incuber à 65 ± 2 °C pendant 60 ± 5 minutes.</p> <p>↓</p> <p>Préparer la microplaque de capture.</p> <p>↓</p> | |
| <p>Capture des hybrides</p> | <p>Transférer le contenu de chaque puits de la microplaque d'hybridation dans le puits correspondant sur la microplaque de capture en utilisant une pipette à 8 canaux.</p> <p>↓</p> <p>Couvrir avec un couvercle pour microplaque ou du film étanche.</p> <p>↓</p> <p>Agiter à 1100 ± 100 tours/min. à 20-25 °C pendant 60 ± 5 minutes. Préparer le tampon de lavage.</p> <p>↓</p> <p>Décanter et sécher la microplaque de capture (voir la présente notice pour des détails).</p> <p>↓</p> | |
| <p>Détection des hybrides</p> | <p>Distribuer 75 µl de réactif de détection 1 dans chaque puits de la microplaque de capture. Couvrir la microplaque de capture avec un couvercle ou du Parafilm ou équivalent. Incuber à 20-25 °C pendant 30 - 45 minutes. Laver la microplaque selon la méthode désirée.</p> <p>↓</p> | |
| <p>Lavage</p> | <p>Méthode de lavage manuelle</p> <p>Décanter et sécher la microplaque de capture (voir la notice pour des détails).</p> <p>↓</p> <p>Laver 6 fois.</p> <p>↓</p> <p>Sécher sur papier absorbant faiblement pelucheux.</p> <p>↓</p> | <p>Méthode avec le laveur automatique de microplaques</p> <p>Placer la microplaque sur le laveur automatique et appuyer sur « START/STOP » pour commencer.</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p> |
| <p>Amplification du signal</p> | <p>Distribuer 75 µl de réactif de détection 2 dans chaque puits de la microplaque de capture. Couvrir avec un couvercle pour microplaque. Incuber à 20-25 °C pendant 15-30 minutes.</p> <p>↓</p> | |
| <p>Lecture</p> | <p>Lire la microplaque de capture au luminomètre approuvé par QIAGEN</p> <p>↓</p> <p>Valider le test et interpréter les résultats des échantillons.</p> | |