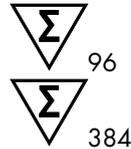


Août 2015

Notice d'instructions du test *digene*[®] HC2 High-Risk HPV DNA



IVD

Test d'hybridation moléculaire in vitro avec amplification du signal par chimiluminescence en format microplaque pour la détection qualitative de l'ADN de 13 types de papillomavirus humains (HPV) à haut risque dans les prélèvements cervicaux et vaginaux

À utiliser avec :

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



REF

5197-1330 (Kit de 1 plaque)
618111 (Kit de 4 plaque)



QIAGEN
19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874
ÉTATS-UNIS

EC REP

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
ALLEMAGNE

1058538FR Rev. 02

Principaux changements par rapport aux instructions antérieures pour la révision de l'utilisation

- Ajout de la procédure de préparation des échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath avec le kit QIAasymphony® DSP HPV Media et des données de performance associées.
- Mise à jour afin d'assurer la conformité avec le Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH).

Contenu

Utilisation prévue.....	8
Résumé et description	9
Informations sur l'agent pathogène.....	10
Principe de la technique	10
Préparation d'échantillons avec le QIAasymphony SP	12
Préparation d'échantillons avec le kit QIAasymphony DSP HPV Media.....	12
Préparation d'échantillons avec le kit QIAasymphony DSP AXpH DNA	13
Tests avec le Rapid Capture System.....	13
Matériel fourni	16
Kit de 1 plaque.....	16
Kit de 4 plaque.....	16
Contenu du kit	17
Matériel nécessaire mais non fourni.....	19
Équipement et matériel de diagnostic in vitro.....	19
Équipement et matériel de laboratoire à usage général	20
Équipement et matériel supplémentaires pour la préparation d'échantillons en solution PreservCyt.....	22
Équipement et matériel supplémentaires pour la préparation d'échantillons en solution SurePath	22
Avertissements et précautions.....	23
Avertissements	23
Échantillons	23
Azide de sodium.....	24
Tampon N2	24
Analyse automatique par RCS	25
Consignes relatives à la sécurité et aux risques pour la santé	25
Précautions d'emploi	27

Stockage et manipulation des réactifs	28
Composants du kit.....	28
Réactifs préparés	28
Prélèvement et préparation des échantillons.....	29
Échantillons cervicaux et vaginaux en milieu STM	29
Biopsies cervicales	30
Échantillons cervicaux en solution PreservCyt.....	30
Échantillons cervicaux dans le liquide conservateur SurePath.....	31
Préparation automatique d'échantillons en solution SurePath.....	32
Préparation automatique d'échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath	33
Préparation manuelle d'échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath.....	33
Procédure.....	34
Préparation des réactifs	34
Réactif de dénaturation.....	36
Réactif de dénaturation 2.....	37
Mélange de sondes.....	38
Tampon de lavage	39
Créer le schéma de répartition des plaques.....	40
Préparation des échantillons	42
Préparation d'échantillons en solution PreservCyt à l'aide du kit QIAAsymphony DSP HPV Media	43
Préparation d'échantillons en solution SurePath et préparation de culots cellulaires post-gradient SurePath à l'aide du kit QIAAsymphony DSP HPV Media	43
Préparation d'échantillons en solution PreservCyt à l'aide du kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA	44
Préparation manuelle d'échantillons en solution PreservCyt	44
Préparation manuelle d'échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath.....	44
Dénaturation et hybridation des échantillons préparés sur le QIAAsymphony SP	47
Dénaturation des étalons, des contrôles de qualité et des éluats d'ADN pour l'analyse manuelle.....	47
Pause éventuelle pour les éluats d'ADN	49
Hybridation des éluats d'ADN.....	49

Dénaturation et hybridation d'échantillons en milieu STM et d'échantillons de culot cellulaire post-gradient PreservCyt et SurePath préparés manuellement	49
Dénaturation des étalons, des contrôles de qualité et des échantillons en milieu STM	50
Pause éventuelle pour les échantillons en milieu STM préparés et pour les échantillons de culot cellulaire post-gradient PreservCyt et SurePath préparés manuellement	52
Hybridation des échantillons en milieu STM préparés et des échantillons de culot cellulaire post-gradient PreservCyt et SurePath préparés manuellement	53
Hybridation utilisant une microplaque et le Microplate Heater I	53
Hybridation en utilisant des microtubes et un bain-marie	55
Capture des hybrides	57
Détection des hybrides.....	59
Lavage.....	60
Méthode utilisant le laveur automatique de plaques	60
Méthode de lavage manuel.....	61
Amplification du signal	63
Mesure de la microplaque de capture et production des résultats.....	64
Interprétation des résultats	65
Résultats d'analyse d'échantillons en milieu STM.....	65
Résultats d'analyse d'échantillons en solution SurePath	65
Résultats d'analyse d'échantillons en solution PreservCyt.....	65
Valeur RLU/CO de l'ordre de 1,0.....	66
Autres types de HPV	66
Vérification de l'étalonnage de l'essai.....	66
Étalon négatif	67
Étalon positif.....	67
Moyenne de l'étalon positif /moyenne de l'étalon négatif.....	67
Calculs de la valeur seuil	67
Contrôles de qualité	68
Limites.....	69
Caractéristiques de performance.....	70

Performances cliniques lors du dépistage de patientes présentant des résultats de frottis cervical normaux comme aide dans l'évaluation du risque pour la prise en charge de la patiente	70
Performance clinique lors du dépistage de patientes présentant des résultats de frottis cervicaux de type ASC-US pour déterminer la nécessité d'une colposcopie	75
Sensibilité et spécificité cliniques pour la détermination du risque de lésions de haut grade chez les femmes présentant des résultats de frottis cervicaux indiquant une LSIL ou HSIL	78
Performances avec l'auto-prélèvement vaginal	82
Sensibilité analytique	83
Équivalence entre les types d'échantillons	84
Équivalence entre les échantillons en milieu STM et en solution PreservCyt	84
Équivalence entre la préparation manuelle d'échantillons en solution PreservCyt et la préparation d'échantillons en solution PreservCyt à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media	84
Équivalence entre la préparation manuelle d'échantillons en solution PreservCyt et la préparation d'échantillons en solution PreservCyt à l'aide du kit QIASymphony DSP AXpH DNA	85
Équivalence entre la préparation manuelle d'échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath et la préparation d'échantillons en solution SurePath à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media	87
Équivalence entre la préparation manuelle d'échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath et la préparation d'échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media	88
Concordance entre les méthodes d'essai	88
Reproductibilité	92
Reproductibilité globale de l'analyse manuelle	92
Reproductibilité avec des échantillons cliniques en milieu STM	92
Reproductibilité des échantillons cliniques en solution PreservCyt	96
Reproductibilité d'échantillons cliniques en solution SurePath	107
Réactivité croisée	113
Hybridation croisée	115
Effet du sang et d'autres substances sur les échantillons en solution STM	116
Effet du sang et d'autres substances sur les échantillons en solution PreservCyt	116

Préparation manuelle des échantillons	116
Préparation d'échantillons avec le kit QIAAsymphony DSP HPV Media.....	116
Préparation d'échantillons avec le kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA	117
Effet du sang et d'autres substances sur les échantillons en solution SurePath.....	118
Préparation d'échantillons SurePath à l'aide du kit QIAAsymphony DSP HPV Media	118
Préparation d'échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath à l'aide du kit QIAAsymphony DSP HPV Media.....	119
Contamination par entraînement.....	120
Stabilité des réactifs embarqués.....	122
Références.....	124
Symboles.....	129
Résolution des principaux problèmes rencontrés.....	130
Vérification de la contamination du réactif DR2	138
Vérification de la contamination de l'appareil de lavage et/ou de la source d'alimentation en eau	138
Vérification de la contamination du laveur Automated Plate Washer	140
Coordonnées	141

Utilisation prévue

Pour utilisation en diagnostic in vitro (IVD).

Le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA qui utilise la technologie Hybrid Capture® 2 (HC2) est un test d'hybridation moléculaire avec amplification du signal par chimiluminescence sur microplaque pour la détection qualitative de l'ADN de 13 types de papillomavirus humains (HPV) à haut risque dans les prélèvements cervicaux et vaginaux.

Les échantillons cervicaux et vaginaux pouvant être analysés avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA sont les suivants :

- Échantillons cervicaux prélevés à l'aide du *digene* HC2 DNA Collection Device (prélevés par le médecin)
- Échantillons vaginaux prélevés à l'aide du *digene* HC2 DNA Collection Device (auto-prélevés)
- Biopsies prélevées dans le *digene* Specimen Transport Medium (STM, milieu de transport pour échantillons)
- Échantillons collectés à l'aide d'un dispositif de prélèvement de type balai ou d'une combinaison brosse/spatule, puis placés dans une solution PreservCyt ou dans un liquide conservateur SurePath

Ce test est préconisé :

- Pour la détection des HPV à haut risque de types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68, reconnus comme le facteur causatif primaire de développement d'un cancer du col utérin (ou cancer cervical).
- Comme test de dépistage initial sur une population féminine générale, à utiliser conjointement ou non avec un frottis cervical (frottis de Papanicolaou), afin d'identifier les femmes présentant un risque élevé de développement d'un cancer cervical ou de présence de lésions cervicales de haut grade. Plus la femme est âgée, plus le diagnostic du HPV est indicateur de lésions cervico-utérines.
- Comme test de suivi pour les patientes présentant des résultats de frottis cervicaux (cytologie) anormaux ou toute autre lésion cervicale, afin de déterminer la nécessité d'une coloscopie ou d'autres procédures de suivi.
- Comme test de suivi pour les patientes présentant des résultats de frottis cervicaux indiquant des lésions malpighiennes intra-épithéliales de bas grade (LSIL) ou des lésions malpighiennes intra-épithéliales de haut grade (HSIL) avant la coloscopie. Un résultat de test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA peut aider le médecin dans la prise en charge de ces patientes en facilitant l'évaluation du risque de présence ou d'absence de lésions de haut grade.

Résumé et description

Un grand nombre de maladies, telles que le condylome, la papulose bowénoïde, les néoplasies et les carcinomes intra-épithéliaux cervicaux, vaginaux et vulvaires sont imputables à la présence de certains types de HPV dans le tractus génital féminin (1-3). Il est généralement admis que ces virus sont essentiellement transmis par voie sexuelle et que les types de HPV à haut risque constituent le principal facteur de risque dans le développement d'un cancer cervical (4-8).

À ce jour, le virus HPV ne peut pas être cultivé in vitro et les tests immunologiques ne permettent pas de déterminer la présence d'une infection cervicale à HPV. Il est possible de mettre en évidence, de manière indirecte, une infection ano-génitale par le HPV au moyen d'un examen médical et par la présence d'altérations cellulaires caractéristiques associées à la réplication virale dans des échantillons de frottis cervical ou de biopsie. En variante, on peut analyser des biopsies par hybridation d'acides nucléiques, afin de détecter directement la présence d'ADN de HPV.

Historiquement, les HPV de types 16 et 18 sont considérés comme les types à haut risque de développement d'un cancer (8-10). Quant aux types de HPV 31, 33 et 35, il a été démontré qu'ils représentaient un risque moyen de survenue d'un cancer (2, 11-14). Cette parenté intermédiaire est due au fait que ces types sont plus fréquemment détectés dans les lésions intra-épithéliales squameuses de haut grade que dans les cancers. En conséquence, il est moins probable que la présence de ces types de HPV, en comparaison de celle des types de HPV à haut risque, entraîne un cancer (15). Ces 5 types de HPV réunis représentent environ 73 % des infections à HPV (16, 17). D'autres types de HPV, notamment les types 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68, ont été identifiés comme les principaux types de HPV détectables dans les autres lésions (17-27). Ces types de HPV peuvent également être classés dans les groupes de HPV à risque moyen et à haut risque, d'après leur distribution relative dans diverses catégories de diagnostics histo-pathologiques (16, 17, 24-28).

De l'ADN de HPV a été détecté chez environ 10 % des femmes présentant un épithélium cervical normal, mais la prévalence réelle au sein de certains groupes spécifiques de femmes est fortement influencée par l'âge et par d'autres paramètres démographiques (2, 10, 16, 29). Des études prospectives ont montré que 15 à 28 % des femmes ayant présenté un résultat de test positif pour l'ADN de HPV, avaient développé des lésions malpighiennes intra-épithéliales (SIL) en l'espace de 2 années en comparaison de seulement 1 à 3 % des femmes ayant présenté un résultat de test négatif pour l'ADN de HPV (30, 31). En particulier, le risque de progression des HPV de types 16 et 18 est plus élevé (environ 40 %) que pour les autres types de HPV (30).

Informations sur l'agent pathogène

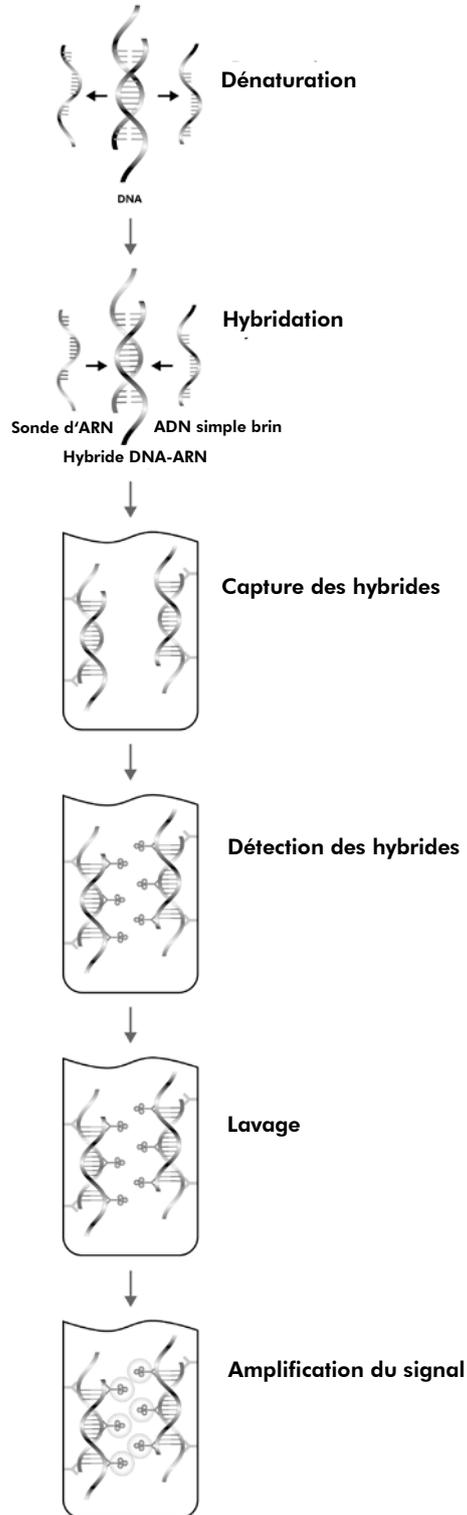
Les papillomavirus humains sont constitués d'une particule virale icosaédrique (virion) contenant une molécule d'ADN circulaire bicaténaire de 8 000 paires de bases enveloppée par une capsidie protéique. Après infection des cellules épithéliales, l'ADN viral s'établit dans toute l'épaisseur de l'épithélium, mais on ne retrouve des virions intacts que dans les couches supérieures du tissu épithélial. Ainsi, on peut retrouver de l'ADN viral dans les virions ou sous forme de séquences de HPV épisomiques ou intégrées, selon le type et le degré de gravité de la lésion.

Principe de la technique

Le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, qui utilise la technologie HC2, est un test d'hybridation moléculaire avec amplification du signal et détection chimiluminescente sur microplaque. Les échantillons contenant l'ADN cible recherché s'hybrident avec une sonde d'ARN de HPV spécifique. Les hybrides ARN-ADN obtenus sont capturés à la surface d'un puits de microplaque revêtue d'anticorps spécifiques aux hybrides ARN-ADN. On fait ensuite réagir les hybrides immobilisés avec des anticorps anti-hybrides ARN-ADN, conjugués à de la phosphatase alcaline, puis on effectue la détection à l'aide d'un substrat chimiluminescent. Chaque anticorps est conjugué à plusieurs molécules de phosphatase alcaline. Plusieurs anticorps conjugués se lient à chaque hybride capturé, ce qui entraîne une amplification substantielle du signal. Le clivage du substrat par la phosphatase alcaline liée déclenche une émission de lumière qui est mesurée en unités de lumière relatives (RLU) dans un appareil *digene* Microplate Luminometer (DML). L'intensité de la lumière émise indique la présence ou l'absence d'ADN cible dans l'échantillon.

Une valeur RLU égale ou supérieure à la valeur de seuil (CO) du test indique la présence de séquences d'ADN de HPV à haut risque dans l'échantillon. Une valeur RLU inférieure à la valeur CO du test indique l'absence des séquences d'ADN de HPV à haut risque spécifiques recherchées ou des niveaux d'ADN de HPV inférieurs à la limite de détection du test.

Procédure opératoire pour la capture d'hybrides



Préparation d'échantillons avec le QIASymphony SP

La préparation automatique d'échantillons en solution PreservCyt peut être effectuée en utilisant le QIASymphony SP avec le kit QIASymphony DSP HPV Media ou QIASymphony DSP AXpH DNA.

Préparation d'échantillons avec le kit QIASymphony DSP HPV Media

Le kit QIASymphony DSP HPV Media produit des extraits d'échantillons sur microplaque d'hybridation prêts pour les tests automatiques par Rapid Capture® System (RCS) avec le test digene HC2 High-Risk HPV DNA. Le QIASymphony SP effectue toutes les étapes de la procédure de préparation d'échantillons jusqu'à 88 échantillons, par lots contenant jusqu'à 24 échantillons, en un seul cycle.

Le QIASymphony SP traite 88 échantillons en solution PreservCyt en 2 heures et 15 minutes, sans qu'une intervention de l'utilisateur soit requise après le chargement des échantillons sur l'appareil.

Le QIASymphony SP traite 88 échantillons en solution SurePath en 1 heure et 45 minutes, sans qu'une intervention de l'utilisateur soit requise après le chargement des échantillons sur l'appareil. Pendant l'incubation des extraits d'échantillons, les étalons et les contrôles de qualité sont dénaturés à part, dans un bain-marie. Ils sont ensuite pipetés manuellement dans la première colonne de la microplaque d'hybridation une fois l'incubation des extraits d'échantillons terminée. La préparation d'échantillons en solution SurePath sur le QIASymphony SP et à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media peut être réalisée soit avant le début du traitement cytologique, soit après que ce traitement est achevé.

Important : Les extraits d'échantillons produits par la préparation d'échantillons en solution PreservCyt et SurePath à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media ne peuvent être testés que sur le RCS. Les tests manuels des extraits d'échantillons n'ont pas été validés.

Pour réaliser la préparation automatique d'échantillons en utilisant le QIASymphony, se référer aux manuels d'utilisation pertinents du QIASymphony et à la notice d'instructions (au manuel) du kit QIASymphony DSP HPV Media (*QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use [Handbook]*), en plus de la présente notice d'instructions, pour toutes les informations nécessaires en termes de procédure et de description.

Préparation d'échantillons avec le kit QIASymphony DSP AXpH DNA

Le kit QIASymphony DSP AXpH DNA fournit des éluats d'ADN dans la microplaque d'hybridation qui sont prêts à être testés manuellement ou automatiquement par RCS en utilisant le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Le QIASymphony SP effectue toutes les étapes de la procédure de préparation d'échantillons jusqu'à 88 échantillons, par lots contenant jusqu'à 24 échantillons, en un seul cycle. Le QIASymphony SP traite 88 échantillons en 4 heures et 30 minutes, sans qu'une intervention de l'utilisateur soit requise après le chargement des échantillons sur l'appareil.

Pour réaliser la préparation automatique d'échantillons en utilisant le QIASymphony, se référer aux manuels d'utilisation pertinents du QIASymphony et au manuel du kit QIASymphony DSP AXpH DNA (*QIASymphony DSP AXpH DNA Kit Handbook*), en plus de la présente notice d'instructions, pour toutes les informations nécessaires en termes de procédure et de description.

Tests avec le Rapid Capture System

L'analyse d'échantillons à haut débit avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA peut être réalisée en utilisant le RCS. Le kit à 4 plaques (réf. 618111) peut seulement être utilisé avec le RCS et il ne doit pas être utilisé pour réaliser des tests manuels.

Le RCS est un système automatisé de pipetage et de dilution à usage général, qui peut être utilisé avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA pour analyser des échantillons à haut débit. Ce système traite jusqu'à 352 échantillons en 8 heures, comprenant une période de 3,5 heures au cours de laquelle l'intervention de l'utilisateur n'est pas requise, ce qui permet de générer jusqu'à 704 résultats d'échantillons en l'espace de 13 heures.

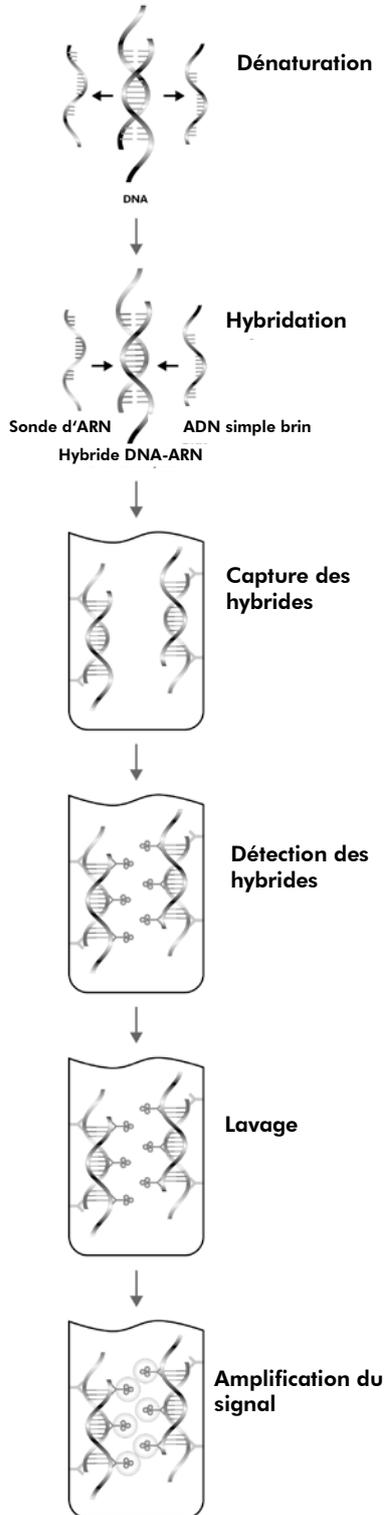
La préparation des échantillons est effectuée indépendamment du RCS avant de placer le tout sur le pont du RCS. En outre, la détection du signal chimiluminescent et le rapport des résultats sont effectués en utilisant un luminomètre DML hors ligne commun aux deux types d'analyse manuelle et automatique par RCS.

Chacune des étapes du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA est effectuée selon la même séquence que celle de l'analyse manuelle. Le RCS permet un processus échelonné analysant jusqu'à 4 microplaques, chaque microplaque contenant des échantillons ainsi que les étalons et les contrôles de qualité de test requis.

Lors de la réalisation d'une analyse automatique par RCS, se référer au manuel d'utilisation du Rapid Capture System (*Rapid Capture System User Manual*), plus particulièrement au paragraphe relatif à la réalisation des tests *digene* HC2 DNA à l'aide d'échantillons traités sur le QIASymphony SP (*Rapid Capture System User Manual – Performing digene HC2 DNA Tests*

Using QIAasymphony SP Processed Samples), en plus de la présente notice d'instructions, pour toutes les informations nécessaires en termes de procédure et de description.

Procédure opératoire pour la capture d'hybrides



Préparation manuelle des échantillons

Étapes automatisées sur le Rapid Capture

Matériel fourni

Kit de 1 plaque

Le test digene HC2 High-Risk HPV DNA à 1 plaque (réf. 5197-1330) contient 96 tests.

Lors de la réalisation d'une analyse manuelle avec le kit à 1 plaque, le plus petit nombre de tests recommandé à chaque utilisation est de 24. Si l'on souhaite effectuer moins de 24 tests par utilisation, le nombre total de tests par kit peut être réduit en raison des volumes limités de réactifs. Le nombre de résultats pour les patientes variera en fonction du nombre d'utilisations par kit, de la manière spécifiée ci-dessous :

Nombre d'utilisations	Nombre de résultats de patientes
1	88
2	80
3	72
4	64

Lors de la réalisation d'une analyse automatique par RCS avec le kit à 1 plaque, l'utilisation du kit entier nécessite une microplaque entière (88 échantillons) par cycle de RCS. Il est envisageable d'analyser une microplaque partielle, mais le kit entier sera utilisé en raison du volume mort requis pour le fonctionnement de l'appareil.

Kit de 4 plaque

Le test digene HC2 High-Risk HPV DNA à 4 plaques (réf. 618111) contient 384 tests.

Le kit à 4 plaques ne peut être utilisé que pour l'analyse automatique par RCS. Pour obtenir 384 tests, le kit à 4 plaques doit être utilisé dans 1 ou 2 cycles RCS. Si l'on souhaite effectuer plus de 2 cycles, le nombre total de tests par kit peut être réduit en raison des volumes limités de réactifs.

Contenu du kit

<i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA Test		
Référence	5197-1330	618111
Number of tests	96	384
Indicator Dye Contains 0.05% (w/v) sodium azide	0.35 ml	2.0 ml
Denaturation Reagent* (Réactif de dénaturation) Solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) diluée	50 ml	2 x 100 ml
Probe Diluent* (Diluant de sonde) Solution tamponnée contenant 0,05 % (p/v) d'azide de sodium	5 ml	20 ml
High-Risk HPV Probe (sonde HPV haut risque) Sondes ARN des HPV de type 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68 en solution tamponnée (bouchon rouge)	200 µl	3 x 200 µl
Low-Risk HPV Quality Control (contrôle de qualité HPV bas risque) 5 pg/ml (500 000 copies/ml) d'ADN de HPV 6 cloné et d'ADN entraîneur en solution STM contenant 0,05 % (p/v) d'azide de sodium	1 ml	1 ml
High-Risk HPV Quality Control (contrôle de qualité HPV haut risque) 5 pg/ml (500 000 copies/ml) d'ADN de HPV 16 cloné et d'ADN entraîneur en solution STM contenant 0,05 % (p/v) d'azide de sodium	1 ml	1 ml
Negative Calibrator (étalon négatif) Carrier DNA (ADN entraîneur) en solution STM contenant 0,05 % (p/v) d'azide de sodium	2 ml	2 ml
High-Risk HPV Calibrator (étalon HPV haut risque) 1 pg/ml d'ADN de HPV 16 cloné et d'ADN entraîneur en solution STM contenant 0,05% (p/v) d'azide de sodium	1 ml	2 ml
Capture Microplate (microplaque de capture) Revêtue d'anticorps polyclonaux de chèvre anti-hybride ARN-ADN	1	4
Detection Reagent 1 (réactif de détection 1) Anticorps conjugués à la phosphatase alcaline et spécifiques aux hybrides ARN-ADN, en solution tamponnée contenant 0,05 % (p/v) d'azide de sodium	12 ml	40 ml

<i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA Test		
Référence	5197-1330	618111
Number of tests	96	384
Detection Reagent 2 (réactif de détection 2)	12 ml	40 ml
CDP-Star® avec Emerald II (substrat chimiluminescent)		
Wash Buffer Concentrate* (tampon de lavage concentré) Contient 1,5 % (p/v) d'azide de sodium	100 ml	2 x 100 ml

* Voir « Avertissements et précautions », page 23, pour des informations sur la santé et la sécurité.

Matériel nécessaire mais non fourni

Important : S'assurer que tous les instruments utilisés au cours de cette procédure sont vérifiés et calibrés selon les recommandations du fabricant.

Équipement et matériel de diagnostic in vitro

Seuls l'équipement et le matériel compatibles avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA sont disponibles auprès de QIAGEN.

- *digene* Hybrid Capture 2 System (« *digene* HC2 System »), comprenant un luminomètre agréé par QIAGEN (« DML instrument »), un ordinateur personnel (PC) et des périphériques (écran, clavier, souris, imprimante et câble pour imprimante) agréés par QIAGEN, le *digene* HC2 System Software (logiciel d'analyse d'essai « *digene* assay analysis software »), des protocoles *digene* HC2 System Assay Protocols pour HPV, un LumiCheck Plate Software (logiciel LumiCheck Plate Software) et un manuel d'utilisation du logiciel *digene* HC2 System Software (*digene* HC2 System User Manual)
- Hybrid Capture System Rotary Shaker I
- Hybrid Capture System Microplate Heater I
- Hybrid Capture System Automated Plate Washer
- Hybrid Capture System Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 (en option)*
- Portoir de conversion avec couvercle (en option)*
- Portoir pour échantillons *digene* avec couvercle (en option)*
- Pipette avec portoir EXPAND-4 (en option)†
- Thermoscelleuse avec dispositif de coupe (en option, utilisé avec le MST Vortexer 2)
- Rapid Capture System (utilisation obligatoire avec le kit à 4 plaques ; en option pour le kit à 1 plaque)
- Laveur
- Microplaques d'hybridation
- Couvercles pour microplaques
- Barrettes de puits pour microplaque RCS
- Compartiments pour réactifs RCS*

* Requis pour effectuer une analyse automatique par RCS.

† Article personnalisé utilisé pour transférer les échantillons en solution STM dans la microplaque d'hybridation. D'autres pipettes multicanaux personnalisées, à écartement réglable, peuvent être utilisées à condition d'obtenir une distance de 3,2 cm entre les embouts écartés.

- Couvertres de compartiments pour réactifs RCS*
- Embouts jetables RCS*
- Bouchons RCS ajustables*
- Tampon N2†
- Tampon D2†
- Blue RCS Washer Boat‡
- Embouts de pipettes extra longs
- Tubes de prélèvement d'échantillon
- Portoir de tubes de prélèvement d'échantillon
- Bouchons à vis pour tubes de prélèvement d'échantillon
- Réservoirs jetables pour réactifs
- Film de scellage pour tubes DuraSeal™
- Microtubes d'hybridation§
- Portoir pour microtubes§
- Film de scellage pour plaques§

Équipement et matériel de laboratoire à usage général

- Cuve de bain-marie à 65 ± 2 °C de taille suffisante pour contenir un portoir d'échantillons (21 cm de large x 32 cm de profondeur x 18 cm de haut)
- Microcentrifugeuse
- Agitateur à vortex avec système de fixation des puits
- Pipette monocanal à réglage variable pour volumes de 20 à 200 µl et de 200 à 1000 µl
- Pipette à répétition à déplacement direct de type Eppendorf® Repeater®
- Pipette à 8 canaux à réglage variable pour volumes de 25 à 200 µl
- Minuterie
- Solution d'hypochlorite de sodium, 0,5 % v/v
- Film Parafilm® ou équivalent
- Embouts de pipette à filtre aérosol, jetables, pour pipette monocanal (20 à 200 µl et 200 à 1000 µl)
- Embouts jetables pour pipette à répétition à déplacement positif (12,5 ; 5 ; 2,5 et 1,25 ml)

* Requis pour effectuer une analyse automatique par RCS.

† Requis pour effectuer l'analyse des échantillons préparés avec le kit QIASymphony DSP AXpH DNA.

‡ Requis pour effectuer l'analyse automatique par RCS des échantillons traités avec le kit QIASymphony DSP HPV Media.

§ Requis pour effectuer l'hybridation avec des microtubes et un bain-marie.

-
- Embouts jetables pour pipette à 8 canaux (25 à 200 µl)
 - Lingettes Kimtowels® ou papier absorbant équivalent non pelucheux
 - Revêtement de pailleuse jetable
 - Gants jetables, non poudrés
 - Tubes en polypropylène de 5 ml et/ou 15 ml, à fond rond et couvercle à pression
 - Portoir pour tubes de 10 ml ou 15 ml
 - Tubes coniques en polypropylène de 50 ml

Équipement et matériel supplémentaires pour la préparation d'échantillons en solution PreservCyt

 Se référer à la notice d'instructions (au manuel) du kit QIAasymphony DSP HPV Media (*QIAasymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use [Handbook]*) pour la préparation automatique d'échantillons à l'aide du kit QIAasymphony DSP HPV Media.

 Se référer au manuel du kit QIAasymphony DSP AXpH DNA (*QIAasymphony DSP AXpH DNA Kit Handbook*) pour la préparation automatique d'échantillons à l'aide du kit QIAasymphony DSP AXpH DNA.

 Se référer à la notice d'instructions du kit *digene* HC2 Sample Conversion pour la préparation manuelle d'échantillons.

Équipement et matériel supplémentaires pour la préparation d'échantillons en solution SurePath

 Se référer à la notice d'instructions (au manuel) du kit QIAasymphony DSP HPV Media (*QIAasymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use [Handbook]*) pour la préparation automatique d'échantillons à l'aide du kit QIAasymphony DSP HPV Media

La préparation manuelle d'échantillons en solution SurePath nécessite l'équipement et le matériel supplémentaires suivants :

- Une centrifugeuse à godets oscillants capable d'atteindre $800 \pm 15 \times g$ et de contenir des tubes de centrifugeuse coniques en polypropylène de 15 ml
- Des tubes *digene* HC2 Sample Conversion* ou des tubes en polypropylène de 15 ml ou de la marque VWR® ou Corning®

Important : Les tubes de conversion *digene* HC2 Sample Conversion disponibles auprès de QIAGEN doivent être utilisés avec le MST Vortexer 2 ou le RCS.

- Des pipettes de transfert de 7 ml à pointe standard ou équivalent
- *digene* Specimen Transport Medium

Avertissements et précautions

Pour utilisation en diagnostic in vitro.

Lire attentivement toutes les instructions avant d'utiliser le test.

Avertissements

En cas de manipulation de produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Elles sont disponibles en ligne au format PDF à l'adresse www.qiagen.com/safety où vous pouvez trouver, consulter et imprimer les FDS de chaque kit et composant de kit QIAGEN.

Échantillons

ATTENTION



Risque d'agents infectieux

Les échantillons sont susceptibles de contenir des agents infectieux et doivent être manipulés de manière appropriée. Considérez tous les échantillons comme potentiellement infectieux..

Il n'existe aucune méthode connue pouvant totalement garantir que les échantillons ne transmettront pas d'infection. Il est recommandé de manipuler les échantillons humains conformément aux pratiques de sécurité biologique nationales et locales en vigueur. Ces pratiques doivent être mises en œuvre lors de la manipulation de substances contenant ou susceptibles de contenir des agents infectieux.

Ces précautions comprennent les précautions suivantes, mais sans s'y limiter :

- Ne pas pipeter à la bouche
- Ne pas fumer, manger, ni boire dans les lieux où les réactifs et les échantillons sont manipulés.
- Porter des gants jetables, non poudrés, lors de la manipulation des réactifs et des échantillons. Se laver les mains soigneusement après avoir réalisé le test.
- Nettoyer et désinfecter tout échantillon renversé à l'aide d'un désinfectant tuberculocide, tel que de l'hypochlorite de sodium à 0,5 % v/v ou un autre désinfectant approprié (32,).

- Décontaminer et mettre au rebut tout échantillon, réactif et autre matériel potentiellement contaminé conformément aux normes nationales et locales en vigueur.

Après les étapes de dénaturation et d'incubation, les échantillons ne sont plus considérés comme infectieux (34) ; pour autant, il est vivement conseillé au personnel de laboratoire de respecter les règles de précautions nationales et locales.

Azide de sodium

Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium. L'azide de sodium a été signalé comme formant de l'azide de plomb ou de cuivre dans les canalisations de laboratoire. Ces azides peuvent exploser en cas de chocs, comme le martelage. Pour éviter la formation d'azide de plomb ou de cuivre, rincer abondamment les canalisations avec de l'eau après avoir éliminé les solutions contenant de l'azide de sodium. Pour décontaminer d'anciennes canalisations pouvant avoir accumulé de l'azide, l'agence américaine pour la santé et la sécurité au travail (U.S. Occupational Safety and Health Administration) recommande la procédure suivante :

1. Vider le liquide retenu dans le siphon à l'aide d'un tuyau en caoutchouc ou en plastique.
2. Remplir le siphon d'une solution d'hydroxyde de sodium à 10 % v/v.
3. Laisser reposer pendant 16 heures.
4. Rincer abondamment avec de l'eau.

Tampon N2

ATTENTION



Risque de composés hautement réactifs

Ne jamais verser d'eau de Javel ni de solutions acides directement dans une solution ou des déchets contenant le tampon N2.

Le tampon N2 contient du chlorhydrate de guanidine qui peut former des composés hautement réactifs lorsqu'il est associé à un javellisant.

En cas de déversement de liquide contenant ces tampons, nettoyer avec un détergent de laboratoire adapté et de l'eau. Si le liquide renversé contient des agents potentiellement infectieux, nettoyer l'endroit contaminé d'abord avec un détergent de laboratoire et de l'eau, puis avec de l'hypochlorite de sodium à 1 % (v/v).

Analyse automatique par RCS

Se référer au manuel d'utilisation du Rapid Capture System (*Rapid Capture System User Manual*) pour d'autres avertissements et précautions spécifiques à l'utilisation de ce système d'analyse d'échantillons à haut débit.

Consignes relatives à la sécurité et aux risques pour la santé

Les phrases de risques et de sécurité suivantes s'appliquent aux composants du kit de test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA :

Wash Buffer Concentrate (Tampon de lavage concentré)



Contient: Sodium azide. Attention! Nocif en cas d'ingestion. Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme. Éviter le rejet dans l'environnement. Éliminer le contenu/récipient dans une installation d'élimination des déchets agréée.

Denaturation Reagent (Réactif de dénaturation)



Contient: sodium hydroxide. Danger! Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. Peut être corrosif pour les métaux. Éliminer le contenu/récipient dans une installation d'élimination des déchets agréée. EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux): enlever immédiatement les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau/ se doucher. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. Garder sous clef. Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage.

Probe Diluent (Diluant de sonde)



Contient: acetic acid; Polyacrylic acid. Danger! Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. Éliminer le contenu/récipient dans une installation d'élimination des déchets agréée. EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux): enlever immédiatement les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau/ se doucher. Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin. Garder sous clef. Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/ du visage.

High-Risk HPV Calibrator (calibrateur HPV haut risque)

Avertissement ! Entraîne une légère irritation cutanée. En cas d'irritation cutanée : Consulter un médecin.

High-Risk HPV Quality Control (contrôle de qualité HPV haut risque)

Attention! Provoque une légère irritation cutanée. En cas d'irritation cutanée: consulter un médecin.

Low-Risk HPV Quality Control (contrôle de qualité HPV bas risque)

Attention! Provoque une légère irritation cutanée. En cas d'irritation cutanée: consulter un médecin.

Negative Calibrator (étalon négatif)

Attention! Provoque une légère irritation cutanée. En cas d'irritation cutanée: consulter un médecin

Précautions d'emploi

L'utilisateur doit toujours respecter les précautions suivantes lors de la réalisation du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA :

- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date d'expiration figurant à côté du symbole  sur l'étiquette du conditionnement extérieur ou la date d'expiration des réactifs préparés.
- La réalisation de tests en dehors des plages de durées et de températures indiquées peut fausser les résultats. Les tests réalisés en dehors des plages de durées et de températures établies ne seront pas valides et devront être recommencés.
- La procédure du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, l'étalonnage de l'essai, le contrôle de qualité et l'interprétation des résultats d'échantillon doivent être rigoureusement respectés pour obtenir des résultats de test fiables.
- Il est important de pipeter le volume exact de réactif indiqué et de mélanger soigneusement la solution après chaque addition de réactif. Ne pas respecter ces recommandations peut entraîner des résultats de test erronés. S'assurer que ces conditions sont respectées en notant le changement de coloration attendu.
- À l'exception du tampon de lavage concentré, les composants du kit ont été testés en lot. Il ne faut pas les remplacer par des composants provenant d'autres sources ou de lots différents. Il est toutefois acceptable de combiner des composants provenant de kits ayant le même numéro de lot pour obtenir les volumes de réactifs requis et de tester plusieurs microplaques au cours d'un cycle RCS.
- Les acides nucléiques sont très sensibles à la dégradation provoquée par les nucléases environnantes. Les nucléases sont présentes sur la peau humaine et sur les surfaces ou les matériels manipulés par l'être humain. Nettoyer et recouvrir les surfaces de travail avec un revêtement de paillasse jetable et porter des gants non poudrés pendant toutes les étapes du test.
- Veiller à éviter toute contamination des microplaques de capture et du réactif de détection 2 (DR2) par de la phosphatase alcaline exogène pendant la réalisation du test. Les substances à même de contenir de la phosphatase alcaline comprennent le réactif de détection 1 (DR1), les bactéries, la salive, les cheveux et le sébum de la peau. Il est particulièrement important de recouvrir la microplaque de capture après l'étape de lavage et pendant l'incubation avec le réactif DR2, car la phosphatase alcaline exogène peut réagir avec le réactif DR2, produisant des résultats faussement positifs.
- Protéger le réactif DR2 d'une exposition prolongée à la lumière directe. Utiliser le réactif DR2 immédiatement après avoir prélevé la fraction aliquote et le protéger des rayons solaires directs.

- Préparer à l'avance la pipette à répétition avec le réactif à distribuer et vérifier la pipette périodiquement pour la présence de grosses bulles d'air. Un nombre excessif de grosses bulles d'air dans l'embout de la pipette à répétition peut entraîner une distribution imprécise, ce qui peut être évité en remplissant la pipette, puis en la vidant avant de la remplir à nouveau. Pour des instructions plus spécifiques concernant l'utilisation de la pipette, se référer au manuel d'utilisation de la pipette correspondante.
- La distribution des réactifs DR1 et DR2 avec une pipette multicanaux doit être effectuée selon la technique du pipetage inversé (voir « Détection des hybrides », page 59). Vérifier que chaque embout de la pipette multicanaux est bien engagé et rempli.
- S'assurer que chaque puits de la microplaque de capture est soigneusement lavé (voir « Lavage », page 60). Un lavage incomplet se traduira par un bruit de fond accru et peut générer des résultats faussement positifs. La présence de tampon de lavage résiduel dans les puits de la microplaque de capture peut entraîner une diminution du signal ou une mauvaise reproductibilité.

Stockage et manipulation des réactifs

Composants du kit

Conserver le kit à une température comprise entre 2 et 8 °C dès sa réception. Le tampon de lavage concentré, le réactif de dénaturation et l'indicateur coloré peuvent être stockés à une température de 2 à 30 °C, suivant les besoins. Tous les réactifs sont livrés prêts à l'emploi, à l'exception du réactif de dénaturation (DNR), du mélange de sondes et du tampon de lavage.

Réactifs préparés

Une fois préparée, la solution de DNR est stable pendant 3 mois à une température de 2 à 8 °C.

Une fois préparé, le tampon de lavage est stable pendant 3 mois à une température de 2 à 30 °C.

Si l'analyse porte sur des échantillons en solution PreservCyt traités en utilisant le kit QIASymphony DSP HPV Media ou le kit QIASymphony DSP AXpH DNA, les étalons et les contrôles de qualité ouverts et non dénaturés restent stables pendant 3 mois entre 2 et 8 °C.

Si l'analyse porte sur des échantillons traités en utilisant le kit QIASymphony DSP AXpH DNA, le réactif de dénaturation 2 (DNR2) reste stable pendant 8 heures entre 15 et 30 °C.

Prélèvement et préparation des échantillons

Prélever et transporter les échantillons cervicaux et vaginaux destinés à être analysés avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA en utilisant l'un des appareils d'échantillonnage suivants :

- *digene* HC2 DNA Collection Device (comprenant une cytobrosse et le milieu STM)
- Biopsies prélevées dans le milieu *digene* STM
- Système de prélèvement de type balai ou de type combinaison brosse/spatule, placé dans une solution PreservCyt ou dans un liquide conservateur SurePath

Les échantillons prélevés via d'autres appareils d'échantillonnage ou transportés dans d'autres milieux de transport ne sont pas recommandés pour une analyse avec ce test. Les caractéristiques de performance de ce test n'ont été établies que pour les kits de prélèvement mentionnés.

Le dispositif de prélèvement *digene* HC2 DNA Collection Device ne doit pas être utilisé chez la femme enceinte. Les échantillons cervicaux doivent être prélevés avant d'appliquer l'acide acétique ou l'iode si un examen par colposcopie est réalisé. Se référer à la notice d'instructions du dispositif de prélèvement *digene* HC2 DNA Collection Device pour obtenir des procédures supplémentaires de prélèvement et de manipulation des échantillons.

Les échantillons cervicaux et vaginaux prélevés dans du STM ne nécessitent pas de conversion avant d'être analysés avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Les échantillons en solution PreservCyt ou SurePath nécessitent une conversion avant d'être analysés avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Échantillons cervicaux et vaginaux en milieu STM

Important : Ne pas prélever d'échantillon cervical ou vaginal en milieu STM en cas de présence de concentrations élevées de crème antifongique, de gel contraceptif ou de produits de douche intime.

Les échantillons en milieu STM peuvent être conservés pendant une durée maximum de 2 semaines à température ambiante et expédiés au laboratoire d'analyse sans être réfrigérés. Expédier les échantillons dans un conteneur calorifugé pour une livraison le lendemain ou sous 2 jours.

Au laboratoire d'analyse, les échantillons doivent être conservés à une température de 2 à 8 °C si l'analyse est prévue avec un délai de 1 semaine. Si le test doit être effectué après plus de 1 semaine, couvrir les bouchons des tubes d'échantillon avec du film Parafilm et stocker les échantillons à -20 °C pendant une durée maximum de 3 mois. Au moment de sortir les

échantillons du congélateur à fin d'analyse, remplacer immédiatement les bouchons par des bouchons à vis pour tubes de prélèvement d'échantillon.

Un conservateur a été ajouté au milieu STM afin de retarder la croissance bactérienne et de préserver l'intégrité de l'ADN. Il n'est pas destiné à maintenir la viabilité des organismes ou des cellules.

Biopsies cervicales

Des biopsies cervicales fraîchement prélevées, en coupes transversales de 2 à 5 mm d'épaisseur, peuvent être analysées avec le test digene HC2 High-Risk HPV DNA. Ne pas utiliser de biopsies dont le diamètre est inférieur à 2 mm. Placer immédiatement l'échantillon de biopsie dans 1,0 ml de STM, recouvrir le bouchon du tube d'échantillon avec un film Parafilm pour empêcher le bouchon de sauter, puis stocker sous forme congelée à -20 °C. Expédier les échantillons de biopsie à 2-30 °C pour une livraison le lendemain matin au laboratoire d'analyse.

Dans le laboratoire d'analyse, stocker à -20 °C jusqu'au traitement. Au moment de sortir les échantillons du congélateur à fin d'analyse, remplacer immédiatement les bouchons par des bouchons à vis pour tubes de prélèvement d'échantillon.

Échantillons cervicaux en solution PreservCyt

Important Ne pas prélever d'échantillon cervical en solution PreservCyt en vue d'une préparation d'échantillons avec le kit QIAasymphony DSP HPV Media si de la crème antifongique, du gel lubrifiant vaginal ou du sang sont présents en fortes concentrations.

Important Ne pas prélever d'échantillon cervical en solution PreservCyt en vue d'une préparation d'échantillons avec le kit QIAasymphony DSP AXpH DNA si du gel contraceptif est présent.

Prélever les échantillons de la manière habituelle et préparer les lames de frottis cervical ThinPrep® selon la notice d'instructions fournie par le fabricant.

Une fois le prélèvement effectué, conserver les échantillons en solution PreservCyt pendant une durée allant jusqu'à 3 mois à une température de 2 à 30 °C avant de préparer l'échantillon pour le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Les échantillons en solution PreservCyt ne peuvent pas être congelés.

Les méthodes suivantes peuvent être utilisées pour la préparation des échantillons :

- Préparation automatique d'échantillons à l'aide du QIAasymphony SP et du kit QIAasymphony DSP HPV Media

Cette méthode permet d'obtenir un extrait d'échantillon (contenant des particules magnétiques, du milieu STM et du réactif DNR) prêt pour l'étape de dénaturation du test.

- Préparation automatique d'échantillons à l'aide du QIAAsymphony SP et du kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA

Cette méthode fournit un éluat d'ADN prêt pour l'étape de dénaturation du test

- Préparation manuelle des échantillons à l'aide du kit *digene* HC2 Sample Conversion.

La préparation manuelle des échantillons fournit un échantillon dénaturé prêt pour l'étape d'hybridation du test

Les exigences en matière de volume d'échantillon dépendent de la méthode de préparation :

- La préparation automatique d'échantillons avec le kit QIAAsymphony DSP HPV Media nécessite 3 ml d'échantillon.
- La préparation automatique d'échantillons avec le kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA nécessite 4 ml d'échantillon.
- La préparation manuelle des échantillons à l'aide du kit *digene* HC2 Sample Conversion nécessite au moins 4 ml d'échantillon.

Les échantillons en solution présentant un volume inférieur au volume d'échantillon requis après que le frottis cervical a été préparé ne contiennent pas assez de matière pour l'analyse et peuvent engendrer un résultat faussement négatif au test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Échantillons cervicaux dans le liquide conservateur SurePath

Important : Ne pas prélever d'échantillon cervical en solution SurePath en vue d'une préparation d'échantillons avec le kit QIAAsymphony DSP HPV Media si du gel contraceptif, de la crème antifongique ou de la crème anti-inflammatoire sont présents.

Prélever les échantillons en solution dans le liquide conservateur SurePath conformément aux instructions d'utilisation en vigueur.

La préparation d'échantillons en solution SurePath peut être réalisée soit avant le début du traitement cytologique, soit après que ce traitement est achevé.

Si elle est réalisée avant le début du traitement cytologique, utiliser un extrait de l'échantillon en solution SurePath initial qui n'a été traité par aucune autre méthode de diagnostic, y compris par BD PrepMate® et BD PrepStain® Slide Processor. Dans la présente notice d'utilisation, ces échantillons sont désignés sous le nom « échantillons SurePath » afin d'éviter toute confusion.

Si elle est réalisée après la fin du traitement cytologique, utiliser un extrait du culot cellulaire post-gradient résiduel après qu'un échantillon en solution SurePath a été préparé selon les instructions pertinentes pour BD PrepMate® System et BD PrepStain® Slide Processor. Dans la présente notice d'utilisation, ces échantillons sont désignés sous le nom « échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath » afin d'éviter toute confusion.

Les méthodes suivantes peuvent être utilisées pour la préparation des échantillons :

- Préparation automatique d'échantillons SurePath à l'aide du QIASymphony SP et du kit QIASymphony DSP HPV Media.

Cette méthode permet d'obtenir un extrait d'échantillon dénaturé (contenant des particules magnétiques, du milieu STM et du réactif DNR) prêt pour l'étape d'hybridation du test.

- Préparation automatique d'échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath à l'aide du QIASymphony SP et du kit QIASymphony DSP HPV Media.

Cette méthode permet d'obtenir un extrait d'échantillon dénaturé (contenant des particules magnétiques, du milieu STM et du réactif DNR) prêt pour l'étape d'hybridation du test.

- Préparation manuelle d'échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath.

La préparation manuelle des échantillons fournit un échantillon dénaturé prêt pour l'étape d'hybridation du test.

Les exigences en matière de volume d'échantillon dépendent de la méthode de préparation :

- La préparation automatique d'échantillons avec le kit QIASymphony DSP HPV Media nécessite 950 µl.
- La préparation manuelle d'échantillons nécessite 2,8 ml d'échantillon de culot cellulaire post-gradient SurePath.

L'utilisation d'un volume insuffisant peut engendrer un résultat faussement négatif au test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Préparation automatique d'échantillons en solution SurePath

Une fois le prélèvement effectué, conserver les échantillons en solution SurePath pendant une durée allant jusqu'à 4 semaines à une température de 5 à 25 °C avant de préparer l'échantillon à l'aide du QIASymphony SP et du kit QIASymphony DSP HPV Media. L'échantillon en solution SurePath utilisé ne doit avoir été traité par aucune autre méthode de diagnostic, y compris par BD PrepMate et BD PrepStain Slide Processor. La préparation automatique des échantillons nécessite 950 µl de l'échantillon en solution SurePath.

Préparation automatique d'échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath

Important : Immédiatement après la préparation des lames de frottis cervical SurePath, pipeter 2,0 ml de liquide conservateur SurePath dans le tube de centrifugeuse contenant le culot cellulaire post-gradient. Cela préserve le culot cellulaire post-gradient pour la réalisation du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Le culot cellulaire post-gradient avec le liquide conservateur SurePath peut être stocké sur une période allant jusqu'à 4 semaines entre 5 et 25 °C, avant la préparation de l'échantillon pour le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. La préparation automatique des échantillons nécessite 950 µl du culot cellulaire post-gradient SurePath.

Préparation manuelle d'échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath

Important : Immédiatement après la préparation des lames de frottis cervical SurePath, pipeter 2,0 ml de liquide conservateur SurePath dans le tube de centrifugeuse contenant le culot cellulaire résiduel. Cela préserve le culot cellulaire post-gradient pour la réalisation du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Le culot cellulaire post-gradient avec le liquide conservateur SurePath peut être stocké sur une période allant jusqu'à 4 semaines entre 2 et 30 °C, avant la préparation de l'échantillon pour le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Les échantillons SurePath de culot cellulaire post-gradient sont préparés de la manière spécifiée dans la présente notice d'instructions. La préparation manuelle des échantillons fournit un échantillon dénaturé prêt pour l'étape d'hybridation du test.

Procédure

Étapes préliminaires

- Pour l'analyse manuelle, laisser le Microplate Heater I s'équilibrer pendant 60 minutes au moins à une température de $65\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ s'il était à l'arrêt. La microplaque d'hybridation peut fondre si ce délai n'est pas respecté. Pour obtenir des instructions supplémentaires, se référer au manuel d'utilisation du Microplate Heater I (*Microplate Heater I User Manual*).
- Si un bain-marie est utilisé pendant les étapes de dénaturation et d'hybridation, s'assurer que le bain-marie est réglé sur 65 °C et que le niveau d'eau est suffisant pour immerger tout le volume d'échantillon contenu dans le tube.

Préparation des réactifs

- Sortir les échantillons et tous les réactifs requis du réfrigérateur avant de commencer le test. Les laisser atteindre une température de $20\text{ à }25\text{ °C}$ pendant 15 à 30 minutes. Préparer les échantillons en solution PreservCyt et SurePath avant d'équilibrer tout échantillon dénaturé et tout réactif à température ambiante.
- Si les réactifs prêts à l'emploi sont combinés pour effectuer un cycle RCS de plusieurs plaques, mélanger soigneusement chaque flacon, puis combiner le volume de réactif applicable dans un tube conique en polypropylène jetable propre.
- Si des réactifs prêts à l'emploi de kits à 1 plaque doivent être combinés pour effectuer un cycle RCS de plusieurs plaques, mélanger soigneusement chaque flacon, puis combiner le volume de réactif pertinent dans un tube conique en polypropylène jetable propre.
- Pour réaliser une analyse manuelle, il convient de préparer le tampon de lavage et les réactifs de mélange de sondes au cours d'étapes particulières de l'analyse. Dans le cas d'une analyse automatique par RCS, tous les réactifs sont préparés avant de commencer le cycle de RCS et sont placés sur le pont du RCS.
- Préparer les réactifs DNR et DNR2, le cas échéant, avant de préparer les autres réactifs.
- Jeter tous les réactifs (sauf indication contraire) et toutes les fractions aliquotes de réactifs à la fin du test.
- Utiliser les tableaux 1 à 5 ci-dessous pour déterminer le volume requis de chaque réactif en se basant sur le nombre de tests/microplaques et sur la méthode d'analyse. Les volumes destinés à une analyse automatique par RCS comprennent le volume mort de réactifs requis par l'appareil.

Tableau 1. Volumes requis des réactifs préparés et prêts à l'emploi pour une analyse manuelle d'échantillons en milieu STM et d'échantillons préparés manuellement en solution PreservCyt et SurePath

Nombre de tests/barrettes	Mélange de sondes	Tampon de lavage	DR1	DR2
24/3	1.04 ml	>1 liter	3 ml	3 ml
48/6	2.08 ml	>1 liter	5 ml	5 ml
72/9	3.12 ml	>1 liter	7 ml	7 ml
96/12	4.16 ml	>1 liter	12 ml	12 ml

Tableau 2. Volumes requis des réactifs préparés et prêts à l'emploi pour une analyse automatique par RCS des échantillons en milieu STM, des échantillons préparés manuellement en solution PreservCyt et SurePath et des échantillons SurePath préparés à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media

Nombre de microplaques	Mélange de sondes	Tampon de lavage	DR1	DR2
≤1	5.20 ml	3 liters	10 ml	10 ml
≤1.5	6.24 ml	3 liters	14 ml	14 ml
≤2	8.32 ml	3 liters	18 ml	18 ml
≤2.5	9.36 ml	6 liters	22 ml	22 ml
≤3	10.40 ml	6 liters	26 ml	26 ml
≤3.5	12.48 ml	6 liters	30 ml	30 ml
≤4	13.52 ml	6 liters	34 ml	34 ml

Tableau 3. Volumes requis des réactifs préparés et prêts à l'emploi pour une analyse automatique par RCS des échantillons préparés en solution PreservCyt à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media

Nombre de microplaques	DNR	Mélange de sondes	Tampon de lavage	DR1	DR2
≤1	2.2 ml	5.20 ml	3 liters	10 ml	10 ml
≤1.5	2.2 ml	6.24 ml	3 liters	14 ml	14 ml
≤2	2.4 ml	8.32 ml	3 liters	18 ml	18 ml
≤2.5	2.4 ml	9.36 ml	6 liters	22 ml	22 ml
≤3	2.6 ml	10.40 ml	6 liters	26 ml	26 ml
≤3.5	2.6 ml	12.48 ml	6 liters	30 ml	30 ml
≤4	2.8 ml	13.52 ml	6 liters	34 ml	34 ml

Tableau 4. Volumes requis des réactifs préparés et prêts à l'emploi pour une analyse manuelle des échantillons préparés en solution PreservCyt à l'aide du kit QIASymphony DSP AXpH DNA

Nombre de tests/barrettes	DNR	DNR2	Mélange de sondes	Tampon de lavage	DR1	DR2
24/3	0.6 ml	1.0 ml	1.04 ml	>1 liter	3 ml	3 ml
48/6	0.6 ml	2.0 ml	2.08 ml	>1 liter	5 ml	5 ml
72/9	0.6 ml	2.5 ml	3.12 ml	>1 liter	7 ml	7 ml
96/12	0.6 ml	5.0 ml	4.16 ml	>1 liter	12 ml	12 ml

Tableau 5. Volumes requis des réactifs préparés et prêts à l'emploi pour une analyse automatique par RCS des échantillons préparés en solution PreservCyt à l'aide du kit QIASymphony DSP AXpH DNA

Nombre de microplaques	DNR	DNR2	Mélange de sondes	Tampon de lavage	DR1	DR2
≤1	2.2 ml	5.0 ml	5.20 ml	3 liters	10 ml	10 ml
≤1.5	2.2 ml	5.5 ml	6.24 ml	3 liters	14 ml	14 ml
≤2	2.4 ml	6.5 ml	8.32 ml	3 liters	18 ml	18 ml
≤2.5	2.4 ml	7.7 ml	9.36 ml	6 liters	22 ml	22 ml
≤3	2.6 ml	8.8 ml	10.40 ml	6 liters	26 ml	26 ml
≤3.5	2.6 ml	10.0 ml	12.48 ml	6 liters	30 ml	30 ml
≤4	2.8 ml	11.0 ml	13.52 ml	6 liters	34 ml	34 ml

Réactif de dénaturation

Le kit à 1 plaque comporte 50 ml de réactif de dénaturation et le kit à 4 plaques contient 2 x 100 ml de réaction de dénaturation. Veiller à préparer le réactif DNR en fonction du volume fourni avec le kit concerné.

Remarques :

- Une fois préparé, le réactif DNR est stable pendant 3 mois à une température de 2 à 8 °C.
- Si la couleur s'estompe, ajouter 3 gouttes supplémentaires d'indicateur coloré et mélanger soigneusement avant utilisation.

Bouteille de 50 ml

1. Ajouter 5 gouttes d'indicateur coloré dans la bouteille de 50 ml de réactif de dénaturation.
2. Mélanger soigneusement.

Le réactif DNR doit présenter une couleur violet foncé uniforme.

3. Inscrire la nouvelle date d'expiration sur l'étiquette de la solution de DNR.

Bouteille de 100 ml

1. Ajouter 10 gouttes d'indicateur coloré dans la bouteille de 100 ml de réactif de dénaturation.
2. Mélanger soigneusement.
Le réactif DNR doit présenter une couleur violet foncé uniforme.
3. Inscrire la nouvelle date d'expiration sur l'étiquette de la solution de DNR.

Réactif de dénaturation 2

Remarque : Le DNR2 est seulement requis pour l'analyse des échantillons préparés en solution PreservCyt avec le kit QIAasymphony DSP AXpH DNA.

1. Étiqueter un tube conique en polypropylène propre jetable avec la mention « DNR2 ».
2. Ajouter le volume requis de tampon N2 (voir le tableau 6, ci-dessous) au récipient étiqueté.

Tableau 6. Préparation du DNR2

Volume de DNR2 requis	Volume de tampon N2	Volume de tampon D2	Indicateur coloré
1.0 ml	0.4 ml	0.6 ml	1-2 gouttes
2.0 ml	0.8 ml	1.2 ml	1-2 gouttes
2.5 ml	1.0 ml	1.5 ml	1-2 gouttes
5.0 ml	2.0 ml	3.0 ml	1-2 gouttes
5.5 ml	2.2 ml	3.3 ml	1-2 gouttes
6.5 ml	2.6 ml	3.9 ml	1-2 gouttes
7.7 ml	3.1 ml	4.6 ml	1-2 gouttes
8.8 ml	3.5 ml	5.3 ml	1-2 gouttes
10.0 ml	4.0 ml	6.0 ml	1-2 gouttes
11.0 ml	4.4 ml	6.6 ml	1-2 gouttes

3. Ajouter le volume requis de tampon D2 (voir le tableau 6, ci-dessus) au récipient étiqueté.
4. Ajouter le volume requis d'indicateur coloré (voir le tableau 6, ci-dessus) au récipient étiqueté.

Remarque : Utiliser l'indicateur coloré fourni avec le kit du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

5. Vortexer pendant au moins 10 secondes.

Remarque : Une fois préparé, le réactif DNR2 est stable pendant 8 heures à une température de 15 à 30 °C.

Mélange de sondes

- Pour une analyse manuelle, préparer le mélange de sondes pendant l'étape de dénaturation et d'incubation des échantillons (le cas échéant, voir « Dénaturation des étalons, des contrôles de qualité et des échantillons en milieu STM », page 50, ou « Dénaturation des étalons, des contrôles de qualité et des éluats d'ADN pour l'analyse manuelle », page 47).
 - Des précautions extrêmes sont requises à ce stade afin d'éviter toute contamination par de la RNase. Utiliser des embouts de pipette avec filtre aérosol pour pipeter la sonde.
 - Le diluant de sonde est visqueux. S'assurer qu'il se forme un tourbillon visible lors de la préparation du mélange de sondes ; un mélange insuffisant peut entraîner une diminution du signal.
 - Si plusieurs flacons de sonde sont combinés pour effectuer une analyse automatique par RCS, regrouper la sonde dans un seul flacon et mélanger par pipetage.
1. Pour éviter que la sonde ne soit piégée dans le bouchon du flacon, centrifuger chaque flacon de sonde brièvement pour amener tout le liquide au fond du flacon.
 2. Tapoter délicatement le flacon pour mélanger.
 3. Déterminer la quantité de mélange de sondes requise :

Recommandation : Préparer une quantité supplémentaire de mélange de sondes pour pallier le volume pouvant être perdu dans les embouts de pipette ou sur les parois du flacon. Les volumes spécifiés dans les tableaux 1 à 5 présentés ci-dessus comprennent le volume supplémentaire recommandé.

Analyse manuelle : Déterminer les volumes requis pour diluer la sonde selon un rapport 1:25 dans le diluant de sonde, afin de préparer le mélange de sondes (25 µl/test). Les volumes sont indiqués dans le Tableau 1, page 35, et dans le Tableau 4, page 36, selon le cas.

Analyse automatique par RCS : Utiliser les volumes indiqués dans le Tableau 2, page 35, dans le Tableau 3, page 35, ou dans le Tableau 5, page 36, selon le cas.

4. Inscrive sur un nouveau récipient jetable la mention « Mélange de sondes HPV haut risque ». Il est recommandé d'utiliser un tube de polypropylène de 5 ml ou de 15 ml à fond rond et avec bouchon à pression, selon le nombre de tests à effectuer.
5. Ajouter le volume requis de diluant de sonde (voir le tableau 7, ci-dessous) dans le récipient étiqueté.

6. Transférer la quantité requise de sonde HPV haut risque dans le diluant de sonde (voir le tableau 7 indiqué ci-dessous) en plaçant l'embout de pipette contre la paroi interne du tube, juste au-dessus du ménisque, et en expulsant le contenu.

Important : Ne pas immerger l'embout dans le diluant de sonde.

Tableau 7. Préparation du mélange de sondes

Volume de mélange de sondes requis	Volume de diluant de sonde	Volume de sonde HPV haut risque
1.04 ml	1.0 ml	40 µl
2.08 ml	2.0 ml	80 µl
3.12 ml	3.0 ml	120 µl
4.16 ml	4.0 ml	160 µl
5.20 ml	5.0 ml	200 µl
6.24 ml	6.0 ml	240 µl
8.32 ml	8.0 ml	320 µl
9.36 ml	9.0 ml	360 µl
10.40 ml	10.0 ml	400 µl
12.48 ml	12.0 ml	480 µl
13.52 ml	13.0 ml	520 µl

7. Mélanger par vortexage pendant au moins 5 secondes à vitesse maximale pour un mélange efficace.

Un tourbillon visible doit se former

Tampon de lavage

- Pour une analyse manuelle, préparer le tampon de lavage pendant l'étape de capture d'hybride (voir « Capture des hybrides », page 57).
- Pour une exposition minimale, ajouter de l'eau au tampon de lavage concentré au cours de la préparation.
- Pour la méthode de lavage manuel de la microplaque, préparer 3 litres de tampon de lavage dans l'appareil de lavage.

Recommandation : Tous les 3 mois, nettoyer l'appareil de lavage et ses tubulures avec une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5 % et rincer abondamment avec de l'eau distillée ou désionisée pour éviter une éventuelle contamination par de la phosphatase alcaline présente dans les bactéries et les moisissures.

- Concernant l'appareil Automated Plate Washer, préparer le tampon de lavage et le conserver dans un récipient fermé, ou en préparer 1 litre et le transférer dans le réservoir du laveur Automated Plate Washer.
 - Pour une analyse automatique par RCS, préparer la quantité spécifiée (selon les besoins, voir le Tableau 2, page 35, le Tableau 3, page 35, ou le Tableau 5, page 36) dans la bouteille de lavage du RCS.
1. Mélanger soigneusement le tampon de lavage concentré et ajouter le volume requis de tampon de lavage concentré (voir le tableau 8, ci-dessous) dans le récipient spécifié.
 2. Ajouter le volume requis d'eau distillée ou désionisée (voir le tableau 8, ci-dessous) au récipient spécifié.

Tableau 8. Préparation du tampon de lavage

Volume de tampon de lavage requis	Volume de concentré pour tampon de lavage	Volume d'eau distillée ou désionisée
1 litre	33.3 ml	966.7 ml
2 litres	66.6 ml	1933.4 ml
3 litres	100.0 ml	2900.0 ml
6 litres	200.0 ml	5800.0 ml

3. Placer du papier absorbant propre, non pelucheux, sur toutes les ouvertures du récipient et mélanger soigneusement.
4. Sceller le récipient pour éviter toute contamination ou évaporation, ou le placer dans l'appareil correspondant, selon le cas.
5. Inscrire la nouvelle date d'expiration sur l'étiquette du tampon de lavage.

Remarque : Une fois préparé, le tampon de lavage est stable pendant 3 mois à une température de 2 à 30 °C.

Créer le schéma de répartition des plaques

1. Créer un schéma de répartition de plaques en utilisant le logiciel d'analyse *digene* assay analysis software avec les protocoles de test *digene* assay protocols spécifiques au HPV.

Se référer au manuel d'utilisation du logiciel pertinent pour se procurer les instructions en matière de création d'un schéma de répartition de plaques présentant les positions appropriées pour les étalons, les contrôles de qualité et les échantillons.

Remarques :

- Les étalons, les contrôles de qualité et les échantillons en solution sont analysés selon une configuration de colonne de 8 puits.
- Analyser les étalons et les contrôles de qualité dans les positions de microplaque suivantes (voir la Figure 1, page 41) :
 - Réplicats de contrôle négatif (NC) dans les puits de microplaque A1, B1 et C1
 - Étalon HPV haut risque (HRC) dans les puits de microplaque D1, E1 et F1
 - Contrôle de qualité HPV bas risque (QC1-LR) dans le puits de microplaque G1
 - Contrôle de qualité HPV haut risque (QC2-HR) dans le puits de microplaque H1

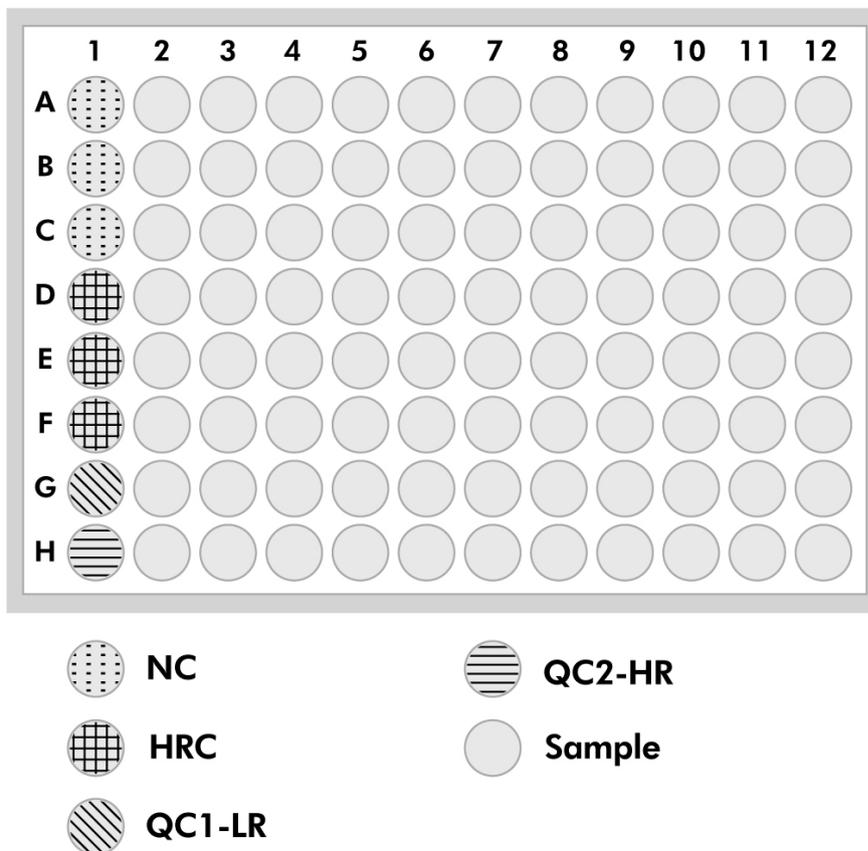


Figure 1. Position des étalons, des contrôles de qualité et des échantillons sur la microplaque.

Important : Lors de la réalisation d'une analyse automatique par RCS, utiliser les protocoles de test spécifiques au RCS pour créer le schéma de plaque et obtenir les résultats. Les paramètres définis pour les protocoles de test spécifiques au RCS sont différents de ceux établis dans les protocoles de test pour analyse manuelle (voir « Calculs de la valeur seuil », page 67).

2. Placer les étalons, les contrôles de qualité et les échantillons à tester dans un portoir pour tubes de prélèvement d'échantillon ou dans un portoir d'échantillons, dans l'ordre dans lequel ils seront testés.

Important : Lors de la réalisation d'une analyse automatique par RCS, il est impératif de faire correspondre le schéma de la plaque aux échantillons testés appropriés, afin d'éviter de consigner des résultats d'échantillon imprécis. Pour chaque portoir et couvercle d'échantillons utilisés, confirmer la correspondance des numéros de série et, le cas échéant, étiqueter chaque portoir et couvercle pour échantillons selon l'ordre d'analyse sur le RCS. Utiliser un feutre indélébile, résistant au bain-marie à 65 °C.

Préparation des échantillons

Les échantillons en solution PreservCyt et SurePath nécessitent une préparation des échantillons avant l'analyse avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Selon le type de préparation réalisé, les échantillons préparés sont prêts pour différentes étapes du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Les méthodes disponibles pour la préparation des échantillons sont les suivantes :

- Préparation automatique d'échantillons en solution PreservCyt à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media
- Préparation automatique d'échantillons en solution SurePath et préparation de culots cellulaires post-gradient à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media
- Préparation automatique d'échantillons en solution PreservCyt à l'aide du kit QIASymphony DSP AXpH DNA
- Préparation manuelle d'échantillons en solution PreservCyt
- Préparation manuelle d'échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath

Préparation d'échantillons en solution PreservCyt à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media

 Se référer à la notice d'instructions (au manuel) du kit QIASymphony DSP HPV Media (*QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use [Handbook]*) afin de connaître les instructions pour la préparation d'échantillons en solution PreservCyt à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media.

Important : Les extraits d'échantillons produits par la préparation d'échantillons en solution PreservCyt à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media ne peuvent être testés que sur le RCS. Les tests manuels des extraits d'échantillons n'ont pas été validés.

La préparation des échantillons en solution PreservCyt à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media fournit des extraits d'échantillons dans une microplaque d'hybridation dont la première colonne est vide. Les extraits d'échantillons contiennent des particules magnétiques, du milieu STM et du réactif DNR. Ils sont prêts pour l'analyse automatique par RCS à partir de l'étape de dénaturation. Les étalons, les contrôles de qualité et les extraits d'échantillons sont dénaturés au même moment dans la microplaque d'hybridation pendant l'analyse automatique par RCS (voir « Dénaturation et hybridation des échantillons préparés sur le QIASymphony SP », page 47).

 Lors de la réalisation d'une analyse automatique par RCS des échantillons préparés sur le QIASymphony SP, se référer au paragraphe relatif aux tests *digene* HC2 DNA des échantillons préparés sur le QIASymphony SP du manuel d'utilisation du Rapid Capture System (*Rapid Capture System User Manual — Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*) pour des instructions permettant d'effectuer l'analyse.

Préparation d'échantillons en solution SurePath et préparation de culots cellulaires post-gradient SurePath à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media

 Se référer à la notice d'instructions (au manuel) du kit QIASymphony DSP HPV Media (*QIASymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)*) afin de connaître les instructions pour la préparation d'échantillons en solution SurePath et d'échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media

Important : Les extraits d'échantillons produits par la préparation d'échantillons en solution SurePath à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media ne peuvent être testés que sur le RCS. Les tests manuels des extraits d'échantillons n'ont pas été validés.

Se référer à la notice d'instructions (au manuel) du kit QIAasymphony DSP HPV Media (*QIAasymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)*) afin de connaître les instructions pour la préparation d'échantillons en solution SurePath et d'échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath à l'aide du kit QIAasymphony DSP HPV Media

 Lors de la réalisation d'une analyse automatique par RCS des échantillons préparés sur le QIAasymphony SP, se référer au paragraphe relatif aux tests *digene* HC2 DNA des échantillons préparés sur le QIAasymphony SP du manuel d'utilisation du Rapid Capture System pour des instructions permettant d'effectuer l'analyse.

Préparation d'échantillons en solution PreservCyt à l'aide du kit QIAasymphony DSP AXpH DNA

 Se référer au manuel du kit QIAasymphony DSP AXpH DNA (*QIAasymphony DSP AXpH DNA Kit Handbook*) pour consulter les instructions sur la préparation d'échantillons en solution PreservCyt.

La préparation des échantillons en solution PreservCyt à l'aide du kit QIAasymphony DSP AXpH DNA fournit des éluats d'ADN dans une microplaque d'hybridation dont la première colonne est vide. Les éluats d'ADN sont prêts pour l'étape de dénaturation du test. Les étalons, les contrôles de qualité et les éluats d'ADN sont dénaturés en même temps dans la microplaque d'hybridation (voir « Dénaturation et hybridation des échantillons préparés sur le QIAasymphony SP », page 47).

Préparation manuelle d'échantillons en solution PreservCyt

 Se référer à la notice d'instructions du kit *digene* HC2 Sample Conversion pour la préparation manuelle d'échantillons en solution PreservCyt.

La préparation manuelle d'échantillons en solution PreservCyt à l'aide du kit *digene* HC2 Sample Conversion donne des échantillons prêts pour l'étape d'hybridation du test. Préparer séparément les étalons et les contrôles de qualité (voir « Dénaturation des étalons, des contrôles de qualité et des échantillons en milieu STM », page 50).

Préparation manuelle d'échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath

La préparation manuelle d'échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath donne des échantillons prêts pour l'étape d'hybridation du test. Préparer séparément les étalons et les contrôles de qualité (voir « Préparation manuelle d'échantillons en solution PreservCyt », page **Error! Bookmark not defined.**).

Important : Si le culot cellulaire post-gradient de l'échantillon en solution SurePath semble contenir moins de 1 ml, le culot cellulaire post-gradient ne convient pas à une analyse avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, dans la mesure où le liquide conservateur SurePath n'a pas été ajouté post-cytologie.

1. Laisser les culots cellulaires post-gradient SurePath revenir à température ambiante et s'assurer que le volume de liquide observé est bien de l'ordre de 2,8 ml.
2. Centrifuger les culots cellulaires post-gradient SurePath dans un rotor à godets oscillants à $800 \pm 15 \times g$ pendant 10 ± 1 minutes.
3. Retirer les tubes de la centrifugeuse.
4. Immédiatement après la centrifugation, décanter avec précautions le surnageant et sécher délicatement chaque tube à 3 reprises sur une lingette Kimtowels ou un papier absorbant non pelucheux équivalent pour éliminer l'excès de liquide. Vérifier la présence du culot dans chaque tube.

Important : Ne pas laisser le culot cellulaire glisser le long du tube lors du séchage sur le papier absorbant.

5. Placer les tubes dans le portoir.
6. Ajouter 200 µl de STM à chaque culot en utilisant une pipette à répétition ou une pipette monocanal.
7. Remettre en suspension chaque culot en vortexant chaque tube individuellement pendant 15 secondes à vitesse élevée.

Si le culot est difficile à remettre en suspension, vortexer pendant une période de temps supplémentaire de 5 à 30 secondes ou jusqu'à ce que le culot se détache et flotte sans effort du fond du tube et semble se dissoudre.

Remarque : Les tubes peuvent être mélangés sans être bouchés.

8. Ajouter 100 µl de réactif DNR à chaque échantillon SurePath en utilisant une pipette à répétition ou une pipette monocanal.

Important : Veiller à ne pas toucher les parois du tube, car cela pourrait entraîner une contamination croisée des échantillons.

9. Mélanger soigneusement chaque tube individuellement par vortexage à vitesse élevée, pendant 5 secondes.

Remarque : Les tubes peuvent être mélangés sans être bouchés.

10.Étiqueter des tubes *digene* HC2 Sample Conversion ou des tubes coniques de 15 ml avec l'identification et le type d'échantillon pertinents (par exemple, « SP » pour un échantillon en solution SurePath) et placer les tubes dans un portoir pour tubes.

Remarque : Pour une analyse automatique par RCS, il est impératif d'utiliser des tubes *digene* HC2 Sample Conversion.

11.Transférer tout le volume dans un tube conique de 15 ml adéquat à l'aide d'une pipette de transfert de 7 ml jetable, à pointe standard, ou équivalent.

12.Boucher les tubes coniques et les placer dans un portoir pour tubes.

13.Incuber les tubes dans un bain-marie à 65 ± 2 °C pendant 90 ± 5 minutes.

Remarque : Cette période d'incubation est plus longue que la période requise pour d'autres types d'échantillons approuvés.

Si l'analyse doit être réalisée le même jour, dénaturer les étalons et les contrôles de qualité (voir « Dénaturation des étalons, des contrôles de qualité et des échantillons en milieu STM », page 50).

14.Retirer le portoir de tubes du bain-marie une fois l'incubation terminée.

Si un portoir d'échantillons est utilisé, ne pas le laisser refroidir avant d'avoir retiré le couvercle. Procéder immédiatement à l'analyse ou retirer le couvercle du portoir et le film de scellage de tube DuraSeal.

Remarque : Si le portoir d'échantillons refroidit, les tubes risquent d'adhérer au couvercle du portoir et de provoquer ensuite des éclaboussures.

Les échantillons SurePath ainsi préparés peuvent être :

- testés immédiatement (aller à « Hybridation des échantillons en milieu STM préparés et des échantillons de culot cellulaire post-gradient PreservCyt et SurePath préparés manuellement », page 53)
- stockés (voir « Pause éventuelle pour les échantillons en milieu STM préparés et pour les échantillons de culot cellulaire post-gradient PreservCyt et SurePath préparés manuellement », page 52)

Dénaturation et hybridation des échantillons préparés sur le QIASymphony SP

La préparation d'échantillons sur le QIASymphony SP fournit une microplaque d'hybridation contenant au moins les échantillons préparés.

Si des échantillons en solution PreservCyt ont été préparés sur le QIASymphony SP, la première colonne de la microplaque d'hybridation est vide. Le contenu de la microplaque est prêt pour l'étape de dénaturation du test. Les étalons et les contrôles de qualité sont ajoutés à la microplaque d'hybridation soit manuellement, soit pendant l'analyse automatique par RCS. L'étape de dénaturation est ensuite exécutée.

Si des échantillons SurePath ou des échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath ont été préparés sur le QIASymphony SP, la plaque contient les échantillons préparés avec les étalons et les contrôles de qualité dénaturés pipetés dans la première colonne de la microplaque d'hybridation. Le contenu de la microplaque est prêt pour l'analyse automatique par RCS à l'étape d'hybridation.

Important: Les extraits d'échantillons produits par la préparation d'échantillons à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media ne peuvent être testés que sur le RCS. Les tests manuels des extraits d'échantillons n'ont pas été validés.

 Lors de la réalisation d'une analyse automatique par RCS des échantillons préparés sur le QIASymphony SP, se référer au paragraphe relatif aux tests *digene* HC2 DNA des échantillons préparés sur le QIASymphony SP du manuel d'utilisation du Rapid Capture System (*Rapid Capture System User Manual – Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*) pour des instructions permettant d'effectuer l'analyse.

Dénaturation des étalons, des contrôles de qualité et des éluats d'ADN pour l'analyse manuelle

- Cette procédure concerne l'analyse manuelle des échantillons en solution PreservCyt préparés avec le kit QIASymphony DSP AXpH DNA. En cas d'analyse automatique par RCS, se référer au paragraphe relatif aux tests *digene* HC2 DNA des échantillons préparés sur le QIASymphony SP du manuel d'utilisation du Rapid Capture System (*Rapid Capture System User Manual – Performing digene HC2 DNA Tests Using QIASymphony SP Processed Samples*) pour des instructions permettant d'effectuer l'analyse.
- La dénaturation des étalons et des contrôles de qualité est effectuée en utilisant le réactif DNR, tandis que la dénaturation des éluats d'ADN est effectuée en utilisant le réactif DNR2.

1. Mélanger au vortex chaque étalon et chaque contrôle de qualité pendant 10 secondes à puissance maximale.
2. Retourner chaque tube de manière à récupérer la matière située dans le bouchon du tube.
3. Enlever les couvercles des tubes d'étalon et de contrôles de qualité et les jeter.
4. À l'aide d'une pipette monocanal, ajouter 50 µl de l'étalon ou du contrôle de qualité adéquat au fond d'un puits vide de la microplaque d'hybridation selon le schéma de plaque créé.

Si l'étalon et les contrôles de qualité doivent être utilisés pour d'autres tests, reboucher les tubes avec de nouveaux bouchons à vis pour tube de prélèvement d'échantillons, inscrire la nouvelle date de péremption sur les étiquettes et conserver entre 2 et 8 °C.

Remarque : Les étalons et les contrôles de qualité ouverts et non dénaturés restent stables pendant 3 mois entre 2 et 8 °C.

5. Mélanger soigneusement au vortex les réactifs DNR et DNR2, puis transférer une fraction aliquote de chacun d'eux dans un réservoir jetable pour réactifs correctement étiqueté.

Important : Veiller à ajouter le réactif approprié à la colonne de microplaque d'éluats appropriée.

6. À l'aide d'une pipette à 8 canaux, ajouter 25 µl de réactif DNR dans la première colonne de la microplaque d'hybridation contenant les étalons et les contrôles de qualité.
7. Avec une pipette à 8 canaux, ajouter 25 µl de réactif DNR2 dans chaque puits de la microplaque d'hybridation contenant un éluat d'ADN.
8. Recouvrir la microplaque d'hybridation avec un couvercle de microplaque et agiter pendant 30 secondes sur le Rotary Shaker I réglé à 1.100 ± 100 tr/min.
9. Placer la microplaque dans le Microplate Heater I équilibré à 65 ± 2 °C, en veillant à éviter les éclaboussures. Incuber la microplaque d'hybridation pendant 45 ± 5 minutes.

Préparer le mélange de sondes requis au cours de cette incubation (voir « Mélange de sondes », page 38).

10. Retirer la microplaque d'hybridation du Microplate Heater I.

Les étalons, contrôles de qualité et éluats d'ADN dénaturés peuvent être :

- stockés (voir « Pause éventuelle pour les éluats d'ADN », page 49)
- testés immédiatement (aller au « Hybridation des éluats d'ADN », page 49)

Pause éventuelle pour les éluats d'ADN

Les éluats d'ADN dénaturés, comprenant les étalons et les contrôles de qualité, recouverts par un couvercle de microplaque, peuvent être stockés entre 2 et 8 °C pendant 2 semaines.

Hybridation des éluats d'ADN

1. Si une microplaque d'hybridation contenant les étalons, les contrôles de qualité et les éluats d'ADN dénaturés a été stockée, retirer le couvercle de la microplaque et laisser la microplaque d'hybridation s'équilibrer à une température de 20 à 25 °C.
2. Mélanger soigneusement au vortex le mélange de sondes et transférer une fraction aliquote dans un réservoir jetable pour réactifs.
3. Transférer délicatement 25 µl du mélange de sondes dans chaque puits de la microplaque d'hybridation en utilisant une pipette à 8 canaux et des embouts propres à chaque addition de mélange de sondes.

Éviter les éclaboussures et éviter de toucher les parois des puits de la microplaque d'hybridation.

4. Recouvrir la microplaque d'hybridation avec un couvercle de microplaque et agiter pendant 3 ± 2 minutes sur le Rotary Shaker I réglé à 1100 ± 100 tr/min.

Après l'agitation, les étalons, les contrôles de qualité et les éluats d'ADN doivent virer au jaune.

Les échantillons qui conservent une couleur violette peuvent ne pas avoir reçu la quantité appropriée de mélange de sondes. Ajouter une quantité supplémentaire de 25 µl de mélange de sondes aux échantillons présentant une couleur encore violette et agiter à nouveau. Si un échantillon présente encore une couleur violette à l'issue de cette procédure, recommencer l'analyse de l'échantillon.

5. Placer la microplaque dans le Microplate Heater I équilibré à 65 ± 2 °C, en veillant à éviter les éclaboussures. Incuber la microplaque d'hybridation pendant 60 ± 5 minutes.
6. Passer à l'étape « Capture des hybrides », page 57, pour poursuivre l'analyse.

Dénaturation et hybridation d'échantillons en milieu STM et d'échantillons de culot cellulaire post-gradient PreservCyt et SurePath préparés manuellement

- Lorsque des échantillons de culot cellulaire post-gradient PreservCyt et SurePath préparés manuellement sont analysés, l'étape de dénaturation n'est pas nécessaire pour les

échantillons. Toutefois, les étalons et les contrôles de qualité requis par le test sont dénaturés selon les instructions mentionnées ci-dessous.

- Certains échantillons en milieu STM peuvent contenir du sang ou d'autres substances biologiques susceptibles de masquer le changement de coloration lors de l'addition du réactif DNR. Les échantillons qui présentent une couleur sombre avant l'addition du réactif DNR peuvent ne pas présenter le changement de coloration adéquat à cette étape. Dans ce cas, l'impossibilité de détecter le changement de coloration adéquat n'affectera pas les résultats du test. Il est possible de vérifier que le mélange est convenable en observant le changement de coloration des étalons et des contrôles de qualité.

Dénaturation des étalons, des contrôles de qualité et des échantillons en milieu STM

- Ne pas retirer le dispositif de prélèvement d'échantillons du tube d'échantillon à n'importe quel moment.
- Pour éviter le risque de résultats faussement positifs, il est crucial que toutes les substances d'échantillons entrent en contact avec le réactif DNR. Le mélange effectué après l'addition du réactif DNR est une étape critique.
- Les échantillons en milieu STM dénaturés selon la méthode MST Vortexer 2 doivent suivre la méthode « Hybridation utilisant une microplaque et le Microplate Heater I » décrite en page 53. La méthode « Hybridation en utilisant des microtubes et un bain-marie » (page 55) n'a pas été validée avec les échantillons en milieu STM dénaturés au moyen de la méthode MST Vortexer 2.

1. Retirer et mettre au rebut les bouchons des tubes.

Important : Considérer les bouchons retirés des tubes d'échantillons en milieu STM comme potentiellement infectieux (voir « Avertissements et précautions », page 23, pour plus d'informations).

2. Pipeter le volume spécifié (voir le tableau 9, ci-dessous) de réactif DNR dans les tubes à l'aide d'une pipette à répétition ou d'une pipette réglable.

S'assurer de ne pas toucher les parois du tube, car cela pourrait entraîner une contamination croisée des échantillons.

Important : Les kits à 1 plaque et à 4 plaques fournissent des volumes d'étalon High-Risk HPV différents. Veiller à ajouter le volume correct de réactif DNR.

Remarque : Le volume de réactif DNR ajouté correspond à la moitié du volume de liquide contenu dans le tube.

Tableau 9. Ajout de réactif DNR

Étalon, contrôle de qualité ou échantillon en milieu STM	Volume de DNR requis
Étalon négatif, 2 ml	1000 µl
Étalon HPV haut risque, 1 ml	500 µl
Étalon HPV haut risque, 2 ml	1000 µl
Contrôle de qualité HPV bas risque ou haut risque, 1 ml	500 µl
Échantillon en milieu STM, 1 ml	500 µl

3. Mélanger les tubes soit selon la méthode MST Vortexer 2, soit selon la méthode manuelle de vortexage de tubes individuels.

Méthode MST Vortexer 2

- Recouvrir les tubes avec un film de scellage DuraSeal en étirant le film sur les tubes placés dans le portoir à échantillons.
- Placer le couvercle du portoir sur les tubes revêtus du film et le bloquer à l'aide des 2 pinces latérales. Découper le film avec le dispositif de coupe.
- Placer le levier à poignée rouge en position horizontale UP.
- Installer solidement le portoir d'échantillons dans les guides du MST Vortexer 2, le coin à encoche le plus grand du portoir étant situé dans le coin avant droit. Fixer le portoir d'échantillons en ramenant le levier à poignée rouge en position « basse » verticale.
- S'assurer que le réglage de la vitesse est sur 100 (vitesse maximale) et mettre le MST Vortexer 2 sous tension (ON).
- Vortexer les tubes pendant 10 secondes.
- Mettre le MST Vortexer 2 hors tension (OFF).
- Retirer le portoir d'échantillons du MST Vortexer 2 en relevant le levier à poignée rouge en position haute.

Méthode manuelle de vortexage de tubes individuels

- Reboucher les tubes avec de nouveaux bouchons à vis pour tubes de prélèvement d'échantillon.
- Mélanger soigneusement chaque tube individuellement par vortexage à vitesse élevée, pendant 5 secondes.
Important : Lors du mélange, on doit observer un vortex visible de liquide qui recouvre toute la surface interne du tube.
- Retourner chaque tube une fois pour laver l'intérieur du tube, le bouchon et le bord.
- Remettre les tubes dans le portoir.

Le liquide contenu dans le tube doit virer au violet.

4. Incuber les tubes disposés dans un portoir dans un bain-marie à 65 ± 2 °C pendant 45 ± 5 minutes.

Pour une analyse manuelle, préparer le mélange de sondes au cours de cette incubation (voir « Mélange de sondes », page 38).

5. Retirer les tubes du bain-marie une fois l'incubation terminée.

Si un portoir d'échantillons est utilisé, ne pas le laisser refroidir avant d'avoir retiré le couvercle. Procéder immédiatement à l'analyse ou retirer le couvercle du portoir et le film de scellage de tube DuraSeal.

Remarque : Si le portoir d'échantillons refroidit, les tubes risquent d'adhérer au couvercle du portoir et de provoquer ensuite des éclaboussures.

Les étalons, contrôles de qualité et échantillons en milieu STM dénaturés peuvent être :

- stockés (voir « Pause éventuelle pour les échantillons en milieu STM préparés et pour les échantillons de culot cellulaire post-gradient PreservCyt et SurePath préparés manuellement », page 52)
- testés immédiatement (aller à « Hybridation des échantillons en milieu STM préparés et des échantillons de culot cellulaire post-gradient PreservCyt et SurePath préparés manuellement », page 53)

Pause éventuelle pour les échantillons en milieu STM préparés et pour les échantillons de culot cellulaire post-gradient PreservCyt et SurePath préparés manuellement

Important : Ne pas stocker ou expédier des échantillons dénaturés sur de la carboglace.

Tous les échantillons préparés, y compris les étalons et les contrôles de qualité, peuvent être stockés entre 2 et 8 °C jusqu'au lendemain ou à -20 °C sur une période allant jusqu'à 3 mois. Il est possible d'effectuer 3 cycles de congélation/décongélation au maximum et de laisser les échantillons à température ambiante pendant 2 heures au maximum au cours de chaque cycle de décongélation.

Si un stockage est envisagé jusqu'au lendemain à une température de 2 à 8 °C dans le portoir d'échantillons, recouvrir les échantillons avec un film de scellage de tube DuraSeal et replacer le couvercle du portoir.

Si un stockage est envisagé à -20 °C dans le portoir d'échantillons, retirer le couvercle du portoir et le film de scellage de tube DuraSeal et placer un couvercle adéquat sur les tubes.

Hybridation des échantillons en milieu STM préparés et des échantillons de culot cellulaire post-gradient PreservCyt et SurePath préparés manuellement

 Pour réaliser une analyse automatique par RCS d'échantillons en milieu STM ou d'échantillons de culot cellulaire post-gradient PreservCyt et SurePath préparés manuellement, se référer au manuel d'utilisation du Rapid Capture System (*Rapid Capture System User Manual*) pour des instructions permettant d'effectuer l'analyse.

Si les étalons, les contrôles de qualité ou les échantillons dénaturés ont été stockés, les laisser s'équilibrer à une température de 20 à 25 °C et, s'ils ont été stockés dans un portoir d'échantillons, retirer et mettre au rebut les bouchons des tubes.

- Deux méthodes d'hybridation sont disponibles pour les échantillons en milieu STM préparés et les échantillons de culot cellulaire post-gradient PreservCyt et SurePath préparés manuellement : « Hybridation utilisant une microplaque et le Microplate Heater I » et « Hybridation utilisant des microtubes et un bain-marie. »
- Les échantillons en milieu STM dénaturés selon la méthode MST Vortexer 2 doivent suivre la méthode « Hybridation utilisant une microplaque et le Microplate Heater I » décrite en page 53. La méthode « Hybridation en utilisant des microtubes et un bain-marie » (page 55) n'a pas été validée avec les échantillons en milieu STM dénaturés au moyen de la méthode MST Vortexer 2.
- Le mélange de sondes est visqueux. S'assurer que le mélange de sondes a été soigneusement mélangé et que la quantité requise est complètement distribuée dans chaque puits de microplaque d'hybridation ou dans chaque microtube d'hybridation.
- Lors du transfert de l'échantillon dans la microplaque d'hybridation ou dans le microtube d'hybridation, éviter de toucher les parois des puits de microplaque d'hybridation ou des microtubes d'hybridation, car des résultats faussement positifs peuvent se produire si les échantillons ne sont pas correctement transférés. Limiter la formation de bulles d'air. Utiliser un embout de pipette extra-long et propre à chaque transfert pour éviter toute contamination croisée.

Hybridation utilisant une microplaque et le Microplate Heater I

1. Se procurer une microplaque d'hybridation et l'étiqueter.
2. Vortexer au moyen de l'une des méthodes suivantes :

Étalons, contrôles de qualité ou échantillons en milieu STM avec le MST Vortexer 2

- a. Selon le cas, recouvrir les tubes d'un film de scellage DuraSeal pour tube et fixer le couvercle de portoir sur le portoir d'échantillons.
- b. Mélanger le portoir d'échantillons par vortexage pendant au moins 5 secondes au réglage de vitesse maximal.
- c. Placer immédiatement le portoir d'échantillons sur la paillasse et libérer les fixations. Soulever le couvercle du portoir d'une hauteur de 1 cm environ et le remuer délicatement de gauche à droite pour dégager tous les tubes susceptibles d'avoir adhéré au film de scellage DuraSeal. Retirer le couvercle du portoir en le soulevant verticalement jusqu'à ce qu'il libère le portoir d'échantillons.
- d. Ôter délicatement le film de scellage DuraSeal du couvercle de portoir et le jeter.

Échantillons de culot cellulaire post-gradient PreservCyt ou SurePath avec la méthode MST Vortexer 2

- a. Selon le cas, recouvrir les tubes d'un film de scellage DuraSeal pour tube et fixer le couvercle de portoir sur le portoir d'échantillons.
- b. Vortexer le portoir de conversion pendant au moins 10 secondes au réglage de vitesse maximal.
- c. Placer immédiatement le portoir d'échantillons sur la paillasse et libérer les fixations. Soulever le couvercle du portoir d'une hauteur de 1 cm environ et le remuer délicatement de gauche à droite pour dégager tous les tubes susceptibles d'avoir adhéré au film de scellage DuraSeal. Retirer le couvercle du portoir en le soulevant verticalement jusqu'à ce qu'il libère le portoir d'échantillons.
- d. Ôtez délicatement le film de scellage DuraSeal du couvercle de portoir et jetez-le.

Type d'échantillon quelconque avec agitateur à vortex

- a. Vortexer chaque tube individuellement pendant au moins 5 secondes
3. Au moyen de la pipette EXPAND-4 ou d'une pipette monocanal munie d'un embout extra-long, transférer 75 µl de chaque solution d'étalon, de contrôle de qualité ou d'échantillon au fond d'un puits vide d'une microplaque d'hybridation selon le schéma de plaque créé.

S'il est prévu de stocker les échantillons, boucher les étalons, les contrôles de qualité et les échantillons en milieu STM dénaturés en utilisant de nouveaux bouchons à vis pour tube de prélèvement d'échantillon, et remettre le bouchon d'origine de chaque échantillon de culot cellulaire post-gradient PreservCyt et SurePath.

Remarque : Stocker les échantillons dans les limites décrites dans « Pause éventuelle pour les échantillons en milieu STM préparés et pour les échantillons de culot cellulaire post-gradient PreservCyt et SurePath préparés manuellement », page 52.

4. Après avoir transféré le dernier échantillon, recouvrir la microplaque d'hybridation avec un couvercle de microplaque et incuber pendant 10 minutes à une température de 20 à 25 °C.
5. Mélanger soigneusement au vortex le mélange de sondes et transférer une fraction aliquote dans un réservoir jetable pour réactifs.
6. Transférer délicatement 25 µl du mélange de sondes dans chaque puits de la microplaque d'hybridation en utilisant une pipette à 8 canaux et des embouts propres à chaque addition de mélange de sondes.

Éviter les éclaboussures et éviter de toucher les parois des puits de la microplaque d'hybridation.

7. Recouvrir la microplaque d'hybridation avec un couvercle de microplaque et agiter pendant 3 ± 2 minutes sur le Rotary Shaker I réglé à 1100 ± 100 tr/min.

Une fois l'agitation terminée, les étalons, les contrôles de qualité, les échantillons en milieu STM et les échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath doivent virer au jaune et les échantillons en solution PreservCyt doivent virer au rose.

Les échantillons qui conservent une couleur violette peuvent ne pas avoir reçu la quantité appropriée de mélange de sondes. Ajouter une quantité supplémentaire de 25 µl de mélange de sondes aux échantillons présentant une couleur encore violette et agiter à nouveau. Si un échantillon présente encore une couleur violette à l'issue de cette procédure, recommencer l'analyse de l'échantillon.

8. Placer la microplaque dans le Microplate Heater I équilibré à 65 ± 2 °C, en veillant à éviter les éclaboussures. Incuber la microplaque d'hybridation pendant 60 ± 5 minutes.
9. Passer à l'étape « Capture des hybrides », page 57, pour poursuivre l'analyse.

Hybridation en utilisant des microtubes et un bain-marie

1. Étiqueter et placer le nombre requis de microtubes d'hybridation propres dans le portoir de microtubes.
2. Vortexer chaque tube d'étalon, de contrôle de qualité et d'échantillon individuellement pendant au moins 5 secondes avant de retirer l'échantillon.
3. Au moyen d'une pipette monocanal munie d'un embout extra-long, transférer 75 µl de chaque solution d'étalon, de contrôle de qualité ou d'échantillon au fond du microtube d'hybridation adéquat selon le schéma de plaque créé.

S'il est prévu de stocker les échantillons, boucher les étalons, les contrôles de qualité et les échantillons en milieu STM dénaturés en utilisant de nouveaux bouchons à vis pour tube de prélèvement d'échantillon, et remettre le bouchon d'origine de chaque échantillon en solution PreservCyt et SurePath.

Remarque : Stocker les échantillons dans les limites décrites dans « Pause éventuelle pour les échantillons en milieu STM préparés et pour les échantillons de culot cellulaire post-gradient PreservCyt et SurePath préparés manuellement », page 52.

4. Après avoir transféré le dernier échantillon, incuber les microtubes d'hybridation pendant 10 minutes à une température de 20 à 25 °C.
5. Mélanger soigneusement au vortex le mélange de sondes et transférer une fraction aliquote dans un réservoir jetable pour réactifs.
6. Transférer délicatement 25 µl du mélange de sondes dans chaque microtube d'hybridation en utilisant une pipette à 8 canaux et des embouts propres pour chaque rangée.
Éviter les éclaboussures et éviter de toucher les parois des microtubes d'hybridation.

Inspecter le portoir par dessous pour s'assurer que tous les microtubes d'hybridation ont reçu la quantité adéquate de mélange de sondes.

7. Recouvrir les microtubes d'hybridation avec un film de scellage de plaque. Placer le couvercle du portoir sur ce dernier. Agiter le portoir de microtubes pendant 3 ± 2 minutes sur le Rotary Shaker I réglé à 1100 ± 100 tr/min.

Une fois l'agitation terminée, les étalons, les contrôles de qualité, les échantillons en milieu STM et les échantillons en solution SurePath doivent virer au jaune et les échantillons en solution PreservCyt doivent virer au rose.

Les échantillons qui conservent une couleur violette peuvent ne pas avoir reçu la quantité appropriée de mélange de sondes. Ajouter une quantité supplémentaire de 25 µl de mélange de sondes aux échantillons présentant une couleur encore violette et agiter à nouveau. Si un échantillon présente encore une couleur violette à l'issue de cette procédure, recommencer l'analyse de l'échantillon.

8. Incuber le portoir de microtubes pendant 60 ± 5 minutes dans un bain-marie réglé à 65 ± 2 °C.

S'assurer que le niveau d'eau du bain-marie soit suffisant pour couvrir tout le volume des microtubes d'hybridation.

Remarque : Le portoir de microtubes flottera dans le bain-marie.

9. Passer à l'étape « Capture des hybrides », page 57, pour poursuivre l'analyse.

Capture des hybrides

1. Retirer du cadre de la microplaque tous les puits de microplaque de capture qui ne sont pas nécessaires.
2. Replacer dans le sac d'origine les puits de microplaque de capture inutilisés et refermer ce dernier hermétiquement.
3. Numéroté chaque colonne de manière séquentielle au stylo-feutre et étiqueter la microplaque de capture avec l'identifiant adéquat.

Les échantillons seront ajoutés dans les puits de la microplaque de capture selon le schéma de plaque créé.

4. Le cas échéant, retirer avec précautions la microplaque d'hybridation du Microplate Heater I ou le portoir de microtubes du bain-marie.

Ôter immédiatement le couvercle de la microplaque et le placer sur une surface propre ou ôter le couvercle du portoir et retirer lentement le film de scellage de plaque sur toute la largeur du portoir de microtubes.

5. Au moyen d'une pipette à 8 canaux, transférer l'intégralité du contenu (environ 100 µl) des puits de la microplaque d'hybridation ou des microtubes d'hybridation au fond des puits correspondants de la microplaque de capture.

Changer d'embouts de pipette à chaque transfert et laisser chaque embout de pipette se vider pour s'assurer du transfert complet des échantillons. S'il y a lieu, la pipette peut être stabilisée en laissant reposer la partie centrale des embouts de pipette sur le bord supérieur des puits de la microplaque de capture (voir Figure 2, ci-dessous).

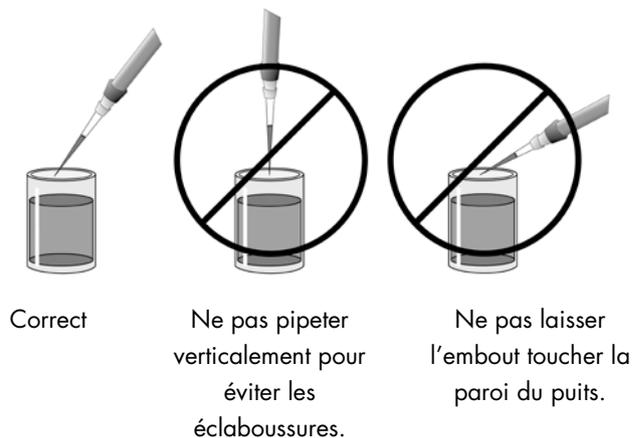


Figure 2. Pipetage correct.

6. Recouvrir la microplaque de capture avec un couvercle de microplaque ou en utilisant un nouveau film de scellage de plaque et agiter pendant 60 ± 5 minutes sur le Rotary Shaker I à $1\ 100 \pm 100$ tr/min à une température de 20 à 25 °C.

Préparer le tampon de lavage au cours de cette incubation (voir « Tampon de lavage », page 39).

7. Une fois l'incubation achevée, retirer la microplaque de capture du Rotary Shaker I et retirer délicatement le couvercle de la microplaque ou le film de scellage de la plaque.
8. Éliminer le liquide des puits de la microplaque de capture en le vidant dans un évier ; retourner complètement la microplaque de capture au-dessus l'évier et la secouer violemment selon un mouvement de haut en bas.

Important : Ne pas retourner à nouveau la microplaque.

Veiller à ne pas provoquer d'éclaboussures en vidant trop près du fond de l'évier.

9. Assécher en heurtant fermement la plaque 2 à 3 fois sur des lingettes KimTowels propres ou sur un papier absorbant équivalent non pelucheux.

S'assurer que tout le liquide a été éliminé des puits de la microplaque de capture et que la partie supérieure de la microplaque de capture est sèche.

10. Passer à l'étape « Détection des hybrides », page 59, pour poursuivre l'analyse.

Détection des hybrides

- Effectuer les additions de réactif en travers de la microplaque de capture de gauche à droite en utilisant une pipette à 8 canaux. Essuyer les embouts sur le réservoir jetable pour réactifs, afin d'éliminer tout réactif en excès avant d'effectuer la distribution dans la microplaque.
 - Il est possible d'utiliser une pipette à répétition à la place d'une pipette à 8 canaux. Transférer la fraction aliquote de réactif DR1 dans un tube de polypropylène suffisamment gros pour contenir le volume requis.
 - La méthode de pipetage inversé est recommandée pour obtenir une distribution constante de réactif. La procédure est décrite ci-dessous.
 - Le cas échéant, la pipette peut être stabilisée en laissant reposer la partie centrale des embouts de pipette sur le bord supérieur des puits de la microplaque de capture. Pour éviter une contamination croisée des échantillons, s'assurer que la pipette ne touche pas la surface interne des puits de la microplaque de capture (voir Figure 2, page 57).
1. Mélanger vigoureusement le réactif DR1 et transférer avec précautions le volume adéquat (selon le cas, voir le Tableau 1, page 35, ou le Tableau 4, page 36) dans un réservoir jetable propre pour réactifs.
 2. Transférer avec précautions 75 µl de réactif DR1 dans chaque puits de la microplaque de capture en utilisant la technique de pipetage inversé, de la manière suivante :
 - a. Charger une pipette à 8 canaux avec des embouts ; s'assurer que tous les embouts sont fermement engagés.
 - b. Pousser le piston de la pipette au-delà du premier cran, jusqu'au second cran.
 - c. Immerger les embouts dans le réactif.
 - d. Relâcher lentement le piston de manière à remplir les embouts de réactif.
 - e. Distribuer le réactif dans les puits de microplaque en appuyant sur le piston jusqu'au premier cran. Ne pas relâcher le piston avant que les embouts de pipette n'aient été immergés dans le réactif.
 - f. Remplir à nouveau les embouts et recommencer l'opération jusqu'à ce que les puits de la microplaque soient remplis.

S'assurer que tous les puits de la microplaque de capture ont été remplis en observant l'intensité de la coloration rose. Tous les puits de la microplaque de capture doivent présenter une couleur rose de même intensité.

3. Recouvrir la microplaque de capture avec un couvercle, un film propre de Parafilm ou équivalent, et incubé pendant 30 à 45 minutes à une température de 20 à 25 °C.
4. Passer à l'étape « Lavage », page 60, pour poursuivre l'analyse.

Lavage

Laver la microplaque de capture en utilisant l'une des méthodes présentées ci-dessous.

Méthode utilisant le laveur automatique de plaques

Toujours maintenir le laveur automatique de plaques sous tension (ON). S'assurer que le réservoir de rinçage est rempli et que le réservoir des déchets est vide. Le laveur Automated Plate Washer amorcera régulièrement la procédure d'entretien. Pour obtenir des instructions supplémentaires, se référer au manuel d'utilisation du laveur Automated Plate Washer (*Automated Plate Washer User Manual*).

- S'assurer que le réservoir de lavage soit rempli de tampon de lavage au moins jusqu'au repère indiquant 1 litre. Dans le cas contraire, préparer le tampon de lavage (voir « Tampon de lavage », page 39).
 - S'assurer que le réservoir de rinçage est rempli d'eau désionisée ou distillée.
 - S'assurer que le réservoir des déchets est vide et que le bouchon est hermétiquement fermé.
 - Le laveur Automated Plate Washer s'amorcera automatiquement avant chaque lavage et effectuera un rinçage après chaque lavage.
 - En cas d'utilisation partielle d'une barrette de puits de microplaque de capture, placer les puits vides de la microplaque dans la microplaque de capture pour compléter la colonne avant d'effectuer le lavage.
1. Retirer le couvercle de la microplaque et placer la microplaque de capture sur la plateforme du laveur Automated Plate Washer.
 2. Vérifier que le laveur Automated Plate Washer est sous tension et qu'il affiche le message **Digene Wash Ready** (Prêt pour lavage) ou **P1**.
 3. Sélectionner le nombre de barrettes qui doivent être lavées en appuyant sur le bouton **Rows** (Rangées), puis ajuster avec **+** ou **-**.
 4. Appuyer sur le bouton **Rows** pour revenir à l'affichage **Digene Wash Ready** ou **P1**.
 5. Appuyer sur le bouton **Start/Stop** (Démarrer/Arrêter) pour commencer la procédure.

Le laveur Automated Plate Washer effectuera 6 cycles de remplissage-aspiration qui prendront environ 10 minutes. Durant cette période, il s'arrêtera brièvement; mais il conviendra de ne pas retirer la microplaque prématurément.

Lorsque le lavage sera terminé, le laveur Automated Plate Washer affichera le message « **Digene Wash Ready** » ou « **P1** ».

6. Retirer la microplaque de capture de la plateforme du laveur automatique de plaques une fois le programme terminé.

La microplaque de capture doit être de couleur blanche, sans liquide résiduel rose dans les puits de la microplaque.

7. Passer à l'étape « Amplification du signal », page 63, pour poursuivre l'analyse.

Méthode de lavage manuel

1. Éliminer le réactif DR1 des puits de la microplaque de capture en plaçant des lingettes Kimtowels propres ou un papier absorbant équivalent non pelucheux sur la microplaque de capture.

2. S'assurer que le papier absorbant est en contact avec toute la surface de la microplaque de capture et la retourner avec précautions.

3. Laisser la microplaque de capture s'égoutter pendant 1 à 2 minutes.

4. La sécher correctement sur des lingettes KimTowels propres ou un papier absorbant équivalent non pelucheux.

Avec précautions, jeter le papier absorbant pour éviter toute contamination par de la phosphatase alcaline.

5. À l'aide de l'appareil de lavage, laver manuellement la microplaque de capture à 6 reprises.

Pour un lavage efficace, inonder chaque puits de la microplaque de capture avec le tampon de lavage. Cette opération éliminera la solution de DR1 des parties supérieures des puits de la microplaque de capture. Le lavage démarre au niveau du puits de microplaque de capture A1 et se poursuit en serpentant de gauche à droite et de haut en bas. Après que tous les puits de la microplaque de capture ont été remplis, décanter le liquide dans l'évier par un mouvement brusque de haut en bas. Le second lavage démarre au niveau du puits de microplaque de capture H12 en serpentant de droite à gauche et de bas en haut. Recommencer cette séquence de 2 lavages à 2 reprises jusqu'à un total de 6 lavages par puits de microplaque de capture. Le second lavage démarre au niveau du puits de microplaque de capture H12 en serpentant de droite à gauche et de bas en haut. Recommencer cette séquence de 2 lavages à 2 reprises jusqu'à un total de 6 lavages par puits de microplaque de capture.

-
6. Après le lavage, sécher la microplaque de capture en la retournant sur des lingettes KimTowels propres ou sur un papier absorbant équivalent non pelucheux, puis la heurter fermement 3 à 4 fois. Changer le papier absorbant et sécher à nouveau.
 7. Laisser la microplaque de capture s'égoutter à l'envers pendant 5 minutes. Sécher la microplaque de capture une dernière fois.
La microplaque de capture doit être de couleur blanche, sans liquide résiduel rose dans les puits de la microplaque.
 8. Passer à l'étape « Amplification du signal », page 63, pour poursuivre l'analyse.

Amplification du signal

- Utiliser une nouvelle paire de gants pour manipuler le réactif DR2.
- Effectuer les additions de réactif sur toute la microplaque de capture, en progressant de gauche à droite, en utilisant une pipette à 8 canaux.
- Il est possible d'utiliser une pipette à répétition à la place d'une pipette à 8 canaux. Transférer la fraction aliquote de réactif DR2 dans un tube de polypropylène suffisamment gros pour contenir le volume requis.
- Ajouter la solution de DR2 sans interruption. Dans la mesure du possible, la durée d'incubation doit être la même pour tous les puits de la microplaque de capture.
- Veiller à ne pas toucher les parois des puits de la microplaque de capture ou à ne pas éclabousser le réactif sur les embouts de pipette en raison de risques éventuels de contamination croisée des échantillons (voir la Figure 2, page 57).

1. Mélanger vigoureusement le réactif DR2 et transférer le volume adéquat (selon le cas, voir le Tableau 1, page 35, ou le Tableau 4, page 36) dans un réservoir jetable propre pour réactifs.
2. Distribuer avec soin 75 µl de réactif DR2 dans chaque puits de la microplaque de capture en utilisant la technique de pipetage inversé décrite antérieurement (voir « Détection des hybrides », page 59).

S'assurer que tous les puits de la microplaque de capture ont été correctement remplis en observant l'intensité de la couleur jaune ; tous les puits de la microplaque de capture doivent présenter une coloration jaune de même intensité.

3. Recouvrir la microplaque de capture avec un couvercle et incubé à une température de 20 à 25 °C pendant 15 minutes (sans aller au-delà de 30 minutes d'incubation).

Important : Éviter toute exposition à la lumière solaire directe.

4. Passer à l'étape « Mesure de la microplaque de capture et production des résultats », page 64, pour poursuivre l'analyse.

Mesure de la microplaque de capture et production des résultats

1. Mesurer la microplaque de capture en utilisant un luminomètre DML.

Se reporter au manuel d'utilisation du logiciel utilisé pour les détails sur la mesure d'une microplaque de capture et la génération des rapports de résultats de tests. Le logiciel d'analyse *digene* assay analysis software permettra d'entrer des informations de test pertinentes.

2. Si une microplaque de capture n'a pas été utilisée dans son intégralité, retirer les puits de microplaque de capture utilisés du cadre de microplaque, rincer le cadre de microplaque abondamment avec de l'eau distillée ou désionisée, sécher et conserver pour le prochain test.

3. Jeter toutes les fractions aliquotes de réactifs et tous les réactifs préparés, sauf spécification contraire.

Diluer le réactif DNR résiduel dans le flacon avant la mise au rebut selon les procédures de laboratoire nationales et locales.

Interprétation des résultats

La valeur seuil (CO) du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA de 1 pg/ml est équivalente à 100.000 copies de HPV/ml ou à 5.000 copies de HPV par test.

Résultats d'analyse d'échantillons en milieu STM

Les échantillons en milieu STM présentant un rapport RLU/CO $\geq 1,0$ sont considérées comme « positive » (positifs) pour 1 ou plusieurs HPV de types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68.

Les échantillons en milieu STM présentant un rapport RLU/CO $< 1,0$ sont considérés comme « negative » (négatifs) ou « no HPV DNA detected » (pas détectés) pour les 13 types de HPV testés. Les séquences d'ADN de HPV à haut risque sont absentes ou en quantité inférieure à la limite de détection du test.

Résultats d'analyse d'échantillons en solution SurePath

Les échantillons en solution SurePath présentant un rapport RLU/CO $\geq 1,0$ sont considérés comme « positive » (positifs) pour 1 ou plusieurs HPV de types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68.

Les échantillons en solution SurePath présentant un rapport RLU/CO $< 1,0$ sont considérés comme « negative » (négatifs) ou « no HPV DNA detected » (pas détectés) pour les 13 types de HPV testés. Les séquences d'ADN de HPV sont absentes ou en quantité inférieure à la limite de détection du test.

Résultats d'analyse d'échantillons en solution PreservCyt

Les échantillons en solution PreservCyt présentant un rapport RLU/CO $\geq 1,0$ sont considérés comme « positive » (positifs) pour 1 ou plusieurs HPV de types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68.

Les échantillons en solution PreservCyt présentant un rapport RLU/CO $< 1,0$ sont considérés comme « negative » (négatifs) ou « no HPV DNA detected » (pas détectés) pour les 13 types de HPV testés. Les séquences d'ADN de HPV sont absentes ou en quantité inférieure à la limite de détection du test.

Pour les échantillons en solution PreservCyt présentant un rapport RLU/CO $\geq 1,0$ et $< 2,5$, QIAGEN recommande de tester à nouveau les échantillons en procédant comme suit :

- Si le premier test renouvelé donne un rapport RLU/CO $\geq 1,0$, consigner l'échantillon comme « positive » (positif). Aucun autre test n'est requis.
- Si le premier test renouvelé donne un rapport RLU/CO $< 1,0$, il est nécessaire de recommencer une seconde fois le test (troisième résultat). Le second résultat est le résultat final (une valeur $< 1,0$ est négative, une valeur $\geq 1,0$ est positive) qui est consigné.

Valeur RLU/CO de l'ordre de 1,0

Si la valeur RLU/CO d'un échantillon est proche, mais inférieure, de 1,0 et qu'une infection à HPV à haut risque est suspectée, envisager d'autres méthodes d'analyse et/ou recommencer la préparation de l'échantillon.

Autres types de HPV

Étant donné que ce test ne détecte que les types de HPV à haut risque 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68, il convient de garder à l'esprit que d'autres types de HPV à bas risque peuvent être présents dans l'échantillon. Si l'analyse porte spécifiquement sur la présence de HPV à bas risque transmissible par voie sexuelle, utiliser le test *digene* HC2 HPV DNA, qui détecte les types d'ADN de HPV à bas risque et à haut risque.

Vérification de l'étalonnage de l'essai

La vérification de l'étalonnage de l'essai est effectuée pour garantir la fiabilité des réactifs, des étalons et des contrôles de qualité, ce qui permet une détermination précise de la CO de l'essai. Le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA requiert un étalonnage d'essai à chaque test ; il est donc nécessaire de vérifier chaque essai. Cette procédure de vérification d'essai n'est pas destinée à se substituer aux tests internes de contrôle de qualité. Des plages acceptables pour l'étalonnage de l'essai et les contrôles de qualité ont été établies uniquement pour les instruments DML agréés par QIAGEN.

des données. Cependant, les utilisateurs dotés de la version logicielle *digene* Qualitative Software version 1.03 ou d'une version antérieure doivent effectuer la vérification de l'étalonnage de l'essai manuellement avant de pouvoir consigner les résultats des patientes. Pour plus d'informations, contacter les Services techniques de QIAGEN.

Le test doit satisfaire des critères de vérification d'étalonnage de l'essai. Si l'un quelconque des critères suivants n'est pas valide, le logiciel n'interprétera pas les résultats des échantillons.

Étalon négatif

Le NC doit être testé en triplicat à chaque test. La moyenne des NC doit être ≥ 10 et ≤ 250 RLU et le coefficient de variation (CV) doit être $\leq 25\%$. Si le CV est $> 25\%$, le logiciel élimine la valeur RLU la plus éloignée de la moyenne comme valeur aberrante et recalcule la moyenne et le CV en utilisant les valeurs restantes.

Si le CV présente encore une valeur $> 25\%$, l'étalonnage de l'essai n'est pas valide et le test doit être recommencé pour tous les échantillons des patientes. En conséquence, les résultats des échantillons des patientes ne doivent pas être consignés.

Étalon positif

Le HRC doit être testé en triplicat à chaque test. Le CV du HRC doit être $\leq 15\%$. Si le CV est $> 15\%$, le logiciel élimine la valeur RLU la plus éloignée de la moyenne comme valeur aberrante et recalcule la moyenne et le CV en utilisant les valeurs restantes.

Si le CV présente encore une valeur $> 15\%$, l'étalonnage de l'essai n'est pas valide et le test doit être recommencé pour tous les échantillons des patientes. En conséquence, les résultats des échantillons des patientes ne doivent pas être consignés.

Moyenne de l'étalon positif /moyenne de l'étalon négatif

Le logiciel utilise le \overline{HRCX} et le \overline{NCX} pour calculer le rapport $\overline{HRCX}/\overline{NCX}$. Un rapport $\overline{HRCX}/\overline{NCX}$ valide est défini par la formule $2,0 \leq \overline{HRCX}/\overline{NCX} \leq 15$.

Si le rapport $\overline{HRCX}/\overline{NCX}$ est $< 2,0$ ou > 15 , l'étalonnage de l'essai n'est pas valide et le test doit être recommencé pour tous les échantillons de patientes. En conséquence, les résultats des échantillons des patientes ne doivent pas être consignés.

Calculs de la valeur seuil

Le logiciel d'analyse *digene* assay analysis software calcule et enregistre les valeurs RLU/CO et les résultats positifs/négatifs de tous les échantillons. La valeur CO permettant de déterminer les échantillons positifs est le \overline{HRCX} . Le logiciel d'analyse *digene* assay analysis software utilise les

valeurs RLU des échantillons pour exprimer les résultats sous la forme d'un rapport RLU/CO des échantillons.

Pour une analyse automatique par RCS, le protocole de test HPV par RCS applique un facteur d'ajustement d'étalonnage (CAF) de 0,8 au HRC \bar{X} valide. Ce CAF est nécessaire pour que les caractéristiques de performance de l'analyse automatique par RCS restent équivalentes à celles de l'analyse manuelle. Le CAF est uniquement appliqué aux résultats de test automatique par RCS ; il est donc essentiel de sélectionner le protocole d'essai approprié pour générer des résultats de test exacts.

Contrôles de qualité

Des échantillons de contrôle de qualité sont fournis avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA et doivent être utilisés pour le contrôle qualité interne. Les contrôles de qualité fournis sont des cibles d'ADN de HPV cloné et ne sont pas dérivés du HPV de type sauvage. Ces produits sont du même type que ceux utilisés pour les étalons fournis. Des contrôles de qualité supplémentaires peuvent être testés en fonction des directives ou exigences de réglementations nationales ou locales ou d'organisations d'accréditation. Les contrôles de qualité fournis ne seront pas utilisés comme contrôle de qualité approprié pour le traitement de la solution PreservCyt ou du liquide conservateur SurePath.

Consulter le manuel d'utilisation pertinent pour le logiciel d'analyse *digene* assay analysis software pour obtenir des instructions sur la manière d'entrer les numéros de lots et les dates d'expiration des contrôles de qualité. Pour qu'un essai soit valide, le rapport RLU/CO de chaque contrôle de qualité doit répondre aux critères définis, tels que spécifiés dans le tableau 10 présenté ci-dessous.

Si les contrôles de qualité n'entrent pas dans ces plages, l'essai n'est pas valide et le test doit être recommencé. En conséquence, les résultats des patientes ne doivent pas être consignés.

Tableau 10. Critères de validité d'essai des contrôles de qualité

Contrôle de qualité	Minimum (RLU/CO)	Maximum (RLU/CO)	CV (%)
QC1-LR	0.001	0.999	≤25
QC2-HR	2	8	≤25

Limites

- Le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA pour les HPV de types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68 n'est pas recommandé pour évaluer les cas de présomption d'abus sexuel.
- La prévalence d'une infection à HPV dans une population peut affecter les performances du test. Les valeurs prédictives positives diminuent lorsque l'on teste des populations à faible prévalence ou des personnes ne présentant pas de risque d'infection.
- Un résultat de test négatif n'exclut pas la possibilité d'une infection à HPV, car une infection très faible ou une erreur d'échantillonnage peuvent engendrer un résultat faussement négatif. De plus, ce test ne détecte pas l'ADN des HPV à bas risque (types 6, 11, 42, 43 et 44).
- Une infection à HPV en elle-même n'indique pas automatiquement la présence de lésions cervicales de haut grade, ni ne suggère de manière certaine que des lésions de haut grade ou un cancer se développeront.
- Une réaction croisée faible existe entre la sonde de HPV haut risque et les HPV de types 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 et MM9. Les patientes dont les échantillons contiennent des niveaux élevés de ces types de HPV peuvent être orientées à tort vers un examen coloscopique (15, 35).
- Le but du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA est de détecter des types de HPV à haut risque, notamment les types 39, 58, 59 et 68. Des études analytiques réalisées par QIAGEN et utilisant de l'ADN plasmidique de HPV cloné démontrent que ce test détecte ces types de HPV à des concentrations dans la plage de 0,62 pg/ml à 1,39 pg/ml. Ce résultat est équivalent aux caractéristiques de détection des autres types de HPV ciblés par le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. QIAGEN a pu valider la détection de ces types de HPV uniquement sur un nombre limité d'échantillons cliniques. En raison de la faible prévalence de ces types de HPV dans la population générale (28), les caractéristiques de performance du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA dans la détection des HPV de types 39, 58, 59 et 68 n'ont pas été confirmées sur le plan statistique.
- Si des concentrations élevées de crème antifongique, de gel contraceptif ou de produit de douche intime sont présentes lors du prélèvement de l'échantillon en milieu STM pour l'analyse, il existe une probabilité d'obtenir un résultat faussement négatif lorsque ces échantillons contiennent des niveaux d'ADN de HPV produisant des valeurs RLU/CO proches de la valeur de CO de l'essai.
- Si des concentrations élevées de crème antifongique, de gel lubrifiant vaginal ou de sang sont présentes lors du prélèvement de l'échantillon cervical en solution PreservCyt pour la préparation d'échantillons avec le kit QIASymphony DSP HPV Media, il existe un risque

d'obtenir un résultat faussement négatif lorsque ces échantillons contiennent des niveaux d'ADN de HPV produisant des valeurs RLU/CO proches de la valeur de CO de l'essai.

- En cas de présence de gel contraceptif au moment du prélèvement d'un échantillon cervical en solution PreservCyt pour une préparation d'échantillons avec le kit QIAasymphony DSP AXpH DNA, il est possible d'obtenir un résultat de test faussement négatif.
- En cas de présence de gel contraceptif, de crème antifongique ou de crème anti-inflammatoire au moment du prélèvement d'un échantillon cervical en solution SurePath pour une préparation d'échantillons avec le kit QIAasymphony DSP HPV Media, il est possible d'obtenir un résultat de test faussement négatif.
- Une réactivité croisée est possible entre la sonde HPV haut risque et le plasmide pBR322. La présence de séquences homologues du plasmide pBR322 a été décrite dans des échantillons génitaux humains et des résultats faussement positifs peuvent être obtenus en présence de niveaux élevés de plasmide bactérien.
- Lors de la réalisation d'une analyse automatique par RCS, le fait de ne pas voir la plaque d'hybridation pour s'assurer du transfert correct d'échantillon et le fait de ne pas pouvoir corriger tout transfert inadéquat d'échantillon peuvent engendrer des résultats faussement négatifs.

Caractéristiques de performance

Performances cliniques lors du dépistage de patientes présentant des résultats de frottis cervical normaux comme aide dans l'évaluation du risque pour la prise en charge de la patiente

Les résultats de 8 études cliniques indépendantes menées par des établissements médicaux, académiques et gouvernementaux de renom dans des centres aux États-Unis et ailleurs sont décrits ci-dessous. Ces études ont employé les méthodes de frottis cervical en vigueur dans les pays où l'étude a été menée. Dans tous les cas, excepté 2, le système Bethesda Grading System a été utilisé pour interpréter les résultats de frottis cervical. Pour une terminologie équivalente de dépistage du cancer cervical dans la Communauté européenne, se référer aux directives européennes relatives à l'assurance de qualité de dépistage du cancer du col utérin (36). De plus, le diagnostic de lésions cervicales de haut grade a été réalisé en utilisant la biopsie sous contrôle colposcopique pour chaque étude. Ces études ont évalué l'utilité clinique du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA par comparaison au frottis cervical chez les femmes plus âgées (en général de plus de 30 ans). On a également procédé dans toutes les études, excepté une, à une analyse prospective du HPV en utilisant le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Les études étaient des études transversales de dépistage en population générale utilisant le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, sauf spécifications contraires indiquées ci-dessous. Deux de ces

études ont été réalisées aux États-Unis, 2 en Europe, 2 en Amérique latine, une en Afrique et une en Asie.

Les performances du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA observées lors de 6 études transversales sont résumées (voir les tableaux 11 et 12, ci-dessous) pour des femmes âgées de 30 ans et plus, chez lesquelles a été diagnostiqué une néoplasie cervicale de haut grade confirmée par histologie et définie comme une néoplasie intra-épithéliale cervicale (CIN) de grade 3 ou de grade plus sévère.

Tableau 11. Estimations de performance – sensibilité et spécificité

Population	n	Sensibilité (%)			Spécificité (%)		
		(n/N)			(n/N)		
		Intervalle de confiance (IC) à 95 %					
	Frottis cervical seul	HPV seul	HPV + frottis cervical	Frottis cervical seul	HPV seul	HPV + frottis cervical	
Europe de l'Ouest 1	7592	51.6 (14/27) 32.0–71.3	96.3 (26/27) 81.0–99.9	100.0 (27/27) 87.2–100.0	98.5 (7453/7565) 98.2–98.8	96.2 (7275/7565) 95.7–96.6	95.1 (7193/7565) 94.6–95.6
Amérique latine 1	6115	58.4 (45/77) 46.68–69.6	94.8 (73/77) 87.2–98.6	97.4 (75/77) 90.9–99.7	98.7 (5962/6038) 98.4–99.0	93.9 (5669/6038) 93.3–94.5	93.4 (5637/6038) 92.7–94.0
Amérique latine 2*	6176	77.9 (53/68) 66.2–87.1	89.7 (61/68) 79.9–95.8	94.1 (64/68) 85.6–98.4	94.1 (5745/6108) 93.4–94.6	94.0 (5742/6108) 93.4–94.6	89.9 (5490/6108) 89.1–90.6
Afrique	2925	84.1 (90/107) 75.8–90.5	89.7 (96/107) 82.4–94.8	92.5 (99/107) 85.8–96.7	86.4 (2436/2818) 85.1–87.7	80.0 (2253/2818) 78.4–81.4	76.4 (2152/2818) 74.8–77.9
Asie	1936	97.6 (41/42) 87.4–99.9	100.0 (42/42) 91.6–100.0	100.0 (42/42) 91.6–100.0	76.3 (1445/1894) 74.3–78.2	83.0 (1572/1894) 81.2–85.0	68.0 (1287/1894) 65.8–70.1
USA 1	1040	50.0 (1/2) 1.26–98.7	100.0 (2/2) 15.8–100.0	100.0 (2/2) 15.8–100.0	97.6 (1013/1038) 96.5–98.4	96.2 (999/1038) 94.9–97.3	95.5 (991/1038) 94.0–96.7

* Données de test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA si disponibles, autrement les données HCS sont utilisées ; données combinées.

Tableau 12. Estimations de performance — valeurs prédictives positive et négative

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

* Données de test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA si disponibles, autrement les données HCS sont utilisées ; données combinées.

Dans toutes les études, on observe une amélioration régulière et souvent très importante de la sensibilité du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA par rapport au frottis cervical seul. À l'image de la sensibilité, la valeur prédictive négative pour le HPV est dans tous les cas supérieure à celle du frottis cervical seul, avoisinant les 100 %. Cette valeur prédictive négative démontre la forte probabilité d'absence de lésions cervicales de haut grade ou de cancer chez les femmes présentant un résultat cytologique normal exempt d'infection à HPV.

Bien que la spécificité du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA soit plus faible que celle du frottis cervical seul, une analyse des rapports de probabilité démontre que la perte de spécificité observée n'est pas suffisamment importante pour affecter l'utilité clinique de ce test utilisé pour identifier des femmes dont le risque de présenter ou de développer des lésions cervicales est léger ou nul. Il est néanmoins important que la décision d'orienter une patiente vers un examen de coloscopie soit basée sur toutes les informations cliniques relatives au risque, ainsi que sur l'anamnèse de la patiente dont peut disposer le médecin. D'importantes variables comprennent l'anamnèse d'une infection au HPV et/ou un frottis anormal, l'âge lors du premier rapport sexuel,

le nombre de partenaires sexuels et les maladies sexuellement transmissibles concomitantes (37, 38).

Bien que la prévalence de lésions de haut grade ne varie pas notablement entre les études à partir desquelles la performance a été déterminée, la prévalence d'une infection au HPV dans une population peut affecter la performance et varie typiquement avec la population de patientes. De plus, on a montré que la prévalence d'une infection au HPV diminuait considérablement avec l'âge (17, 24-29, 38-40). Les valeurs prédictives positives diminuent lorsque l'on teste des populations présentant une faible prévalence ou des personnes présentant un faible risque d'infection.

Une analyse longitudinale a été effectuée avec les résultats de 2 études ; l'une menée aux États-Unis par le National Cancer Institute (Institut national du cancer, NCI) à Portland, Oregon, l'autre menée en France dans le Laboratoire Pol Bouin du C.H.U. de Reims. Ces analyses longitudinales ont été réalisées pour démontrer que des patientes négatives pour le frottis cervical/négatives pour le HPV présentaient un risque plus bas de lésions cervicales en comparaison des femmes habituellement définies à bas risque, dont le statut viral HPV est inconnu, et en comparaison des patientes négatives pour le frottis cervical/positives pour le HPV (voir les tableaux 13 et 14, ci-dessous).

Tableau 13. Analyse longitudinale — risque relatif de lésions de haut grade

Groupe d'étude	Âge	Classification bas risque	n	Cas de CIN 3+	Taux (pour 100 patientes-années)	Risque relatif IC à 95 %
NCI	30 et plus	Frottis cervical normal, résultat négatif pour le HPV	12,054	28	0.043	0.897 (0.596–1.348)
		Frottis cervicaux normaux consécutifs*	9429	19	0.048	1.000
	Toutes	Frottis cervical normal, résultat négatif pour le HPV	17,594	48	0.056	0.678 (0.514–0.894)
		Frottis cervicaux normaux consécutifs*	13,392	44	0.082	1.000
France	30 et plus	Frottis cervical normal, résultat négatif pour le HPV	1690	3	0.084	0.849 (0.307–2.35)
		Frottis cervicaux normaux consécutifs†	2026	4	0.099	1.000
	Toutes	Frottis cervical normal, résultat négatif pour le HPV	2180	3	0.066	0.491 (0.221–1.09)
		Frottis cervicaux normaux consécutifs†	2650	7	0.136	1.000

* Trois frottis cervicaux normaux sur environ 2 ans.

† Deux frottis cervicaux normaux sur environ 2 ans.

Tableau 14. Analyse longitudinale — Taux de maladie stratifiés en fonction du statut viral HPV à l'état de référence

Groupe d'étude	Âge	État de référence	n	Cas de CIN 3+	Taux (pour 100 patientes-années)	Risque relatif IC à 95 %
NCI	30 et plus	Frottis cervical normal, résultat positif pour le HPV	1078	24	0.451	10.50 (6.13–18.0)
		Frottis cervical normal, résultat négatif pour le HPV	12,054	28	0.043	1.00
	Toutes	Frottis cervical normal, résultat positif pour le HPV	2561	63	0.096	10.64 (7.33–15.5)
		Frottis cervical normal, résultat négatif pour le HPV	17,594	48	0.056	1.00
France	30 et plus	Frottis cervical normal, résultat positif pour le HPV	419	14	2.346	27.3 (8.41–88.3)
		Frottis cervical normal, résultat négatif pour le HPV	1696	3	0.084	1.00
	Toutes	Frottis cervical normal, résultat positif pour le HPV	619	22	2.520	37.0 (11.8–116)
		Frottis cervical normal, résultat négatif pour le HPV	2180	3	0.066	1.00

L'utilité clinique du résultat du test HPV est encore renforcée par le risque accru de lésions cervicales chez les femmes positives pour le HPV en comparaison des femmes négatives pour le HPV.

Performance clinique lors du dépistage de patientes présentant des résultats de frottis cervicaux de type ASC-US pour déterminer la nécessité d'une colposcopie

Une étude intitulée « Utility of HPV DNA Testing for Triage of Women with Borderline Pap Smears » (Utilité de l'analyse d'ADN de HPV pour le triage des femmes présentant des résultats

de frottis cervicaux équivoques) a été réalisée aux États-Unis en 1996 sous la direction du Kaiser Foundation Research Institute (Institut de recherche de la fondation Kaiser) et du Kaiser Permanente Medical Group (Groupe médical Kaiser Permanente). Les échantillons cervicaux utilisés pour l'analyse de routine de frottis cervicaux et pour le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA ont été obtenus auprès de femmes provenant de plusieurs cliniques Kaiser. Les frottis cervicaux initiaux ont été évalués selon la classification de Bethesda. Pour une terminologie équivalente de dépistage du cancer cervical dans la Communauté européenne, se référer aux directives européennes relatives à l'assurance de qualité de dépistage du cancer du col utérin (42). Les femmes (âgées de 15 ans ou plus) dont les résultats de frottis cervicaux présentaient des cellules malpighiennes atypiques de signification indéterminée (ASC-US) ont été à nouveau convoquées pour une coloscopie et une biopsie. Chaque échantillon histologique a été également analysé par un pathologiste indépendant et les divergences entre l'examen initial et l'examen indépendant ont été arbitrées par un troisième pathologiste. Les échantillons histologiques prélevés sous contrôle coloscopique ont été examinés par des pathologistes, et un premier diagnostic a été établi.

L'échantillon initial a été analysé avec un test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA prototype, contenant des sondes pour 11 des 13 types de HPV (les HPV de types 59 et 68 étant exclus). Cette différence ne devrait pas donner des profils de performances notablement différents pour les tests.

Les résultats du test High-risk HPV DNA et les diagnostics histologiques pour 885 femmes présentant un résultat de frottis cervical de type ASC-US étaient disponibles. L'analyse de la majorité des patientes a été réalisée sur des échantillons prélevés en milieu STM et en solution PreservCyt. En raison des similarités de performance du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA en milieu STM et en solution PreservCyt, les performances du test sont présentées uniquement pour la solution PreservCyt.

Parmi les patientes présentant un résultat de frottis cervical initial de type ASC-US, la valeur prédictive négative du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA pour la présence, à la coloscopie, d'une HSIL ou de lésions de grade supérieur est de 99 % (voir le tableau 15, ci-dessous).

Tableau 15. Comparaison entre le test digene HC2 High-Risk HPV DNA et une histologie de consensus ; population présentant un résultat initial de frottis cervical de type ASC-US ; étude Kaiser, échantillons en solution PreservCyt

		HSIL ou lésions de grade supérieur à la colposcopie		Total
		+	-	
digene HC2 High-Risk HPV DNA Test result	+	66	317	383
	-	5	497	502
Total		71	814	885

Sensibilité [TP/(TP+FN)] = 93,0 % (66/71)
 IC à 95 % = 84,3-97,7
 Spécificité [TN/(TN+FP)] = 61,1 % (497/814)
 IC à 95 % = 57,7-64,4
 Prévalence de lésions = 8,0 % (71/885)
 Valeur prédictive positive de l'essai = 17,2 % (66/383)
 Valeur prédictive négative de l'essai = 99,0 % (497/502)

Les valeurs prédictives positive et négative théoriques basées sur diverses prévalences pour un résultat initial de type ASC-US qui s'est avérée être une HSIL ou des lésions de grade supérieur sur la base des résultats du test des HPV à haut risque, sont déterminées (voir le tableau 16, ci-dessous).

Tableau 16. Valeurs prédictives positive et négative théoriques d'une analyse de HPV à haut risque sur des résultats de frottis cervicaux de type ASC-US

Prévalence théorique pour une HSIL	Résultat de frottis cervical initial de type ASC-US	
	Valeur prédictive positive de l'essai	Valeur prédictive négative de l'essai
5	11.2	99.4
10	21.0	98.7
15	29.7	98.0
20	37.4	97.2
25	44.3	96.3
30	50.6	95.3

La variation entre les différents groupes d'âge intégrés à cette étude est déterminée (voir le tableau 17, ci-dessous).

Tableau 17. Données de l'étude Kaiser : performance du test digene HC2 High-Risk HPV DNA comparée aux résultats histologiques de consensus (HSIL) — caractéristiques spécifiques à l'âge

	Âge < 30	Âge 30-39	Âge > 39
n	287	233	365
Prévalence de lésions (%)	12.2	11.2	2.7
Sensibilité (%)	100	88.46	80.0
(n/N)	(35/35)	(23/26)	(8/10)
IC à 95 %	90.0-100.0	69.9-97.6	44.4-97.5
Spécificité (%)	31.4	66.2	79.15
(n/N)	(79/252)	(132/207)	(281/355)
IC à 95 %	25.7-37.5	59.3-72.6	74.6-83.3
Valeur prédictive négative (%)	100.0	97.86	99.29
(n/N)	(79/79)	(137/140)	(281/283)
Valeur prédictive positive (%)	16.83	24.73	9.76
(n/N)	(35/208)	(23/93)	(8/82)

Sensibilité et spécificité cliniques pour la détermination du risque de lésions de haut grade chez les femmes présentant des résultats de frottis cervicaux indiquant une LSIL ou HSIL

Une étude clinique multicentrique utilisant le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA a été réalisée sur des échantillons provenant de plusieurs grands hôpitaux à forte prévalence de lésions de haut grade et de HPV et dans des cliniques de colposcopie (3 sites) dans les états de l'Ouest et du Sud des États-Unis. Le test HPV a été réalisé dans 3 sites d'investigation non affiliés aux cliniques de colposcopie d'où proviennent les échantillons. La population participant à cette étude clinique comprenait des femmes présentant un diagnostic de LSIL ou de HSIL d'après un frottis cytologique récent et qui ont été convoquées pour une colposcopie de suivi. Sur une cohorte de 702 patientes, 327 présentaient des résultats de frottis cytologiques évocateurs de lésions plus sévères qu'un ASC-US et ont reçu des informations adéquates ; 96 patientes de ce groupe ont eu comme résultat final des lésions HSIL ou plus sévères.

Des échantillons de cellules cervicales exfoliées ont été prélevés à l'aide du dispositif de prélèvement *digene* HC2 DNA Collection Device et ensuite placés dans du milieu STM, ou à l'aide d'un système de brosse qui est ensuite rincé dans une solution PreservCyt au moment de la colposcopie. Les échantillons ont été analysés avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA et les résultats ont été comparés au statut de la pathologie déterminé pour chaque patiente. Le statut de la pathologie a été établi sur les résultats de l'évaluation histologique. Cependant, en cas de résultat histologique négatif ou en l'absence de résultat histologique, le statut de la pathologie a

été déterminé par la cytologie au moment de l'examen colposcopique (voir le tableau 18, ci-dessous).

Le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA a été réalisé dans 3 grands centres médicaux urbains sans affiliation avec les sites où ont été prélevés les échantillons lors de la colposcopie. La cytologie a été réalisée dans un laboratoire de pathologie de référence et l'histologie a été effectuée dans les établissements réalisant les colposcopies. Les résultats de test ont été comparés au statut de la pathologie pour évaluer la sensibilité et la spécificité du test, ainsi que les valeurs prédictives négative et positive pour détecter les néoplasies cervicales de haut grade. En raison des similarités de performance du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA en milieu STM et en solution PreservCyt, les performances du test sont présentées uniquement pour la solution PreservCyt. Aucune différence dans les résultats d'analyse des HPV à haut risque n'a été observée entre les échantillons en milieu STM et ceux en solution PreservCyt.

Tableau 18. Algorithme du statut pathologique des patientes

Résultat de cytologie	Résultat d'histologie	Statut pathologique
Négatif	Négatif ou non effectué*	Négatif
LSIL	Négatif	LSIL
HSIL	Négatif	HSIL
Cancer	Négatif	HSIL+
Négatif	LSIL	LSIL
LSIL	Non effectué*	LSIL
LSIL	LSIL	LSIL
HSIL	LSIL	LSIL
Cancer	LSIL	LSIL
Négatif	HSIL	HSIL
LSIL	HSIL	HSIL
HSIL	HSIL	HSIL
HSIL	Non effectué*	HSIL
Cancer	HSIL	HSIL
Négatif	Cancer	HSIL+
LSIL	Cancer	HSIL+
HSIL	Cancer	HSIL+
Cancer	Non effectué*	HSIL+
Cancer	Cancer	HSIL+

* Biopsie et/ou curetage endocervical (ECC) non effectués en raison de l'absence d'anomalies observées après la colposcopie ou en raison d'un résultat histologique non disponible.

La performance du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA a été déterminée en utilisant 327 échantillons en solution PreservCyt, dont 96 ont été prélevés chez des femmes présentant un diagnostic de lésions cervicales de haut grade (voir les tableaux 19 et 20, ci-dessous). Les comparaisons ont été effectuées en utilisant toutes les patientes de l'étude qui présentaient des résultats de frottis cervical de référence anormaux.

Tableau 19. Résultats d'analyse de HPV à haut risque

		Statut pathologique final de type HSIL		Statut pathologique final de type LSIL		Statut pathologique final négatif		Total
		+	-	+	-	+	-	
Résultats de HPV à haut risque		+	-	+	-	+	-	
Résultat du frottis cervical de référence	LSIL	44	4	78	33	28	37	224
	HSIL	45	3	29	14	5	7	103
	Total	89	7	107	47	33	44	327
Total		96		154		77		327

Le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA affiche environ 93 % de sensibilité globale en matière d'identification des femmes présentant une néoplasie de haut grade et issues d'une population orientée vers une coloscopie sur la base d'un résultat diagnostique de frottis cervical indiquant un état LSIL, HSIL ou équivalent (voir le tableau 20, ci-dessous). Le test montre également une valeur prédictive négative atteignant presque 95 % dans cette population.

Tableau 20. Caractéristiques de performance de l'analyse d'ADN de HPV à haut risque chez des patientes présentant un résultat de frottis cervical de référence de type LSIL ou de grade supérieur et un statut pathologique final de type HSIL

		Statut pathologique final		Total
		HSIL	LSIL ou négatif	
Résultat du test d'ADN de HPV haut risque	+	89	140	229
	-	7	91	98
	Total	96	231	327

Sensibilité [TP/(TP+FN)] = 92,7% (89/96)
 IC à 95 % = 85,6-97,0
 Spécificité [TN/(TN+FP)] = 39,4% (91/231)
 IC à 95 % = 33,1-46,0
 Prévalence de lésions définies LSIL de référence et diagnostiquées HSIL final = 21,4 %
 Prévalence de lésions définies HSIL de référence et diagnostiquées HSIL final = 46,6 %
 Valeur prédictive positive globale = 38,9 % (89/229)
 Valeur prédictive négative globale = 92,8 % (91/98)

Si la spécificité du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA semble assez faible, une corrélation stricte entre l'absence de néoplasie et un résultat de HPV négatif n'est pas attendue. De l'ADN de HPV peut être présent chez des femmes dont la maladie n'a pas progressé vers un état de grade supérieur. En fait, lorsque l'on effectue une amplification en chaîne par polymérase (PCR, un essai uniquement destiné à la recherche) du HPV sur des échantillons présentant des résultats de test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA positifs et dont le statut pathologique correspondant est inférieur à une néoplasie de bas grade, on obtient presque 75 % de résultats positifs.

On a déterminé les valeurs prédictives positive et négative théoriques du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA pour des résultats de frottis cervicaux déterminés initialement comme LSIL ou HSIL et qui se sont avérés correspondre au type HSIL ou à des lésions de grade plus sévère lors de la coloscopie (voir le tableau 21, ci-dessous).

Tableau 21. Valeurs positive et négative prédictives théoriques du test digene HC2 High-Risk HPV DNA sur des résultats de frottis cervicaux indiquant initialement un état LSIL ou HSIL

Theoretical prevalence for HSIL	Initial LSIL or HSIL Pap smear result	
	Assay positive predictive value	Assay negative predictive value
5	7.4	99.0
10	14.5	97.9
15	21.2	96.8
20	27.6	95.5
25	33.7	94.1
30	39.6	92.6
35	45.1	90.9
40	50.4	89.0
45	55.5	86.8
50	60.4	84.3

Performances avec l'auto-prélèvement vaginal

Dans les publications citées concernant les performances du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA sur les échantillons vaginaux autocollectés, plus de 141.000 femmes âgées de 16 à 54 ans ont été incluses. Les cohortes d'étude incluait des femmes vivant en Chine (41, 42), au Mexique (43, 44) et au Royaume-Uni (45). Les plans d'étude différaient légèrement mais, en règle générale, les femmes obtenant un résultat de test positif ont eu l'opportunité de passer un examen complémentaire par coloscopie, et les résultats de sensibilité et de spécificité ont été fournis par rapport à une méthode comparative.

Dans deux études qui comportaient des données comparant les échantillons autocollectés aux échantillons collectés par le médecin, les résultats indiquent une forte sensibilité à la CIN2+ pour les deux méthodes (42, 45), de 81–85 % pour les échantillons autocollectés contre 96–100 % pour les échantillons collectés par le médecin. Les résultats de spécificité à la CIN2+ étaient similaires pour les deux méthodes (42, 45), de 81-82 % pour les échantillons autocollectés contre 83-85 % pour les échantillons collectés par le médecin. Dans d'autres études fournissant uniquement les données de performance pour les échantillons autocollectés, les performances du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA en matière de sensibilité à la CIN2+ étaient 3,4 fois supérieures à celles de l'analyse cytologique (43), avec une sensibilité de 98 % avant ajustement du biais de vérification (44).

Sensibilité analytique

Un panel non clinique d'ADN plasmidique de HPV cloné a été testé pour déterminer si chacun des 13 types de HPV pouvait être détecté par le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA et pour déterminer la sensibilité analytique de l'essai pour chaque type de HPV. Chaque concentration cible de HPV (100 pg/ml, 10 pg/ml, 2,5 pg/ml, 1,0 pg/ml, 0,5 pg/ml et 0,2 pg/ml) de chacun des 13 types d'ADN de HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68) a été analysée en triplicat. La RLU moyenne de chaque concentration des divers types de HPV a été calculée et comparée à l'étalon positif.

La limite de détection de chaque type de HPV en milieu STM a été déterminée (voir le tableau 22, ci-dessous). Les limites de détection variaient de 0,62 pg/ml à 1,39 pg/ml, selon le type de HPV testé. La limite de détection moyenne de l'ensemble des 13 types d'ADN de HPV était de 1,08 pg/ml avec un écart type de 0,05 pg/ml.

Tableau 22. Résumé des limites de détection de sensibilité pour chaque type d'ADN de HPV en milieu STM

Type d'ADN de HPV	Concentration d'ADN de HPV pouvant être détectée (pg/ml)	Écart type	IC à 95 %
16	1.09	0.06	0.94–1.29
18	1.05	0.05	0.88–1.29
31	1.01	0.05	0.91–1.15
33	1.35	0.02	1.26–1.45
35	1.11	0.05	0.95–1.31
39	1.39	0.09	1.16–1.71
45	1.14	0.04	0.99–1.35
51	0.78	0.10	0.70–0.88
52	1.37	0.06	1.21–1.58
56	0.62	0.04	0.58–0.67
58	0.82	0.04	0.73–0.94
59	1.10	0.06	1.00–1.21
68	1.19	0.04	1.03–1.39
Moyenne (tous les types)	1.08	0.05	0.95–1.25

Équivalence entre les types d'échantillons

Équivalence entre les échantillons en milieu STM et en solution PreservCyt

L'équivalence entre les échantillons en milieu STM et ceux en solution PreservCyt a été analysée pour une quantité identique d'ADN de HPV 18. On inocule environ 10^6 cellules HeLa positives contenant le génome intégré du HPV 18 dans du milieu STM et dans un lot de cellules négatives en solution PreservCyt. Chaque type d'échantillon a été traité selon ses propres procédures de préparation et de dénaturation d'échantillon, comme indiqué dans la notice d'instructions correspondante, et a été analysé avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Les résultats indiquent que la récupération de l'ADN du HPV 18 à partir de cellules de carcinome humain est équivalente pour les deux milieux et que la préparation des échantillons en solution PreservCyt n'affecte pas la sensibilité analytique du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Équivalence entre la préparation manuelle d'échantillons en solution PreservCyt et la préparation d'échantillons en solution PreservCyt à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media

Des études ont été réalisées en utilisant des échantillons en solution PreservCyt prélevés chez une sous-population de femmes présentant des résultats de cytologie normaux ($n = 1\ 276$) et chez une sous-population de femmes présentant une cytologie de type ASC-US ou supérieure ($n = 402$). La préparation manuelle des échantillons et la préparation d'échantillons à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media ont été réalisées pour chaque échantillon et suivies d'une analyse automatique par RCS avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA (voir le tableau 23, ci-dessous).

Tableau 23. Concordance des résultats obtenus pour les échantillons en solution PreservCyt entre la préparation manuelle des échantillons et la préparation des échantillons à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media ($n = 1\ 678$)

Concordance positive (%) (n/N) IC à 95 %		Concordance négative (%) (n/N) IC à 95 %	
Tous positifs	Région fortement positive (RLU/CO \geq 2,5)	Tous négatifs	Région fortement négative (RLU/CO $<$ 0,8)
96.0	97.6	96.2	99.1
(409/426)	(372/381)	(1204/1252)	(1173/1184)
93.7–97.5	95.6–98.8	95.0–97.1	98.3–99.5

Les sensibilité et spécificité d'essai relatives des échantillons en solution PreservCyt préparés au moyen du kit QIASymphony DSP HPV Media sont fortement corrélées avec les résultats obtenus en utilisant la méthode de préparation manuelle, comme l'atteste la limite inférieure de l'IC à 95 % aussi bien pour la concordance positive que pour la concordance négative.

Équivalence entre la préparation manuelle d'échantillons en solution PreservCyt et la préparation d'échantillons en solution PreservCyt à l'aide du kit QIASymphony DSP AXpH DNA

Des études ont été réalisées en utilisant des échantillons en solution PreservCyt prélevés chez une sous-population de femmes âgées de 30 ans et plus, présentant des résultats de cytologie normaux (n = 1 901) et chez une sous-population de femmes présentant une cytologie de type ASC-US (n = 398). La préparation manuelle des échantillons et la préparation d'échantillons à l'aide du kit QIASymphony DSP AXpH DNA ont été réalisées pour chaque échantillon et suivies d'une analyse avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA (voir le tableau 24, ci-dessous).

Tableau 24. Concordance des résultats obtenus pour les échantillons en solution PreservCyt entre la préparation manuelle des échantillons et la préparation des échantillons à l'aide du kit QIASymphony DSP AXpH DNA (n = 2 299)

Concordance positive (%) (n/N) IC à 95 %		Concordance négative (%) (n/N) IC à 95 %	
Tous positifs	Région fortement positive (RLU/CO ≥ 2,5)	Tous négatifs	Région fortement négative (RLU/CO < 0,8)
92.7	96.5	99.1	99.9
(281/303)	(245/254)	(1978/1996)	(1967/1969)
89.3–95.2	93.4–98.1	98.6–99.4	99.6–100.0

Les sensibilité et spécificité d'essai relatives des échantillons en solution PreservCyt préparés au moyen du kit QIASymphony DSP AXpH DNA sont fortement corrélées avec les résultats obtenus en utilisant la méthode de préparation manuelle, comme l'atteste la limite inférieure de l'IC à 95 % aussi bien pour la concordance positive que pour la concordance négative.

Équivalence entre la préparation d'échantillons en milieu STM et la préparation manuelle d'échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath

Une évaluation clinique en deux phases a été effectuée dans 6 centres de prélèvement et 3 centres d'analyse aux États-Unis. Les patientes orientées vers une clinique spécialisée en MST, une clinique obstétrique/gynécologique, une clinique de colposcopie, un hôpital ou un centre de planning familial sont éligibles pour un recrutement selon des critères d'inclusion et d'exclusion

prédéterminés. La phase de faisabilité, censée déterminer une valeur de CO adéquate du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA pour une utilisation avec les échantillons en solution SurePath, a permis le recrutement d'environ 400 patientes. La phase de faisabilité, censée déterminer une valeur de CO adéquate du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA pour une utilisation avec les échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath, a permis le recrutement d'environ 400 patientes. La phase de validation clinique, dans laquelle environ 1.500 patientes ont été recrutées pour valider la valeur de CO choisie, a commencé après une analyse intermédiaire de la phase de faisabilité qui a révélé qu'un CO de 1,0 RLU/CO avec des échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath présentait une concordance acceptable avec les résultats d'échantillons en milieu STM.

Dans les deux phases d'évaluation, on a prélevé et apparié des échantillons cervicaux en solutions SurePath et STM pour chaque participante consentante. L'échantillon en solution SurePath était ensuite envoyé à un laboratoire de cytologie pour la préparation des lames. Une fois la préparation cytologique effectuée, les échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath restant et l'échantillon en milieu STM correspondant étaient analysés avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, avec un CO de 1,0 RLU/CO (voir le tableau 25, ci-dessous).

Tableau 25. Concordance des résultats d'échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath et des résultats d'échantillons en milieu STM (tout âge et toute classification cytologique) (n = 1.490)

Concordance positive (%) (n/N) IC à 95 %		Concordance négative (%) (n/N) IC à 95 %	
Tous positifs	Région fortement positive (RLU/CO ≥ 2,5)	Tous négatifs	Région fortement négative (RLU/CO < 0,80)
93.5	96.4	95.3	96.0
(401/429)	(378/392)	(1011/1061)	(1002/1044)
90.7–95.6	94.1–98.0	93.8–96.5	94.6–97.1

Les sensibilité et spécificité d'essai relatives de l'analyse des échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath sont en forte corrélation avec les résultats obtenus lors de l'analyse des échantillons en milieu STM, comme l'atteste la limite inférieure de l'IC à 95 % pour les deux concordances positive et négative.

Équivalence entre la préparation manuelle d'échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath et la préparation d'échantillons en solution SurePath à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media

Des études ont été réalisées sur des échantillons en solution SurePath prélevés chez les sous-populations suivantes :

- Femmes présentant une cytologie normale (n = 1 189)
- Femmes présentant une cytologie ASC-US ou de grade plus élevé (n = 199)

Pour chaque échantillon en solution SurePath, une préparation d'échantillons en solution SurePath a été réalisée à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media ainsi qu'une préparation manuelle d'échantillons de culot cellulaire post-gradient. L'analyse automatique par RCS avec le test digene HC2 High-Risk HPV DNA (voir tableau 26 ci-dessous) a été réalisée pour chacun des échantillons préparés.

Tableau 26. Concordance des résultats entre la préparation manuelle d'échantillons SurePath et la préparation d'échantillons en solution SurePath à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media (n = 1.388)

Concordance positive (%) (n/N) IC à 95 %		Concordance négative (%) (n/N) IC à 95 %	
Tous positifs	Région fortement positive (RLU/CO ≥ 2,5)	Tous négatifs	Région fortement négative (RLU/CO < 0,8)
91.7	97.5	99.0	99.7
(222/242)	(192/197)	(1134/1146)	(1124/1127)
87.6-94.6	94.2-98.9	98.2-99.4	99.2-99.9

Les sensibilité et spécificité d'essai relatives des échantillons en solution SurePath préparés au moyen du kit QIASymphony DSP HPV Media sont fortement corrélées avec les résultats obtenus en utilisant la méthode de préparation manuelle, comme l'atteste la limite inférieure de l'IC à 95 % aussi bien pour la concordance positive que pour la concordance négative.

Équivalence entre la préparation manuelle d'échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath et la préparation d'échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media

Des études ont été réalisées sur des échantillons en solution SurePath prélevés chez les sous-populations suivantes :

- Femmes présentant une cytologie normale (n = 1.200)
- Femmes présentant une cytologie ASC-US ou de grade plus élevé (n = 183)

La préparation manuelle des échantillons et la préparation d'échantillons à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media ont été réalisées pour chaque échantillon de culot cellulaire post-gradient SurePath et suivies d'une analyse automatique par RCS avec le test digene HC2 High-Risk HPV DNA (voir le tableau 27, ci-dessous).

Tableau 27. Concordance des résultats obtenus pour les échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath entre la préparation manuelle des échantillons et la préparation des échantillons à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media (n = 1.383)

Concordance positive (%) (n/N) IC à 95 %		Concordance négative (%) (n/N) IC à 95 %	
Tous positifs	Région fortement positive RLU/CO ≥ 2,5	Tous négatifs	Région fortement négative RLU/CO < 0,8
92.6	97.4	94.4	99.3
(188/203)	(147/151)	(1114/1180)	(1078/1086)
88.2–95.5	93.4–99.0	92.9–95.6	98.6–99.6

Les sensibilité et spécificité d'essai relatives des échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath préparés au moyen du kit QIASymphony DSP HPV Media sont fortement corrélées avec les résultats obtenus en utilisant la méthode de préparation manuelle, comme l'atteste la limite inférieure de l'IC à 95 % aussi bien pour la concordance positive que pour la concordance négative.

Concordance entre les méthodes d'essai

Une étude multicentrique (n = 2 270) a été réalisée pour évaluer les résultats du test clinique utilisant le système RCS en comparaison des résultats du test utilisant la méthode manuelle.

L'analyse a été effectuée dans 3 sites externes à QIAGEN, avec des échantillons prélevés sur des patientes provenant de 5 sites de prélèvement. Le groupe de données consiste en 1 269 échantillons cervicaux prélevés en solution PreservCyt et en 1 001 échantillons prélevés en milieu STM.

Les concordances statistiques, entre des échantillons appariés testés avec le système RCS et avec l'approche manuelle, ont été calculées pour cette population de patientes (voir les tableaux 28 et 29, ci-dessous).

Tableau 28. Résumé de la concordance entre l'analyse automatique par RCS et l'analyse manuelle – échantillons en milieu STM (n = 1 001)

Classification cytologique	Prévalence HPV (%)	Concordance positive (%) (n/N) IC à 95 %		Concordance négative (%) (n/N) IC à 95 %	
		Tous positifs	Région fortement positive (RLU/CO > 2,5)	Tous négatifs	Région fortement négative (RLU/CO < 0,8)
WNL* < 30 ans	21	99.3 (139/140) 96.1–100.0	99.1 (112/113) 95.2–100.0	99.3 (538/542) 98.1–99.8	100.0 (531/531) 99.3–100.0
WNL ≥ 30 ans	15	92.0 (23/25) 74.0–99.0	93.8 (15/16) 69.8–99.8	100.0 (143/143) 97.5–100.0	100.0 (142/142) 97.4–100.0
ASC-US	65	98.1 (51/52) 89.7–100.0	100.0 (47/47) 92.4–100.0	96.4 (27/28) 81.7–99.9	100.0 (26/26) 86.8–100.0
LSIL+	96	100.0 (65/65) 94.5–100.0	100.0 (62/62) 94.2–100.0	66.7 (2/3) 9.4–99.2	66.7 (2/3) 9.4–99.2
Autre	33	100.0 (1/1) 2.5–100.0	100.0 (1/1) 2.5–100.0	100.0 (2/2) 15.8–100.0	100.0 (2/2) 15.8–100.0
Tous les échantillons en milieu STM	28	98.6 (279/283) 96.4–99.6	99.2 (237/239) 97.0–99.9	99.2 (712/718) 98.2–99.7	99.9 (703/704) 99.2–100.0

* WNL = dans les limites normales.

Tableau 29. Résumé de la concordance entre l'analyse automatique par RCS et l'analyse manuelle – échantillons en solution PreservCyt (n = 1269)

Classification cytologique	HPV Prévalence (%)	Concordance positive (%) (n/N) IC à 95 %		Concordance négative (%) (n/N) IC à 95 %	
		Tous positifs	Région fortement positive (RLU/CO > 2,5)	Tous négatifs	Région fortement négative (RLU/CO < 0,8)
WNL < 30 ans	20	96.2 (75/78) 89.2–99.2	100.0 (64/64) 94.4–100.0	98.4 (301/306) 96.2–99.5	99.0 (293/296) 97.1–99.8
WNL ≥ 30 ans	8	88.7 (47/53) 77.0–95.7	92.1 (35/38) 78.6–98.3	99.1 (578/583) 98.0–99.7	99.5 (571/574) 98.5–99.9
ASC-US	36	100.0 (48/48) 92.6–100.0	100.0 (46/46) 92.3–100.0	96.6 (84/87) 90.3–99.3	96.5 (83/86) 90.1–99.3
LSIL+	77	100.0 (64/64) 94.4–100.0	100.0 (62/62) 94.2–100.0	89.5 (17/19) 66.9–98.7	88.9 (16/18) 65.3–98.6
Autre cytologie	11	100.0 (3/3) 29.2–100.0	100.0 (3/3) 29.2–100.0	100.0 (24/24) 85.6–100.0	100.0 (24/24) 85.8–100.0
Tous les échantillons en solution PreservCyt*	20	96.4 (238/247) 93.2–98.3	98.6 (211/214) 96.0–99.7	98.5 (1007/1022) 97.6–99.2	98.9 (990/1001) 98.0–99.4

* WNL = dans les limites normales.

† Données de cytologie indisponibles pour 4 patientes

Une étude clinique supplémentaire a été réalisée en utilisant des échantillons résiduels archivés en solution PreservCyt, provenant d'une sous-population de femmes âgées de 30 ans ou plus et présentant une cytologie normale (voir le tableau 29, ci-dessous), et dont la prévalence de HPV est de 4,8 %.

Tableau 30. Résumé de la concordance entre l'analyse automatique par RCS et l'analyse manuelle — femmes âgées de 30 ans et plus ayant des résultats WNL (n = 2 077)

Concordance positive (%) (n/N) IC à 95 %		Concordance négative (%) (n/N) IC à 95 %	
Tous positifs	Région fortement positive (RLU/CO > 2,5)	Tous négatifs	Région fortement négative (RLU/CO < 0,8)
92.0	91.8	99.3	99.7
(92/100)	(78/85)	(1964/1977)	(1944/1949)
84.84–96.48	83.77–96.62	98.88–99.65	99.40–99.92

On a constaté 7 résultats discordants entre les résultats d'analyse manuelle et automatique par RCS dans la région fortement positive. Les résultats d'analyse manuelle initiaux de ces 7 échantillons étaient en dehors de l'algorithme recommandé suggérant une nouvelle analyse d'échantillons en solution PreservCyt ; mais comme le plan de l'étude imposait l'analyse de tous les échantillons en triplicat, des résultats répétés étaient disponibles pour résoudre cette divergence.

Les données d'analyse répétées de chacun de ces 7 échantillons divergents suggèrent que tous les échantillons discordants sont négatifs pour l'ADN de HPV (voir le tableau 31, ci-dessous). Sur la base des résultats négatifs répétés obtenus pour les deux réplicats, il est probable que chacun des résultats d'analyse manuelle initialement positifs soit un résultat faussement positif.

Tableau 31. Échantillons en solution PreservCyt discordants chez des femmes âgées de 30 ans et plus ayant des résultats WNL (n = 7)

Échantillon	Site	Analyse manuelle (RLU/CO)			Analyse automatique par RCS (RLU/CO)		
		Initial	Réplicat 1	Réplicat 2	Initial	Réplicat 1	Réplicat 2
1	A	2.51	0.08	0.08	0.12	0.17	0.14
2	A	20.18	0.08	0.09	0.19	0.24	0.20
3	A	3.88	0.12	0.11	0.17	0.22	0.22
4	A	9.37	0.09	0.09	0.15	0.21	0.20
5	A	6.01	0.17	0.13	0.25	0.30	0.30
6	B	2.97	0.71	0.99	1.59	0.89	0.90
7	C	11.01	0.16	0.14	0.19	0.15	0.21

Les résultats de cette étude clinique indiquent une concordance globale entre l'analyse automatique par RCS et l'analyse manuelle, tant pour les échantillons en milieu STM que ceux en solution PreservCyt.

Reproductibilité

Reproductibilité globale de l'analyse manuelle

Une étude multicentrique de reproductibilité a été réalisée pour déterminer la reproductibilité sur différents jours, entre différents sites, ainsi que la reproductibilité globale du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA en utilisant un panel de cibles d'ADN de HPV et des échantillons cliniques en milieu STM positifs pour le HPV et négatifs pour le HPV.

Trois laboratoires externes ont effectué les analyses avec le même lot de kits de test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA sur 3 jours différents et avec le même panel de reproductibilité. Le panel de reproductibilité comprenait les échantillons suivants :

- 12 lots d'échantillons cliniques dénaturés en milieu STM
- 3 lots d'échantillons cliniques dénaturés en solution PreservCyt
- Un étalon négatif
- Un étalon positif de HPV haut risque en concentrations de 0,5 pg/ml, 1 pg/ml, 2,5 pg/ml, 5 pg/ml et 10 pg/ml.

Tous les éléments du panel ont été testés chaque jour en triplicat avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Les résultats indiquent que la reproductibilité du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA sur des échantillons cliniques est très bonne (voir le tableau 32, ci-dessous).

Tableau 32. Reproductibilité globale – reproductibilité multicentrique (toutes les analyses de tous les sites)

Mesure statistique	Résultat
Échantillons positifs attendus et résultat positif observé (IC à 95 %)	100.0% (99.0–100.0)
Échantillons négatifs attendus et résultat négatif observé (IC à 95 %)	99.0% (97.49–99.73)
Concordance (IC à 95 %)	99.5% (98.70–99.86)
Kappa	0.990

Reproductibilité avec des échantillons cliniques en milieu STM

Analyse manuelle

Une étude a été réalisée pour évaluer la reproductibilité de l'analyse manuelle d'échantillons cliniques en milieu STM avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Un panel de 20 éléments

constitué de lots cliniques (10 éléments positifs et 10 autres négatifs) a été préparé en combinant des échantillons en milieu STM déjà testés. Les échantillons ont été testés en réplicats de 4 éléments tous les jours d'une période de 5 jours pour un total de 20 réplicats par échantillon. L'analyse a été effectuée en utilisant un mélange de sondes combiné, constitué de la sonde HPV haut risque et d'une sonde HPV bas risque. La reproductibilité du test n'est pas censée être différente en utilisant le mélange de sondes seul dans le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. La valeur RLU/CO moyenne et l'IC à 95 % autour de la moyenne ont été calculés (voir le tableau 33, ci-dessous).

Tableau 33. Reproductibilité des échantillons en milieu STM – analyse manuelle (ordre décroissant par valeur RLU/CO moyenne)

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

Pour les 5 échantillons présentant un rapport RLU/CO moyen supérieur de 20 %, ou plus, à la valeur de CO, 100 réplicats sur 100 (100,0 %) se sont révélés positifs. Pour les 5 échantillons présentant un rapport RLU/CO moyen dans la plage des 20 % supérieurs ou inférieurs au CO, 60 réplicats sur 100 (60 % ; IC à 95 % = 49,7-69,6) se sont révélés positifs et 40 sur 100 (40 %) négatifs. Pour les 10 échantillons présentant un rapport RLU/CO moyen inférieur de

20 %, ou plus, à la valeur de CO, 200 réplicats sur 200 (100 %) se sont révélés négatifs.

Les résultats indiquent que les échantillons éloignés de 20 % ou plus de la valeur de CO sont en mesure de fournir des résultats cohérents. Les échantillons dont les résultats sont proches de la valeur de CO donnent des résultats positifs et négatifs en nombres à peu près égaux. Ces données démontrent que l'analyse manuelle d'échantillons en milieu STM à l'aide du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA fournit des résultats reproductibles.

Analyse automatique par RCS

Une étude a été réalisée dans le but d'évaluer la reproductibilité intra-essai, la reproductibilité sur des jours différents et la reproductibilité inter-laboratoire d'une analyse automatique par RCS d'échantillons en milieu STM avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Un panel de 16 éléments d'échantillons cliniques regroupés (voir le tableau 34, ci-dessous) a été testé en utilisant un lot unique de réactifs, deux fois par jour, sur 3 jours différents. Chaque élément est testé en quatre exemplaires (quadruplicat).

Tableau 34. Reproductibilité d'échantillons en milieu STM – composition du panel d'analyse automatique par RCS

Élément du panel	Valeur RLU/CO approximative	Résultat de test attendu
1N	<0.4	Négatif
2N	0.4–0.8	Négatif
3P	0.8–1.2	Fortement négatif/faiblement positif
4P	0.8–1.2	Fortement négatif/faiblement positif
5P	0.8–1.2	Fortement négatif/faiblement positif
6P	1.2–2.0	Faiblement positif
7P	1.2–2.0	Faiblement positif
8P	1.2–2.0	Faiblement positif
9P	2.0–5.0	Faiblement positif
10P	5.0–10.0	Modérément positif
11N	<0.4	Négatif
12N	<0.4	Négatif
13N	<0.4	Négatif
14XR	Matière clinique positive à l'ADN de HPV bas risque provenant d'un lot clinique en milieu STM négatif	Fortement négatif/faiblement positif
15XR	Plasmide d'ADN de HPV bas risque d'un lot clinique en milieu STM négatif	Fortement négatif/faiblement positif
16XR	Contrôle d'ADN de vecteur plasmidique d'un lot clinique en milieu STM négatif	Fortement négatif/faiblement positif

Deux éléments du panel (14XR et 15XR) ont été incorporés pour évaluer le risque d'hybridation croisée du mélange de sondes du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA avec des échantillons qui ne contiennent que les types d'ADN de HPV bas risque 6, 11, 42, 43 et 44. L'élément de panel 16XR était constitué d'ADN de plasmide pGEM® à une concentration de 1,49 ng/ml et a servi de contrôle de vecteur pour l'élément de panel 15XR. Les résultats de cette analyse indiquent l'absence de résultats de test faussement positifs liés à la présence de types d'ADN de HPV bas risque dans les échantillons cliniques. Ces résultats sont cohérents avec ceux de l'analyse manuelle.

La reproductibilité a été calculée selon la méthode décrite dans la norme NCCLS E5-A* (voir le tableau 35, ci-dessous). Cette méthode nécessite le calcul de composants de variance pour chacune des sources de variabilité : laboratoire, jour du test, cycle et erreur (que l'on définit comme la variation inter-essai et entre essais).

Tableau 35. Reproductibilité d'échantillons en milieu STM — analyse automatique par RCS ; reproductibilité quantitative

Élément du panel	n	Moyenne RLU/CO	Écart type				Total	Total CV (%)
			Au sein d'un cycle	Entre des cycles	Entre différents jours	Entre différents laboratoires		
1N	72	0.13	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	15.10
2N	72	0.36	0.03	0.01	0.03	0*	0.04	11.69
3P	72	0.96	0.06	0.06	0.04	0*	0.09	9.55
4P	72	1.03	0.06	0.18	0.06	0*	0.19	18.81
5P	72	1.41	0.11	0.14	0.15	0.06	0.24	17.00
6P	72	1.73	0.10	0.27	0*	0.11	0.31	18.10
7P	72	1.74	0.12	0.21	0*	0*	0.24	13.78
8P†	70	1.95	N/A‡	N/A‡	N/A‡	N/A‡	0.47	23.80
9P	72	5.21	0.34	0.44	0.21	0*	0.59	11.36
10P	72	7.67	0.46	0.63	0.71	0*	1.05	13.70
11N	72	0.13	0.01	0.01	0.01	0*	0.02	16.89
12N	72	0.17	0.03	0.06	0.03	0*	0.07	39.14
13N	72	0.15	0.02	0.02	0*	0.01	0.03	17.01

* Les composants de variance négative sont réglés à la valeur zéro.

† Deux réplicats non valides de l'élément de panel 8P empêchent l'analyse des composants de variance en raison de groupes de tailles inégales pour la comparaison.

‡ N/A : analyse de variance impossible en raison d'un nombre de réplicats plus petit par rapport aux autres éléments du panel.

Reproductibilité des échantillons cliniques en solution PreservCyt

Analyse manuelle

La reproductibilité de l'analyse manuelle d'échantillons en solution PreservCyt avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA a été déterminée lors d'une étude utilisant 24 échantillons de simulation en diverses concentrations d'ADN de HPV. Les échantillons consistent en une solution de PreservCyt et en lymphocytes, avec ou sans bactéries contenant le plasmide du HPV 16.

Les échantillons ont été testés en réplicats de 4 éléments tous les jours d'une période de 5 jours pour un total de 20 réplicats par échantillon. Chaque jour de la période d'étude de 5 jours, un échantillon de 8 ml est préparé à partir de chaque prélèvement selon la notice d'instructions du kit *digene* HC2 Sample Conversion et est analysé. La moyenne et l'IC à 95 % sont calculés (voir le tableau 36, ci-dessous).

Tableau 36. Reproductibilité d'échantillons en solution PreservCyt — analyse manuelle d'échantillons préparés manuellement ; reproductibilité qualitative (ordre décroissant par valeur de RLU/CO moyenne)

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

Pour les 6 échantillons présentant un rapport RLU/CO moyen supérieur de 20 %, ou plus, à la valeur de CO, 114 répliqués sur 120 (95,0 %) se sont révélés positifs. Pour les 7 échantillons présentant un rapport RLU/CO moyen dans la plage des 20 % supérieurs ou inférieurs au CO, 88 répliqués sur 139 (63,3 % ; IC à 95 % = 54,3-70,9) se sont révélés positifs et 51 sur 139 (36,7 %) négatifs. Pour les 4 échantillons dans la plage des 10 % supérieurs ou inférieurs à la valeur de CO, 41 répliqués sur 79 (51,9 %) se sont révélés positifs et 38 sur 79 (48,1 %) négatifs. Pour les 11 échantillons présentant un rapport RLU/CO moyen inférieur de 20 %, ou plus, à la valeur de CO, 220 répliqués sur 220 (100 %) se sont révélés négatifs.

Les résultats indiquent que les échantillons éloignés de 20 % ou plus de la valeur de CO sont en mesure de fournir des résultats cohérents. Les échantillons dont les résultats sont proches de la valeur de CO donnent des résultats positifs et négatifs en nombres à peu près égaux. Ces données démontrent que l'analyse manuelle d'échantillons en solution PreservCyt à l'aide du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA fournit des résultats reproductibles.

Analyse automatique par RCS d'échantillons préparés manuellement

Une étude interne sur l'analyse automatique par RCS a été réalisée en utilisant des échantillons cliniques en solution PreservCyt provenant essentiellement de femmes présentant un résultat de cytologie de type ASC-US ou de grade supérieur à ASC-US (prévalence de HPV de 57 %). Les échantillons ont été répartis en 2 fractions aliquotes ; chaque fraction aliquote a ensuite été traitée individuellement à l'aide du kit *digene* HC2 Sample Conversion et testée en duplicat avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

À l'instar d'autres tests d'IVD qualitatifs, la variabilité des résultats du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA obtenus avec les échantillons cliniques est avant tout associée à un ou plusieurs des éléments suivants : le prélèvement de l'échantillon, la préparation de l'échantillon et la procédure d'analyse. Comme les résultats de comparaison de test proviennent du même échantillon clinique, le plan expérimental permet de contrôler la variabilité liée au prélèvement d'échantillon. La répétabilité des résultats obtenus à partir de 2 fractions aliquotes préparées individuellement et provenant du même échantillon clinique (que l'on désignera ci-dessous par l'expression « entre fractions aliquotes préparées ») reflète la variation due à la combinaison préparation d'échantillon et procédure d'analyse. La répétabilité des résultats obtenus à partir de la même fraction aliquote d'échantillon (que l'on désignera ci-dessous par l'expression « au sein de la fraction aliquote préparée ») reflète la variation liée à la procédure d'analyse seule (voir le tableau 37, ci-dessous).

Tableau 37. Reproductibilité d'échantillons en solution PreservCyt — analyse automatique par RCS d'échantillons préparés manuellement ; reproductibilité qualitative

Analyse	Concordance positive (%)	Concordance négative (%)	Concordance globale (%)	
	(n/N)	(n/N)	(n/N)	
	IC à 95 %	IC à 95 %	IC à 95 %	
Au sein de la fraction aliquote préparée	Données totales	99.62 (261/262)	94.7 (160/169)	97.7 (421/431)
		97.9–100.0	90.1–97.5	95.8–98.9
	Régions fortement positives et fortement négatives	100.0 (249/249)	98.2 (160/163)	99.3 (409/412)
		98.5–100.0	94.7–99.6	97.9–99.9
Entre fractions aliquotes préparées	Données totales	99.6 (264/265)	98.2 (163/166)	99.1 (427/431)
		97.9–100.0	94.8–99.6	97.6–99.8
	Régions fortement positives et fortement négatives	100.0 (249/249)	99.4 (161/162)	99.8 (410/411)
		98.5–100.0	96.6–100.0	98.7–100.0

Une étude supplémentaire a été réalisée pour évaluer la reproductibilité quantitative de résultats obtenus par analyse automatique par RCS d'échantillons de simulation en solution PreservCyt. Trois sites d'analyse, dont celui de QIAGEN, ont participé à l'étude.

Chaque laboratoire d'analyse a effectué à la fois l'analyse automatique par RCS et l'analyse manuelle du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA deux fois par jour pendant 5 jours différents avec un panel de reproductibilité fourni de 6 éléments. Chaque élément de panel était composé de cellules en culture inoculées dans une solution de PreservCyt censées produire un rapport RLU/CO approximatif (voir le tableau 38, ci-dessous).

Les éléments de panel positifs à l'ADN de HPV ont été préparés en ajoutant diverses quantités de cellules SiHa positives pour l'ADN de HPV (dérivées d'une lignée cellulaire de laboratoire). L'élément de panel négatif était composé de cellules négatives pour le HPV (dérivées d'une lignée cellulaire d'un laboratoire différent). La concentration cellulaire finale de l'ensemble des 6 éléments de panel était d'environ 5×10^4 cellules/ml.

Tableau 38. Reproductibilité d'échantillons en solution PreservCyt — analyse automatique par RCS d'échantillons préparés manuellement ; éléments d'un panel de reproductibilité quantitative

Élément du panel	Type de cellule	Valeur RLU/CO approximative	Résultat attendu
1N	Jurkat	<1.0	Négatif
2N	Jurkat	<1.0	Négatif
3P	SiHa et Jurkat	5.0–8.0	Faiblement positif
4P	SiHa et Jurkat	5.0–8.0	Faiblement positif
5P	SiHa	30.0–50.0	Modérément positif
6P	SiHa	200.0	Fortement positif

La reproductibilité a été calculée selon la méthode décrite dans la norme NCCLS E5-A* (voir le tableau 39, ci-dessous). Cette méthode nécessite le calcul de composants de variance pour chacune des sources de variabilité : laboratoire, jour du test, cycle et erreur (que l'on définit comme la variation inter-essai et entre essais). Chacun des 6 éléments du panel a été testé en quadruplicat lors de chacun des 10 cycles (2 cycles par jour d'une période d'analyse de 5 jours) dans chacun des 3 laboratoires d'analyse.

Tableau 39. Reproductibilité d'échantillons en solution PreservCyt — analyse automatique par RCS d'échantillons préparés manuellement ; reproductibilité quantitative

Élément du panel	n	Moyenne RLU/CO	Écart type				Total	Total CV (%)
			Au sein d'un cycle	Entre des cycles	Entre différents jours	Entre différents laboratoires		
1N	120	0.20	0.04	0.01	0.01	0.08	0.089	44.4
2N	120	0.20	0.06	0.01	0*	0.08	0.10	52.2
3P	120	4.05	0.76	1.17	0*	0.26	1.42	35.1
4P	120	4.23	0.74	0.86	0*	0.31	1.18	27.8
5P	120	28.6	5.00	5.61	4.41	0*	8.71	30.5
6P	120	214.6	33.95	27.25	18.09	25.53	53.61	25.0

* Les composants de variance négative sont réglés à la valeur zéro..

Pour compléter cette première étude de reproductibilité avec des données d'échantillons très proches de la valeur de seuil de l'essai, une étude de précision supplémentaire a été menée dans un site externe à QIAGEN en utilisant le système RCS.

Le panel comprend 1 élément négatif, 2 éléments négatifs ou faiblement positifs et 2 éléments faiblement positifs. Chaque élément de panel a été préparé en inoculant des cellules Jurkat et SiHa en culture à une solution de PreservCyt de manière à obtenir les valeurs RLU/CO cibles (voir le tableau 40, ci-dessous).

Ce site externe a effectué une analyse automatique par RCS en utilisant un lot unique de réactifs du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA pour chaque cycle de test, le test étant réalisé 2 fois par jour pendant 3 jours différents en utilisant un panel fourni de 5 éléments d'échantillons de simulation en solution PreservCyt. Chaque élément du panel est réparti en 4 échantillons et les 4 échantillons ont tous été testés sur la même microplaque (voir le tableau 41, ci-dessous).

Tableau 40. Reproductibilité d'échantillons en solution PreservCyt – analyse automatique par RCS d'échantillons préparés manuellement ; reproductibilité quantitative près de la valeur de CO d'essai des éléments du panel

Élément du panel	Valeur RLU/CO approximative	Résultat attendu
1N	0.2	Négatif
2N	0.8–1.2	Fortement négatif/faiblement positif
3P	0.8–1.2	Fortement négatif/faiblement positif
4P	1.2–2.0	Faiblement positif
5P	1.2–2.0	Faiblement positif

Tableau 41. Reproductibilité d'échantillons en solution PreservCyt – analyse automatique par RCS d'échantillons préparés manuellement ; reproductibilité quantitative près de la valeur de CO d'essai

Élément du panel	n	Moyenne RLU/CO	Écart type			Total	Total CV (%)
			Au sein d'un cycle	Entre des cycles	Entre différents jours		
1N	24	0.14	0.01	0*	0.02	0.02	15.12
2N	24	1.39	0.14	0.15	0*	0.21	14.84
3P	24	1.31	0.16	0*	0.11	0.19	14.70
4P	24	1.74	0.13	0.21	0.18	0.31	17.73
5P	24	1.63	0.24	0.20	0.26	0.40	24.63

* Les composants de variance négative sont réglés à la valeur zéro.

Préparation d'échantillons avec le kit QIASymphony DSP HPV Media.

Une étude interne de la préparation d'échantillons à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media a été menée sur des échantillons cliniques en solution PreservCyt prélevés chez des femmes présentant l'un des deux résultats de cytologie suivants :

- égaux à ASC-US ou de grade supérieur
- négatifs pour les lésions intraépithéliales ou les lésions malignes (NILM)

Deux échantillons ont été retirés de chaque échantillon de prélèvement. Chaque échantillon a été préparé individuellement en utilisant le kit QIASymphony DSP HPV Media et les résultats ont été déterminés par une analyse automatique par RCS avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

À l'instar d'autres tests d'IVD qualitatifs, la variabilité des résultats du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA obtenus avec les échantillons cliniques est avant tout associée à un ou plusieurs des éléments suivants : le prélèvement de l'échantillon, la préparation de l'échantillon et la procédure d'analyse. Comme les résultats de comparaison de test proviennent du même échantillon clinique (que l'on désignera par l'expression « entre échantillons »), le plan expérimental permet de contrôler la variabilité liée au prélèvement d'échantillon. La reproductibilité des résultats (voir le tableau 42, ci-dessous) obtenus à partir de 2 échantillons préparés individuellement provenant du même échantillon clinique reflète la variation liée à la préparation d'échantillon et à la procédure d'analyse.

Tableau 42. Reproductibilité des échantillons en solution PreservCyt — préparation d'échantillons à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media ; reproductibilité qualitative entre échantillons

Concordance positive (%) (n/N) IC à 95 %	Concordance négative (%) (n/N) IC à 95 %	Concordance globale (%) (n/N) IC à 95 %
99.0 (95/96) 94.3–99.8	96.4 (161/167) 92.4–98.3	97.3 (256/263) 94.6–98.7

Une autre étude a été réalisée afin d'évaluer la reproductibilité des résultats avec les échantillons de simulation SurePath. La préparation d'échantillons à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media a été suivie d'une analyse automatique par RCS avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Les 8 éléments positifs du panel ont été préparés en ajoutant des cellules soit SiHa soit HeLa positives pour l'ADN du HPV aux cellules C-33 A négatives pour l'ADN du HPV dans la solution PreservCyt. À l'inverse, les 2 éléments du panel négatifs pour l'ADN du HPV contenaient uniquement des cellules C-33 A négatives pour l'ADN du HPV.

Trois opérateurs différents ont réalisé l'analyse le même jour sur trois appareils QIASymphony SP différents et à l'aide de trois lots différents de kit QIASymphony DSP HPV Media avec les éléments de panel 2N, 3E, 5P, 7P et 9P. Les éléments de panel 2N, 3E, 5P et 7P ont été testés avec 18 réplicats dans le cadre de 3 cycles différents, produisant 54 points de données pour chaque élément de panel. L'élément de panel 9P a été testé avec 16 réplicats dans le cadre de 3 cycles différents, produisant 48 points de données.

Un opérateur a réalisé le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA sur trois jours différents en utilisant trois appareils QIASymphony SP différents et un lot de kit QIASymphony DSP HPV Media avec les éléments de panel 1N, 4E, 6P, 8P et 10P. Les éléments de panel 1N, 4E, 6P et 8P ont été testés avec 18 réplicats dans le cadre de 8 cycles différents, produisant 144 points de données pour chaque élément de panel. L'élément de panel 10P a été testé avec 16 réplicats dans le cadre de 8 cycles différents, produisant 128 points de données.

Pour les éléments de panel présentant un rapport RLU/CO moyen supérieur de 20 %, ou plus, à la valeur de CO, 572 résultats sur 572 (100,0 %) se sont révélés positifs. Pour les éléments de panel présentant un rapport RLU/CO moyen dans la plage des 20 % supérieurs ou inférieurs au CO, 98 résultats sur 198 (49,5 %) se sont révélés positifs et 100 sur 198 (50,5 %), négatifs. Pour les éléments de panel présentant un rapport RLU/CO moyen inférieur de 20 %, ou plus, à la valeur de CO, 198 résultats sur 198 (100,0 %) se sont révélés négatifs (voir le tableau 43, ci-dessous).

Tableau 43. Reproductibilité des échantillons en solution PreservCyt – préparation d'échantillons à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media ; reproductibilité qualitative

Élément du panel	Type de cellule	Moyenne RLU/CO	Écart type	Résultat de test positif (%) (n/N)
1N	C-33 A	0.37	0.05	0 (0/144)
2N	C-33 A	0.41	0.06	0 (0/54)
3E	HeLa et C-33 A	0.81	0.11	6 (3/54)
4E	SiHa et C-33 A	1.09	0.18	66 (95/144)
5P	HeLa et C-33 A	3.17	0.46	100 (54/54)
6P	SiHa et C-33 A	4.81	0.74	100 (144/144)
7P	HeLa et C-33 A	6.77	0.97	100 (54/54)
8P	SiHa et C-33 A	9.41	1.39	100 (144/144)
9P	HeLa et C-33 A	13.72	2.81	100 (48/48)
10P	SiHa et C-33 A	28.13	5.08	100 (128/128)

Les résultats indiquent que les échantillons éloignés de 20 % ou plus de la valeur de CO sont en mesure de fournir des résultats cohérents. Les échantillons dont les résultats sont proches de la valeur de CO donnent des résultats positifs et négatifs en nombres à peu près égaux. Ces données démontrent que la préparation d'échantillons PreservCyt à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media et leur analyse avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA fournissent des résultats reproductibles.

Les résultats de l'étude interne ont également été utilisés pour évaluer la reproductibilité quantitative des résultats obtenus avec la préparation d'échantillons issus d'échantillons en solution PreservCyt à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media (voir les tableaux 44 et 45, ci-dessous).

Tableau 44. Reproductibilité des échantillons en solution PreservCyt — préparation d'échantillons à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media ; reproductibilité quantitative avec le même opérateur

Élément du panel	n	Moyenne RLU/CO	Écart type			Écart type total estimé	CV estimé total (%)
			Au sein des cycles	Entre les cycles	Entre les combinaisons*		
1N	144	0.37	0.04	0.03	0.03	0.06	14.92
4E	144	1.09	0.12	0.11	0.09	0.19	17.24
6P	144	4.81	0.49	0.40	0.42	0.77	15.92
8P	144	9.41	0.96	0.97	0.46	1.44	15.32
10P	128	28.13	4.00	2.04	2.54	5.16	18.35

* Entre combinaisons d'appareils QIASymphony SP et des jours différents.

Tableau 45. Reproductibilité des échantillons en solution PreservCyt — préparation d'échantillons à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media ; reproductibilité quantitative le même jour

Élément du panel	n	Moyenne RLU/CO	Écart type		Écart type total estimé	CV estimé total (%)
			Au sein des cycles	Entre les cycles [†]		
2N	54	0.41	0.04	0.05	0.06	15.86
3E	54	0.81	0.08	0.08	0.12	14.48
5P	54	3.17	0.38	0.33	0.50	15.72
7P	54	6.77	0.92	0.38	1.00	14.73
9P	48	13.72	2.64	1.15	2.88	21.01

[†] Un cycle porte sur la combinaison d'un kit QIASymphony DSP HPV Media, d'un appareil QIASymphony SP et d'un opérateur

La reproductibilité quantitative est très élevée, comme en attestent les valeurs CV, qui sont toutes inférieures à 25 %. Les écarts types entre les cycles sont comparables aux valeurs correspondantes au sein des cycles, ce qui montre la cohérence des résultats, quels que soient l'appareil ou le lot de kit utilisés.

Préparation d'échantillons avec le kit QIASymphony DSP AXpH DNA

Une étude interne de la préparation d'échantillons à l'aide du kit QIASymphony DSP AXpH DNA a été menée sur des échantillons cliniques en solution PreservCyt prélevés chez des femmes présentant des résultats de cytologie soit ASC-US soit NILM. Deux échantillons ont été retirés de chaque échantillon de prélèvement. Chaque échantillon a été préparé individuellement en utilisant le kit QIASymphony DSP AXpH DNA et les résultats ont été déterminés par une analyse automatique par RCS avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

À l'instar d'autres tests d'IVD qualitatifs, la variabilité des résultats du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA obtenus avec les échantillons cliniques est avant tout associée à un ou plusieurs des éléments suivants : le prélèvement de l'échantillon, la préparation de l'échantillon et la procédure d'analyse. Comme les résultats de comparaison de test proviennent du même échantillon clinique (que l'on désignera par l'expression « entre échantillons »), le plan expérimental permet de contrôler la variabilité liée au prélèvement d'échantillon. La reproductibilité des résultats (voir le tableau 46, ci-dessous) obtenus à partir de 2 échantillons préparés individuellement provenant du même échantillon clinique reflète la variation liée à la préparation d'échantillon et à la procédure d'analyse.

Tableau 46. Reproductibilité des échantillons en solution PreservCyt — préparation d'échantillons à l'aide du kit QIASymphony DSP AXpH DNA ; reproductibilité qualitative entre échantillons

Concordance positive (%) (n/N) IC à 95 %	Concordance négative (%) (n/N) IC à 95 %	Concordance globale (%) (n/N) IC à 95 %
95.3 (101/106) 89.4–98.0	96.7 (176/182) 92.3–98.5	96.2 (277/288) 93.3–97.9

Une autre étude a été réalisée afin d'évaluer la reproductibilité des résultats avec les échantillons de simulation SurePath. La préparation d'échantillons à l'aide du kit QIASymphony DSP AXpH DNA a été suivie d'une analyse automatique par RCS avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Trois opérateurs différents ont effectué le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA sur des jours différents en utilisant des appareils différents et des lots de réactifs différents, avec un panel de

9 éléments. Chaque élément du panel a été testé en duplicat dans le cadre de 24 cycles différents, produisant 48 points de données pour chaque élément de panel. Les 8 éléments positifs du panel ont été préparés en ajoutant des cellules soit SiHa soit HeLa positives pour l'ADN du HPV aux cellules H9 négatives pour l'ADN du HPV dans la solution PreservCyt. À l'inverse, l'élément du panel négatif pour l'ADN du HPV contenait uniquement des cellules H9 négatives pour l'ADN du HPV.

Pour les éléments de panel présentant un rapport RLU/CO moyen supérieur de 20 %, ou plus, à la valeur de CO, 237 résultats sur 240 (98,8 %) se sont révélés positifs. Pour les éléments de panel présentant un rapport RLU/CO moyen dans la plage des 20 % supérieurs ou inférieurs à CO, 95 résultats sur 144 (66,0 %) se sont révélés positifs et 49 sur 144 (34,0 %), négatifs. Pour les éléments de panel présentant un rapport RLU/CO moyen inférieur de 20 %, ou plus, à la valeur de CO, 48 résultats sur 48 (100,0 %) se sont révélés négatifs (voir le tableau 47, ci-dessous).

Tableau 47. Reproductibilité des échantillons en solution PreservCyt — préparation d'échantillons à l'aide du kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA ; reproductibilité qualitative

Élément du panel	Type de cellule	Moyenne RLU/CO	Écart type	Résultat de test positif (%) (n/N)
1N	H9	0.17	0.03	0 (0/48)
2E	H9 et HeLa	1.00	0.16	56 (27/48)
3E	H9 et HeLa	1.16	0.57	54 (26/48)
4E	H9 et SiHa	1.18	0.23	88 (42/48)
5P	H9 et SiHa	1.89	0.20	100 (48/48)
6P	H9 et HeLa	2.05	0.43	96 (46/48)
7P	H9 et SiHa	2.97	0.45	100 (48/48)
8P	H9 et HeLa	5.67	0.61	100 (48/48)
9P	H9 et SiHa	9.91	1.63	98 (47/48)

Les résultats indiquent que les échantillons éloignés de 20 % ou plus de la valeur de CO sont en mesure de fournir des résultats cohérents. Les échantillons dont les résultats sont proches de la valeur de CO donnent des résultats positifs et négatifs en nombres à peu près égaux. Ces données démontrent que la préparation d'échantillons en solution PreservCyt à l'aide du kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA et leur analyse avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA fournissent des résultats reproductibles.

Les résultats de l'étude interne ont également été utilisés pour évaluer la reproductibilité quantitative des résultats obtenus avec la préparation d'échantillons issus d'échantillons en solution PreservCyt à l'aide du kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA (voir le tableau 48, ci-dessous).

Tableau 48. Reproductibilité des échantillons en solution PreservCyt — préparation d'échantillons à l'aide du kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA ; reproductibilité quantitative

Élément du panel	n	Moyenne RLU/CO	Écart type			Écart type total estimé	CV estimé total (%)
			Au sein des cycles	Entre les cycles	Entre les combinaisons*		
1N	48	0.17	0.02	0.02	0.01	0.03	18.13
2E	48	1.00	0.14	0.05	0.06	0.16	16.20
3E	48	1.16	0.48	0.22	0.23	0.57	49.27
4E	48	1.18	0.16	0.14	0.10	0.23	19.63
5P	48	1.89	0.09	0.09	0.16	0.20	10.63
6P	48	2.05	0.18	0.34	0.19	0.43	20.83
7P	48	2.97	0.27	0.23	0.28	0.45	15.14
8P	48	5.67	0.35	0.44	0.24	0.61	10.85
9P	48	9.91	1.36	0.55	0.71	1.63	16.42

*Entre les combinaisons de kits de test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, de kits QIAAsymphony DSP AXpH DNA, d'appareils RCS utilisés, d'appareils QIAAsymphony SP utilisés et d'opérateurs.

Reproductibilité d'échantillons cliniques en solution SurePath

Analyse manuelle

La reproductibilité de l'analyse manuelle d'échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA a été déterminée lors d'une étude effectuée dans 3 laboratoires différents. Les éléments du panel ont été testés en utilisant une valeur de CO de 1,0 RLU/CO sur des jours différents et des cycles différents et en utilisant un jeu identique d'éléments du panel dont le caractère positif ou négatif pour le HPV est connu. Le panel consiste en 5 éléments positifs, 2 éléments fortement négatifs/faiblement positifs et 5 éléments négatifs.

Chaque élément de panel a été préparé en combinant des échantillons cliniques uniques prélevés dans du liquide conservateur SurePath et présentant un caractère négatif ou positif connu pour le HPV, afin d'obtenir les valeurs de RLU/CO cibles souhaitées. Chaque élément de panel a été testé en duplicat, deux fois par jour, sur une période de 5 jours au sein de chacun des 3 laboratoires participants (voir le tableau 49, ci-dessous).

Tableau 49. Reproductibilité d'échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath — analyse manuelle ; reproductibilité qualitative

Élément du panel	Moyenne RLU/CO	Résultat de test positif (%) (n/N)
1	0.20	0.0 (0/60)
2	0.21	0.0 (0/60)
3	0.22	0.0 (0/60)
4	0.28	3.3 (2/60)
5	0.36	3.3 (2/60)
6	0.83	21.7 (13/60)
7	1.17	43.3 (26/60)
8	19.47	100.0 (60/60)
9	25.65	100.0 (60/60)
10	81.52	100.0 (60/60)
11	154.18	100.0 (60/60)
12	765.29	100.0 (60/60)

RCS-automated testing

La reproductibilité des résultats d'échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath obtenus par analyse automatique par RCS a été comparée aux résultats obtenus dans le cadre de l'analyse manuelle. Deux fractions aliquotes distinctes issues du même échantillon de culot cellulaire post-gradient SurePath traité (provenant du même échantillon en solution) ont été testées (voir le tableau 50, ci-dessous).

Tableau 50. Reproductibilité d'échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath — analyse automatique par RCS ; concordance des résultats entre l'analyse automatique par RCS et l'analyse manuelle

Concordance positive (%) (n/N) IC à 95 %		Concordance négative (%) (n/N) IC à 95 %	
Tous positifs	Région fortement positive (RLU/CO ≥ 2,5)	Tous négatifs	Région fortement négative (RLU/CO < 0,80)
99.0 (417/421) 97.6–99.7	100.0 (375/375) 99.0–100.0	97.7 (1057/1079) 96.9–98.75	98.7 (1050/1064) 97.8–99.28

Préparation d'échantillons en solution SurePath à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media

Une étude a été réalisée afin d'évaluer la reproductibilité des résultats avec les échantillons de simulation SurePath. La préparation d'échantillons à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media a été suivie d'une analyse automatique par RCS avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Les 4 éléments positifs du panel ont été préparés en ajoutant des cellules SiHa positives pour l'ADN du HPV aux cellules H-9 négatives pour l'ADN du HPV dans le liquide conservateur SurePath. À l'inverse, l'élément du panel négatif pour l'ADN du HPV contenait uniquement des cellules H-9 négatives pour l'ADN du HPV dans du liquide conservateur SurePath.

Trois opérateurs différents ont réalisé l'analyse sur 6 jours différents en utilisant 3 appareils QIASymphony SP différents et 3 lots différents de kit QIASymphony DSP HPV Media avec les éléments de panel 1N, 2E, 3P, 4P et 5P. Les éléments de panel 1N, 2E, 3P et 4P ont été testés avec 18 réplicats au cours de 37 cycles différents, produisant 666 points de données pour les éléments de panel 2E et 3P 665 points de données pour les éléments de panel 1N et 4P. L'élément de panel 5P a été testé avec 16 réplicats dans le cadre de 37 cycles différents, produisant 590 points de données. Quatre points de données ont été exclus en raison d'un volume insuffisant comme l'a indiqué l'appareil QIASymphony SP pendant la préparation des échantillons.

Pour les éléments de panel présentant un rapport RLU/CO moyen supérieur de 20 %, ou plus, à la valeur de CO, 1 921 résultats sur 1 921 (100,0 %) se sont révélés positifs. Pour les éléments de panel présentant un rapport RLU/CO moyen dans la plage des 20 % supérieurs ou inférieurs au CO, 410 résultats sur 666 (61,6 %) se sont révélés positifs et 256 sur 666 (38,4 %), négatifs. Pour les éléments de panel présentant un rapport RLU/CO moyen inférieur de 20 %, ou plus, à la valeur de CO, 664 résultats sur 665 (99,8 %) se sont révélés négatifs (voir le tableau 51, ci-dessous)

Tableau 51. Reproductibilité des échantillons en solution SurePath — préparation d'échantillons à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media ; reproductibilité qualitative

Élément du panel	Type de cellule	Moyenne RLU/CO	Écart type	Résultat de test positif (%) (n/N)
1N	H-9	0.38	0.06	0.2 (1/665)
2E	SiHa et H-9	1.06	0.17	61.6 (410/666)
3P	SiHa et H-9	4.51	0.78	100.0 (666/666)
4P	SiHa et H-9	8.34	1.57	100.0 (665/665)
5P	SiHa et H-9	24.69	5.12	100.0 (590/590)

Les résultats indiquent que les échantillons en solution SurePath éloignés de 20 % ou plus de la valeur de CO sont en mesure de fournir des résultats cohérents. Les échantillons en solution SurePath dont les résultats sont proches de la valeur de CO donnent des résultats positifs et négatifs en nombres à peu près égaux. Ces données démontrent que la préparation d'échantillons en solution SurePath à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media et leur analyse avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA fournissent des résultats reproductibles.

Les résultats de l'étude interne ont également été utilisés pour évaluer la reproductibilité quantitative des résultats obtenus avec la préparation d'échantillons issus d'échantillons en solution SurePath à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media (voir le tableau 51, ci-dessous).

Trois opérateurs différents ont réalisé l'analyse sur 6 jours différents en utilisant 3 appareils QIASymphony SP différents et 3 lots différents de kit QIASymphony DSP HPV Media avec les éléments de panel 1N, 2E, 3P, 4P et 5P. Les éléments de panel 1N, 2E, 3P et 4P ont été testés avec 18 réplicats, produisant 162 points de données pour chaque élément de panel. L'élément de panel 5P a été testé avec 16 réplicats, produisant 144 points de données (voir le tableau 52 ci-dessous).

Tableau 52. Reproductibilité des échantillons en solution SurePath — préparation d'échantillons à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media ; reproductibilité quantitative

Élément du panel	n	Moyenne RLU/CO	Écart type			Écart type total estimé	CV estimé total (%)
			Au sein des cycles	Entre les jours	Entre les combinaisons*		
1N	162	0.37	0.06	0.02	0.03	0.07	19.18
2E	162	1.05	0.14	0.07	0.10	0.18	17.41
3P	162	4.40	0.62	0.00	0.43	0.75	17.09
4P	162	8.24	1.15	1.01	1.34	1.77	21.42
5P	144	23.89	3.95	4.10	4.67	6.11	25.59

* Un cycle porte sur la combinaison d'un kit QIASymphony DSP HPV Media, d'un appareil QIASymphony SP et d'un opérateur..

La reproductibilité quantitative est très élevée, comme en attestent les valeurs CV, qui sont toutes inférieures à 26 %. Les écarts types entre les cycles sont comparables aux valeurs correspondantes au sein des cycles, ce qui montre la cohérence des résultats, quels que soient l'appareil ou le lot de kit utilisés.

Préparation d'échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media

Une étude a été réalisée afin d'évaluer la reproductibilité des résultats avec les échantillons de simulation de culot cellulaire post-gradient SurePath. La préparation d'échantillons à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media a été suivie d'une analyse automatique par RCS avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Du matériel de culture cellulaire dans du liquide conservateur SurePath à 70 % a été utilisé pour imiter les échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath. Les 4 éléments positifs du panel ont été préparés en ajoutant des cellules SiHa positives pour l'ADN du HPV aux cellules H-9 négatives pour l'ADN du HPV dans le liquide conservateur SurePath. À l'inverse, l'élément du panel négatif pour l'ADN du HPV contenait uniquement des cellules H-9 négatives pour l'ADN du HPV dans du liquide conservateur SurePath.

Quatre opérateurs différents ont réalisé l'analyse sur 6 jours différents en utilisant 3 appareils QIASymphony SP différents et 3 lots différents de kit QIASymphony DSP HPV Media avec les éléments de panel 1, 2, 3, 4 et 5. Les éléments de panel 1, 2, 3 et 4 ont été testés avec 18 réplicats au cours de 37 cycles différents, produisant 666 points de données pour les éléments de panel 1 et 3 et 665 points de données pour les éléments de panel 2 et 4. Deux points de données ont été exclus en raison d'un volume insuffisant comme l'a indiqué l'appareil QIASymphony SP pendant la préparation des échantillons. L'élément de panel 5 a été testé avec 16 réplicats dans le cadre de 37 cycles différents, produisant 592 points de données.

Pour les éléments de panel présentant un rapport RLU/CO moyen supérieur de 20 %, ou plus, à la valeur de CO, 1.923 résultats sur 1.923 (100,0 %) se sont révélés positifs. Pour les éléments de panel présentant un rapport RLU/CO moyen dans la plage des 20 % supérieurs ou inférieurs au CO, 416 résultats sur 665 (62,6 %) se sont révélés positifs et 249 sur 665 (37,4 %), négatifs. Pour les éléments de panel présentant un rapport RLU/CO moyen inférieur de 20 %, ou plus, à la valeur de CO, 666 résultats sur 666 (100 %) se sont révélés négatifs (voir le tableau 53, ci-dessous).

Tableau 53. Reproductibilité des échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath — préparation d'échantillons à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media ; reproductibilité qualitative

Élément du panel	Type de cellule	Moyenne RLU/CO	Écart type	CV (%)	Résultat de test positif (%) (n/N)
1	H-9	0.12	0.02	18.77	0.0 (0/666)
2	SiHa et H-9	0.96	0.11	11.15	62.6 (416/665)
3	SiHa et H-9	4.72	0.56	11.89	100.0 (666/666)
4	SiHa et H-9	9.34	0.98	10.46	100.0 (665/665)
5	SiHa et H-9	24.9	3.37	13.55	100.0 (592/592)

Les résultats indiquent que les échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath éloignés de 20 % ou plus de la valeur de CO sont en mesure de fournir des résultats cohérents. Les échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath dont les résultats sont proches de la valeur de CO donnent des résultats positifs et négatifs en nombres à peu près égaux. Ces données démontrent que la préparation d'échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media et leur analyse avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA fournissent des résultats reproductibles.

Les résultats de l'étude interne ont également été utilisés pour évaluer la reproductibilité quantitative des résultats obtenus avec la préparation d'échantillons issus d'échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media.

Quatre opérateurs différents ont réalisé l'analyse sur 6 jours différents en utilisant 3 appareils QIASymphony SP différents et 3 lots différents de kit QIASymphony DSP HPV Media avec les éléments de panel 1, 2, 3, 4 et 5. Les éléments de panel 1, 2, 3 et 4 ont été testés avec 18 réplicats, produisant 162 points de données pour chaque élément de panel. L'élément de panel 5 a été testé avec 16 réplicats, produisant 144 points de données (voir le tableau 54 ci-dessous).

Tableau 54. Reproductibilité des échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath — préparation d'échantillons à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media ; reproductibilité quantitative

Élément du panel	n	Moyenne RLU/CO	Écart type			Écart type total estimé	CV estimé total (%)
			Au sein des cycles	Entre les jours	Entre les combinaisons*		
1	162	0.12	0.02	0.00	0.01	0.02	19.80
2	162	1.00	0.08	0.02	0.06	0.10	10.27
3	162	4.99	0.37	0.13	0.38	0.55	11.00
4	162	9.78	0.61	0.23	0.54	0.85	8.72
5	144	26.40	2.19	0.70	1.51	2.75	10.41

* Entre les combinaisons de jours, d'opérateurs, de lots de kit QIASymphony DSP HPV Media et d'instruments QIASymphony SP différents.

La reproductibilité quantitative est très élevée, comme en attestent les valeurs CV, qui sont toutes inférieures à 20 %. Les écarts types entre les cycles sont comparables aux valeurs correspondantes au sein des cycles, ce qui montre la cohérence des résultats, quels que soient l'appareil ou le lot de kit utilisés.

Réactivité croisée

Une collection de bactéries, de virus et de plasmides couramment rencontrés dans le tractus ano-génital féminin, ainsi qu'un éventail de types de HPV cutanéotrophiques pour lesquels des clones étaient disponibles, ont été testés pour déterminer une éventuelle réactivité croisée avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Tous les micro-organismes ont été testés à des concentrations comprises entre 1×10^5 et 1×10^7 organismes par ml. L'ADN purifié des virus et des plasmides a été testé en concentration de 4 ng/ml.

Les bactéries suivantes ont été testées et toutes ont donné des résultats négatifs avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA :

- *Acinetobacter anitratus*
- *Acinetobacter lwoffii* (ATCC 17908)
- *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285)
- *Bacteroides melaninogenicus*
- *Candida albicans* (ATCC 14053 ou 10231)
- *Chlamydia trachomatis*
- *Enterobacter cloacae*

- Escherichia coli (HB101)*
- Escherichia coli
- Fusobacterium nucleatum
- Gardnerella vaginalis
- Haemophilus ducreyi
- Klebsiella pneumoniae
- Lactobacillus acidophilus
- Mobiluncus curtisii
- Mobiluncus mulieris
- Mycoplasma hominis
- Mycoplasma hyorhinis
- Neisseria gonorrhoeae (ATCC 19424)
- Neisseria lactamica (NRL 2118)
- Neisseria meningitidis (ATCC 13077)
- Neisseria sicca (ATCC 29256)
- Peptostreptococcus anaerobius
- Proteus vulgaris (ATCC 21117, 8427, 33420)
- Serratia marcescens
- Staphylococcus aureus (souche Cowan)
- Staphylococcus epidermidis
- Streptococcus faecalis (ATCC 14508)
- Streptococcus pyogenes (ATCC 27762)
- Treponema pallidum
- Trichomonas vaginalis
- Ureaplasma urealyticum

Les ADN viraux ou plasmidiques suivants, ou du sérum humain, ont été testés et tous ont donné des résultats négatifs avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA :

- Adénovirus 2
- Cytomégalovirus
- Virus d'Epstein-Barr

* La souche *E. coli* utilisée pour l'amplification des plasmides (HB101) et un isolat clinique de l'espèce *E. coli* ont tout deux été testés.

- Sérums positifs pour l'antigène de surface de l'hépatite B
- Herpes simplex I
- Herpes simplex II
- Virus de l'immunodéficience humaine (HIV, ADN de RT)
- HPV de types 1, 2, 3, 4, 5, 8, 13 et 30
- Virus simien de type 40 (SV40)

Le seul plasmide présentant une réactivité croisée dans le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA est le plasmide pBR322. Cette réactivité croisée entre le plasmide pBR322 et le mélange de sondes n'est pas surprenante, car il est difficile d'éliminer tout l'ADN du vecteur pBR322 lorsque l'on isole l'insert de HPV. La présence de séquences homologues du plasmide pBR322 a été décrite dans des échantillons génitaux humains et des résultats faussement positifs peuvent être obtenus en présence de niveaux élevés de ce plasmide bactérien. Toutefois, 298 échantillons cliniques analysés positifs avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA n'ont pas donné de résultats positifs pour le plasmide pBR322 lorsqu'ils étaient testés avec une sonde du plasmide pBR322. En conséquence, il est peu probable qu'un résultat faussement positif avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA soit dû à des séquences de plasmide pBR322 homologues dans les échantillons cliniques.

Hybridation croisée

Dix-huit types de HPV différents (haut risque et bas risque) ont été analysés avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA à des concentrations d'ADN de HPV de 4 ng/ml. Toutes les cibles de HPV à haut risque se sont révélées positives. Cette étude montre également qu'une légère hybridation croisée se produit entre les HPV de types 6 et 42 et le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Des échantillons de patientes contenant des niveaux élevés (4 ng/ml ou plus) de HPV de type 6 ou 42 peuvent générer des résultats faussement positifs avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. La signification clinique de ce résultat est que des patientes présentant 4 ng/ml ou plus d'ADN de HPV de type 6 ou 42 pourraient être inutilement orientées vers une coloscopie.

Une réactivité croisée entre le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA et les HPV de types 40, 53 et 66 est également observée. Ces types sont rares et l'on ne dispose pas de preuves suffisantes pour établir la corrélation exacte entre une infection par ces types et le développement de lésions de haut grade (15). Il est également décrit dans la littérature que des sondes complexes similaires à celles utilisées dans ce test pouvaient engendrer des résultats faussement positifs en raison d'une hybridation croisée avec les HPV de types 11, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 ou MM9 (35). Bien que plusieurs de ces types de HPV soient rares ou d'un genre nouveau rarement associé avec des lésions de haut grade, les patientes dont les échantillons contiennent des

niveaux élevés de ces types d'ADN de HPV peuvent être inutilement orientées vers une colposcopie.

Effet du sang et d'autres substances sur les échantillons en solution STM

L'effet du sang et d'autres substances définies ou indéfinies potentiellement interférentes a été évalué dans le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Du sang total, des produits de douche intime, une crème antifongique et un gel contraceptif (des agents fréquemment présents dans les échantillons cervicaux) ont été ajoutés à des échantillons négatifs et positifs en milieu STM (lots d'échantillons cliniques et échantillons non cliniques) à des concentrations similaires à celles trouvées dans les échantillons cervicaux.

Aucun résultat faussement positif n'a été observé avec les quatre agents, quelle que soit la concentration. Néanmoins, un résultat faussement négatif peut être décrit dans des échantillons cliniques présentant des niveaux d'ADN de HPV proches de la valeur de CO établie pour le test (1 pg/ml) si des concentrations élevées de crème antifongique ou de gel contraceptif sont présentes. Il est cependant très improbable qu'un échantillon clinique soit presque entièrement composé de l'une de ces substances, car le col de l'utérus est habituellement nettoyé avant de prélever des échantillons de frottis cervicaux en vue d'une analyse de HPV.

Effet du sang et d'autres substances sur les échantillons en solution PreservCyt

Préparation manuelle des échantillons

L'effet du sang et d'autres substances définies ou indéfinies potentiellement interférentes et éventuellement présentes dans des échantillons en solution PreservCyt a été évalué dans le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Du sang total, des produits de douche intime, une crème antifongique et un gel contraceptif (des agents fréquemment rencontrés dans les échantillons cervicaux) ont été ajoutés à des lots d'échantillons négatifs et positifs en solution PreservCyt à des concentrations similaires à celles trouvées dans les échantillons cervicaux. Aucun résultat faussement positif ou faussement négatif n'a été observé avec les 4 agents, quelle que soit la concentration. De plus, des substances inhérentes à certains échantillons cliniques n'inhibent pas la détection de l'ADN de HPV par le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Préparation d'échantillons avec le kit QIAasymphony DSP HPV Media

L'effet du sang et d'autres substances pouvant interférer sur les échantillons en solution PreservCyt a été évalué à l'aide du kit QIAasymphony DSP HPV Media pour la préparation d'échantillons et

l'analyse automatique par RCS avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Les effets des substances susceptibles d'interférer suivantes ont été testés :

- Crème antifongique
- Crème anti-inflammatoire
- Sang
- Gel contraceptif
- Produits de douche intime
- Déodorants intimes sous forme d'ovules
- Gel lubrifiant
- Spermicide

Chaque substance a été ajoutée aux lots cliniques négatifs et positifs. Aucun résultat faussement positif ou faussement négatif n'a été observé avec ces substances aux concentrations susceptibles d'être retrouvées dans les échantillons cervicaux. Néanmoins, un résultat faussement négatif peut être décrit dans des échantillons cliniques présentant des niveaux d'ADN de HPV proches de la valeur de CO établie pour le test si des concentrations élevées de crème antifongique, de gel lubrifiant vaginal ou de sang sont présentes. Il est cependant très improbable qu'un échantillon clinique soit presque entièrement composé de l'une de ces substances, car le col de l'utérus est habituellement nettoyé avant de prélever des échantillons de frottis cervicaux en vue d'une analyse de HPV.

Préparation d'échantillons avec le kit QIASymphony DSP AXpH DNA

L'effet du sang total dans des échantillons en solution PreservCyt a été évalué en utilisant le kit QIASymphony DSP AXpH DNA pour la préparation d'échantillons et le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA pour l'analyse. Des échantillons cliniques contenant manifestement du sang sont sélectionnés et analysés en utilisant aussi bien la méthode de préparation manuelle que la méthode de préparation automatique à l'aide du kit QIASymphony DSP AXpH DNA. Les résultats ont été comparés pour 238 échantillons et ont présenté une concordance totale de 94,12 % avec une valeur p de McNemar de 0,2850, indiquant qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative en termes de performance clinique entre la méthode manuelle de préparation d'échantillons et la méthode automatique de préparation d'échantillons avec le kit QIASymphony DSP AXpH DNA.

Les effets des substances susceptibles d'interférer suivantes ont été testés :

- Produits de douche intime

- Crème antifongique
- Gel contraceptif
- Cellules mononucléaires de sang périphérique (PBMC)
- Gel lubrifiant
- Vaporisateur intime
- Spermicide
- Particules magnétiques
- Liquide TopElute

Chaque substance a été ajoutée à des lots de cellules négatives et positives aux concentrations pouvant être rencontrées dans les échantillons cervicaux ou pouvant être ajoutées pendant la préparation des échantillons. Il n'a été observé aucun résultat faussement positif, quelles que soient la substance et la concentration testées. Aucun résultat faussement négatif n'a été observé, à l'exception du gel contraceptif. Ne pas prélever d'échantillon cervical en solution PreservCyt en vue d'une préparation automatique d'échantillons à l'aide du kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA si du gel contraceptif est présent.

Effet du sang et d'autres substances sur les échantillons en solution SurePath

Préparation d'échantillons SurePath à l'aide du kit QIAAsymphony DSP HPV Media

L'effet du sang et d'autres substances pouvant interférer sur les échantillons SurePath a été évalué à l'aide du kit QIAAsymphony DSP HPV Media pour la préparation d'échantillons et l'analyse automatique par RCS avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

- Crème antifongique
- Crème anti-inflammatoire
- Sang
- Gel contraceptif
- Produits de douche intime
- Déodorants intimes sous forme d'ovules
- Gel lubrifiant
- Spermicide

Chaque substance a été ajoutée aux lots cliniques négatifs et positifs. Aucun résultat faussement positif n'a été observé avec ces substances aux concentrations susceptibles d'être retrouvées dans les échantillons cervicaux.

Aucun résultat faussement négatif n'a été observé, sauf en présence des substances suivantes :

- Le gel contraceptif a généré des résultats faussement négatifs à une très faible concentration.
- Si l'échantillon contient une forte concentration de crème antifongique, un résultat faussement négatif risque d'être rapporté dans les échantillons cliniques dont les taux d'ADN du HPV sont proches de la valeur CO définie pour le test. Il est cependant très improbable qu'un échantillon clinique soit presque entièrement composé de crème antifongique, car le col de l'utérus est habituellement nettoyé avant le prélèvement d'échantillons de frottis cervicaux en vue d'une analyse de HPV.

Ne pas prélever d'échantillon cervical en solution SurePath en vue d'une préparation automatique d'échantillons à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media si de la crème antifongique ou du gel contraceptif est présent.

Préparation d'échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media

L'effet du sang et d'autres substances pouvant interférer sur les échantillons de culot cellulaire post-gradient SurePath a été évalué à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media pour la préparation d'échantillons et l'analyse automatique par RCS avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Les effets des substances susceptibles d'interférer suivantes ont été testés :

- Crème antifongique
- Crème anti-inflammatoire
- Sang
- Gel contraceptif
- Produits de douche intime
- Déodorants intimes sous forme d'ovules
- Gel lubrifiant
- Spermicide

Chaque substance a été ajoutée à des lots cliniques négatifs et positifs, qui ont ensuite été traités avec BD PrepMate afin d'imiter un échantillon de culot cellulaire post-gradient SurePath. Un seul résultat faussement positif a été observé pour le sang et la crème antifongique. Cependant, l'analyse statistique n'a mis en évidence aucune interférence significative. Aucun résultat faussement positif n'a été observé avec les autres substances aux concentrations susceptibles d'être retrouvées dans les échantillons cervicaux.

Des résultats faussement négatifs ont été observés pour la crème antifongique, la crème anti-inflammatoire et le gel contraceptif. Ne pas prélever d'échantillon cervical en solution SurePath en vue d'une préparation automatique d'échantillons à l'aide du kit QIASymphony DSP HPV Media si de la crème antifongique, de la crème anti-inflammatoire ou du gel contraceptif est présent.

Contamination par entraînement

Le RCS a été conçu pour minimiser la contamination des échantillons par entraînement de phosphatase alcaline résiduelle due à l'utilisation d'embouts de pipettes jetables pour aspirer les réactifs et les échantillons. Pour confirmer cette caractéristique de conception, QIAGEN a conduit plusieurs études pour évaluer si l'utilisation du RCS augmentait le potentiel d'un entraînement ou d'une contamination croisée des échantillons en comparaison de la méthode manuelle. Plusieurs appareils RCS ont été utilisés pour évaluer le potentiel d'entraînement d'un système à un autre.

Dans une étude, on a ajouté 2 ng et 20 ng d'ADN plasmidique de HPV à une substance de contrôle négatif pour préparer des échantillons en milieu STM fortement positifs. La concentration de 20 ng/ml fournit des valeurs de RLU environ 3-5 fois supérieures à celles de l'échantillon clinique le plus fortement positif que l'on s'attend à observer lors d'une analyse clinique de routine. Ces échantillons de simulation fortement positifs ont été placés dans toute la microplaque selon un motif de damier, en alternance avec des puits ne contenant que le contrôle négatif (puits d'essai). Cette configuration tient compte des effets additifs potentiels d'échantillons séquentiels fortement positifs. Les microplaques sont ensuite analysées en utilisant les deux méthodes d'analyse manuelle et automatique par RCS. Une fois le traitement effectué, les nombres de résultats d'essai faussement positifs sont comparés. L'analyse en mode automatique par RCS n'a pas révélé plus de puits de tests faussement positifs que l'analyse manuelle avec ces échantillons de simulation en milieu STM, même en présence d'une séquence extrêmement élevée d'échantillons positifs dans la microplaque.

Lors d'une seconde évaluation de contamination par entraînement, on a combiné des échantillons en solution PreservCyt provenant de patientes positives pour le HPV pour créer un panel d'échantillons présentant différents niveaux de chimiluminescence afin de produire des valeurs RLU/CO représentatives de la plage attendue au cours d'une analyse clinique automatique de routine par RCS. Les échantillons positifs s'étendent dans la plage approximative de 200-1 800 RLU/CO. Pour évaluer le risque de contamination par entraînement, et notamment les effets additifs potentiels d'échantillons fortement positifs séquentiels, ces éléments de panel positifs ont été placés dans les microplaques selon un motif de damier, en alternance avec des puits contenant du contrôle négatif. Ces plaques sont ensuite testées selon la méthode d'analyse automatique par RCS.

Les résultats de cette évaluation de contamination par entraînement, portant sur des échantillons regroupés de patientes, suggèrent un taux de résultats potentiels faussement positifs de 0,3 % dus aux effets d'entraînement lorsqu'une analyse automatique par RCS est effectuée avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

L'expérience de QIAGEN en matière de réalisation de tests avec des échantillons en solution PreservCyt regroupés suggère que le regroupement d'échantillons de patientes en solution PreservCyt crée des échantillons qui n'affichent pas des caractéristiques similaires à celles d'échantillons d'une patiente unique. Bien que les effets de ce regroupement sur le potentiel de contamination par entraînement de l'analyse automatique par RCS ne soient pas connus, des essais pré-cliniques supplémentaires d'analyse automatique par RCS n'indiquent pas de potentiel accru de résultats faussement positifs dus à un phénomène d'entraînement. Ces évaluations ont été menées en utilisant des échantillons de plasmides artificiels avec des concentrations d'ADN presque 5 fois plus élevées que celles observées dans un environnement clinique.

Une troisième évaluation de contamination par entraînement a consisté à créer des échantillons d'essai en ajoutant un colorant fluorescent à des concentrations représentatives de la plage de RLU dynamique de l'essai à des matrices de fond présentant une viscosité proche de celle des échantillons cliniques et des réactifs du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. Ces échantillons d'essai sont ensuite traités en utilisant 3 appareils de RCS distincts, puis le potentiel d'entraînement de chacune des principales étapes de procédure suivantes du RCS est évalué :

- Transfert de plaque à plaque
- Transfert de l'échantillon
- Addition de la sonde
- Agitation de la microplaque
- Lavage de la microplaque

La fluorescence obtenue est mesurée à une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et à une longueur d'onde d'émission de 535 nm ; la sensibilité s'est révélée suffisante pour détecter une contamination par entraînement de l'ordre de 1:20 000, ce qui correspondrait à un résultat faussement positif avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA (c'est-à-dire 1 pg dans 20 ng). Les résultats de cette évaluation ne montrent aucun événement d'entraînement dans l'une quelconque des principales étapes de la procédure de RCS qui puisse engendrer un résultat faussement positif pour le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Stabilité des réactifs embarqués

QIAGEN a évalué les caractéristiques de performance de l'analyse automatique par RCS dans le cas de l'utilisation de réactifs restés à bord de la plateforme de systèmes sur de longues périodes de temps. Les réactifs les plus à même de rester embarqués sur de longues périodes de temps comprennent le mélange de sondes, le réactif DR1, le réactif DR2 et la microplaque de capture.

La performance du test a été évaluée en utilisant les deux réactifs fraîchement préparés et des réactifs que l'on a laissé « vieillir » à bord de l'appareil de RCS à température ambiante pendant une période de temps de 16 heures (de manière à simuler 2 changements d'équipe dans le laboratoire). L'analyse des échantillons cliniques de simulation a été réalisée en utilisant 2 appareils de RCS sur chacun des 2 jours d'analyse avec une matrice de réactifs définie (voir le tableau 55, ci-dessous).

Tableau 55. Plan d'étude pour la stabilité des réactifs embarqués

Appareil RCS	Jour 1	Jour 2
1	Réactifs vieillis	Réactifs frais
2	Réactifs frais	Réactifs vieillis

Un diagramme de tous les points de données RLU/CO est montré sur la figure 3, ci-dessous. Le diagramme et l'analyse de régression des réactifs vieillis comparés aux réactifs frais indiquent une concordance entre les réactifs vieillis et les réactifs frais.

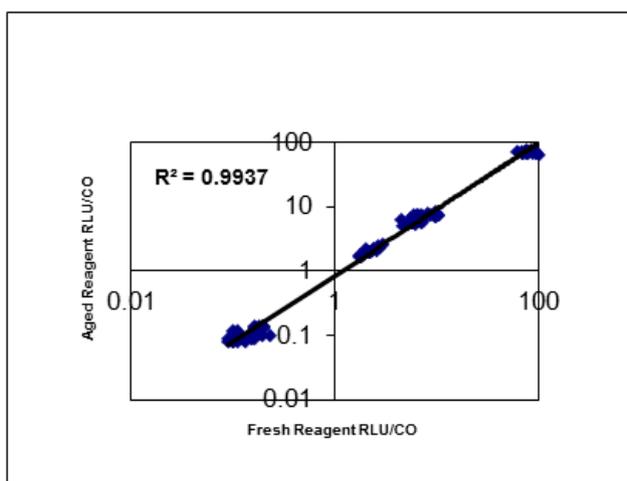


Figure 3. Diagramme de dispersion comparant l'étalon de test aux valeurs contrôles en utilisant des réactifs vieillis et frais.

Une étude plus poussée des résultats de concordance montre qu'aucun résultat qualitatif n'a changé en utilisant les réactifs vieillis (voir le tableau 56, ci-dessous).

Tableau 56. Concordance entre les réactifs frais et vieillis

Mesure statistique	Résultat
Concordance globale (%)	100.0%
(n/N)	(96/96)
IC à 95 %	97.97–100.0
Concordance positive (%)	100.0%
(n/N)	(64/64)
IC à 95 %	97.97–100.0
Concordance négative (%)	100.0%
(n/N)	(32/32)
IC à 95 %	97.97–100.0
R ²	0.9937
Pente	0.97
Intersection avec l'axe y	0.47
Kappa	1.0

L'analyse des données montre que les résultats sont identiques au plan statistique pour les réactifs frais et vieillis, indiquant que les réactifs sont suffisamment stables une fois embarqués dans l'appareil pour une durée allant jusqu'à 16 heures.

Références

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

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

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

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

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

Symboles

Les symboles présentés dans le tableau suivant sont utilisés dans cette notice d'instructions.

Symbole	Définition des symboles
	Contient suffisamment de réactifs pour 96 tests
	Contient suffisamment de réactifs pour 384 tests
	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Référence
	Fabricant
	Représentant autorisé établi dans la Communauté européenne
	À utiliser avant
	Lire le mode d'emploi
	Référence marché international

Résolution des principaux problèmes rencontrés

Commentaires et suggestions

Aucun changement de coloration ou changement de coloration incorrect pendant la dénaturation.

- | | |
|---|--|
| a) Préparation incorrecte du réactif DNR | Vérifier que le réactif DNR contient l'indicateur coloré et présente une couleur violet foncé. |
| b) Absence du réactif DNR | S'assurer que le réactif DNR a été ajouté à l'échantillon en mesurant le volume de l'échantillon (1,5 ml attendu). Si le volume indique que le réactif DNR n'a pas été ajouté, ajouter la quantité appropriée, mélanger et poursuivre le test si le changement de coloration adéquat est observé. |
| c) L'échantillon contient du sang ou d'autres substances qui masquent 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 être affectés de manière défavorable. |
| d) Le pH de l'échantillon peut être anormalement acide | Si aucune des autres causes ne s'applique, l'échantillon peut être anormalement acide, et le changement de coloration attendu ne se produira pas. Prélever un nouvel échantillon avant d'ajouter l'acide acétique sur le col de l'utérus, car un pH incorrect de l'échantillon affectera les résultats du test de manière défavorable. |

Les contrôles de qualité donnent des résultats incorrects

- | | |
|--|---|
| a) Protocole d'essai choisi pour le test incorrect | Si le protocole d'essai est incorrect pour le test effectué, lire à nouveau la microplaque au cours des 30 minutes suivant l'addition du réactif DR2 en utilisant le protocole d'essai approprié. |
| b) Positions QC1-LR et QC2-HR inversées | Tester à nouveau les échantillons. |
| c) Positions HRC et QC2-HR inversées | Tester à nouveau les échantillons. |

Commentaires et suggestions

Changement de coloration incorrect constaté pendant l'hybridation.

- | | |
|--|---|
| a) Mélange insuffisant du mélange de sondes aux étalons, aux contrôles de qualité et/ou aux échantillons dénaturés ; ou mélange de sondes oublié ; ou volume de réactif ajouté incorrect | Agiter la microplaque d'hybridation ou le portoir pour microtubes pendant 2 minutes supplémentaires. Si des microtubes ou des puits de microplaque présentent encore une couleur violette, ajouter 25 µl supplémentaires du mélange de sondes correct et mélanger soigneusement. Si, après avoir ajouté le mélange de sondes et de nouveau mélangé le tout, le changement de coloration correct ne se produit pas et que l'échantillon ne contenait pas de sang ni d'autres substances, analyser à nouveau l'échantillon. |
| b) L'échantillon contient du sang ou d'autres substances qui masquent 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 être affectés de manière défavorable. |
| c) L'échantillon contenait un volume < 1 000 µl de STM | Vérifier le volume de l'échantillon d'origine. Le volume doit être de 1 425 µl ± 20 µl (après prélèvement d'une fraction aliquote de 75 µl pour l'analyse). Si le volume est < 1 425 µl, l'échantillon d'origine contenait une quantité < 1 000 µl de STM. Se procurer un nouvel échantillon. |

Le test ne satisfait pas aux critères de validation de l'essai. Aucun signal observé dans les étalons positifs, les contrôles de qualité ou les échantillons.

- | | |
|---|--|
| a) La sonde n'a pas été ajoutée au diluant de sonde | Préparer un mélange de sondes de la manière décrite dans la présente notice d'instructions. Étiqueter les tubes soigneusement. |
| b) La sonde a été contaminée par de la RNase pendant la préparation | Utiliser des embouts de pipette avec filtre aérosol pour pipeter la sonde et porter des gants. Préparer le mélange de sondes dans un récipient stérile. Utiliser uniquement des réservoirs pour réactifs jetables, neufs et propres. |
| c) Mélange insuffisant du mélange de sondes | Après avoir ajouté la sonde au diluant de sonde, mélanger vigoureusement par vortexage à vitesse élevée pendant au moins 5 secondes. Un tourbillon visible doit se former. |
| d) Mélange insuffisant du mélange de sondes et de | Après avoir ajouté le mélange de sondes et l'échantillon dans chaque puits de la microplaque d'hybridation ou dans chaque microtube d'hybridation, agiter en utilisant le |

Commentaires et suggestions

l'échantillon dénaturé	Rotary Shaker I réglé à $1\ 100 \pm 100$ tr/min pendant 3 ± 2 minutes. Vérifier que la coloration vire du violet au jaune dans chaque puits de microplaque ou microtube.
e) Durée ou température incorrecte à l'étape d'hybridation	Procéder à l'hybridation pendant 60 ± 5 minutes à 65 ± 2 °C. Vérifier la température du Microplate Heater I ou du bain-marie. S'assurer que le Microplate Heater I ou le bain-marie soit réglé pour chauffer les échantillons à la bonne température et ait été préalablement chauffé pendant 60 minutes avant utilisation. S'assurer que le niveau d'eau soit suffisant pour chauffer les échantillons à la bonne température. Les bains-marie doivent être étalonnés périodiquement.
f) Mélange inadéquat au cours de l'étape de capture	Agiter au Rotary Shaker I pendant 60 ± 5 minutes à une température de 20-25 °C comme décrit dans la présente notice d'instructions. Vérifier la vitesse du Rotary Shaker I par calibration. (Se référer au manuel d'utilisation du Rotary Shaker I [<i>Rotary Shaker I User Manual</i>]).
g) Addition d'un volume incorrect de réactif DR1 ou temps d'incubation spécifié incorrect	Distribuer 75 µl de réactif DR1 dans chaque puits de microplaque en utilisant une pipette à 8 canaux. Incuber à une température de 20 à 25 °C pendant 30-45 minutes.
h) Addition d'un volume incorrect de réactif DR2 ou temps d'incubation spécifié incorrect	Distribuer 75 µl de réactif DR2 dans chaque puits de microplaque en utilisant une pipette à 8 canaux. Incuber à une température de 20 à 25 °C pendant 15-30 minutes.
i) Dysfonctionnement du luminomètre DML ou programmation incorrecte	Se référer aux manuels de l'utilisateur applicables pour le luminomètre DML et le logiciel pour obtenir des instructions supplémentaires ou contacter les Services techniques de QIAGEN.

Valeurs RLU élevées pour les étalons, les contrôles de qualité et/ou les échantillons (≥ 200 RLU dans de nombreux puits voire tous les puits de la microplaque). Le test peut ne pas satisfaire les critères de validation d'essai.

a) Le réactif DNR n'a pas été ajouté ; ou un volume incorrect de réactif a été	S'assurer que la pipette à répétition permet une distribution précise avant d'ajouter le réactif DNR. Il est essentiel d'utiliser des pipettes calibrées. Ajouter la moitié
--	---

Commentaires et suggestions

- | | |
|--|---|
| ajouté ; ou le mélange du réactif DNR aux échantillons, aux étalons ou aux contrôles de qualité est insuffisant | du volume de réactif DNR dans chaque tube et mélanger soigneusement. Pour éviter les résultats faussement positifs, s'assurer que le liquide lave l'intégralité de la surface interne du tube. Les étalons, les contrôles de qualité et les échantillons doivent virer au violet une fois le réactif DNR ajouté. |
| b) Fuite de lumière dans le luminomètre DML ; porte non fermée hermétiquement ; étanchéité de porte défectueuse | Vérifier la lecture du bruit de fond (mesure de données brutes) du luminomètre DML en effectuant la lecture d'une microplaque vide. Une valeur supérieure à 50 RLU indique une fuite de lumière. Se référer au manuel d'utilisation du luminomètre DML concerné pour obtenir des instructions supplémentaires ou contacter les Services techniques de QIAGEN. |
| c) Contamination du réactif DR2 ou des puits de la microplaque de capture par le réactif DR1 ou par de la phosphatase alcaline exogène | Voir « Vérification de la contamination du réactif DR2 », page 138. |
| d) Tampon de lavage contaminé | Voir « Vérification de la contamination de l'appareil de lavage et/ou de la source d'alimentation en eau », page 138. |
| e) Automated Plate Washer contaminé | Voir « Vérification de la contamination de l'appareil de lavage et/ou de la source d'alimentation en eau », page 138. |
| f) Lavage inadéquat des puits de la microplaque de capture après incubation du réactif DR1 | Laver soigneusement les puits de la microplaque de capture 6 fois avec le tampon de lavage, en inondant les puits ou en utilisant le laveur Automated Plate Washer. On ne doit pas observer de liquide résiduel rose dans les puits de la microplaque après le lavage. Se référer au manuel d'utilisation du laveur Automated Plate Washer pour plus d'instructions concernant les tests de contamination ou de dysfonctionnements. |
| g) Contamination des puits de microplaque par le réactif DR1 | S'assurer que toutes les surfaces de travail sont propres et sèches. Manipuler le réactif DR1 avec précautions. Éviter les aérosols. |

Commentaires et suggestions

- | | |
|--|--|
| h) Séchage de la solution d'hybridation sur la même zone de lingette Kimtowels ou de papier absorbant non pelucheux équivalent | Ne pas sécher sur des lingettes KimTowels ou un papier absorbant équivalent non pelucheux déjà utilisés. |
| i) Utilisation de lingettes inadaptées | Utiliser des lingettes KimTowels ou un papier absorbant équivalent non pelucheux pour le séchage. |

Rapports PC/NC bas ou nombre élevé d'échantillons faiblement positifs présentant des rapports < 2,0 (> 20 %). Le test peut ne pas satisfaire les critères de validation d'essai.

- | | |
|---|--|
| a) Préparation incorrecte des échantillons | <p>Ajouter le volume de réactif DNR correct et mélanger soigneusement par vortexage. Pour éviter les résultats faussement positifs, s'assurer que le liquide lave l'intégralité de la surface interne du tube.</p> <p>Pour les échantillons en solution PreservCyt, s'assurer que le mélange est suffisant et le culot cellulaire complètement remis en suspension avant l'étape de dénaturation.</p> <p>Un net changement de coloration de violet clair à violet foncé doit être observé. Incuber pendant 45 ± 5 minutes à 65 ± 2 °C.</p> |
| b) Mélange insuffisant du mélange de sondes ou quantité insuffisante de mélange de sondes ajoutée | Préparer le mélange de sondes de la manière décrite. Mélanger soigneusement par vortexage en s'assurant qu'un tourbillon visible se produise. Le mélange de sondes doit être ajouté dans les tubes en utilisant une pipette à déplacement positif ou une pipette multicanaux pour garantir une distribution précise. |
| c) Volume incorrect de mélange de sondes ajouté dans chaque microtube d'hybridation ou puits de microplaque d'hybridation | S'assurer que la pipette à 8 canaux permet une distribution précise avant d'ajouter le mélange de sondes. Ajouter 25 µl de mélange de sondes dans chaque microtube ou puits de microplaque contenant les étalons, les contrôles de qualité et les échantillons dénaturés. La coloration doit virer du violet foncé au jaune une fois l'addition effectuée et le tout soigneusement mélangé. La coloration des échantillons en solution PreservCyt doit virer au rose au lieu du jaune. |
| d) Perte d'activité du réactif | Conserver le réactif DR1 à une température comprise entre |

Commentaires et suggestions

DR1	2 et 8 °C. Utiliser avant la date d'expiration.
e) Capture insuffisante	L'étape de capture doit être réalisée en utilisant un Rotary Shaker I réglé à $1\ 100 \pm 100$ tr/min. Confirmer la vitesse de l'agitateur par calibration.
f) Lavage inadéquat	Laver soigneusement 6 fois les puits de la microplaque avec le tampon de lavage, en inondant les puits ou en utilisant le laveur Automated Plate Washer.
g) Tampon de lavage contaminé	Voir « Vérification de la contamination de l'appareil de lavage et/ou de la source d'alimentation en eau », page 138.

Série d'échantillons positifs présentant des valeurs RLU à peu près identiques

a) Contamination des puits de la microplaque de capture pendant le test	Couvrir la microplaque de capture durant toutes les incubations. Éviter d'exposer les tubes à une contamination par aérosol pendant le test. Porter des gants non poudrés pendant les manipulations.
b) Contamination du réactif DR2	S'assurer de ne pas contaminer la réserve lors de la distribution du réactif DR2 dans les puits de la microplaque de capture. Éviter toute contamination du réactif DR2 par des aérosols du réactif DR1 ou la poussière du laboratoire, etc.
c) Dysfonctionnement du laveur Automated Plate Washer	Se référer à « Vérification de la contamination de l'appareil de lavage et/ou de la source d'alimentation en eau », page 138, ou au manuel d'utilisation du laveur Automated Plate Washer pour plus d'instructions sur les essais requis en cas de contamination ou de dysfonctionnements.

CV importants entre les répliqués.

a) Pipetage imprécis	Vérifier que la pipette distribue des volumes reproductibles. Calibrer les pipettes régulièrement.
b) Mélange insuffisant	Mélanger soigneusement à toutes les étapes. Mélanger par vortexage avant et après l'étape de dénaturation et après avoir ajouté le mélange de sondes. S'assurer qu'il se forme un tourbillon visible.
c) Transfert du liquide des microtubes d'hybridation	Effectuer avec précaution le transfert entre la microplaque d'hybridation ou les microtubes d'hybridation et les puits

Commentaires et suggestions

ou des puits de microplaque d'hybridation aux puits de la microplaque de capture incomplet	de microplaque de capture afin de garantir que des volumes reproductibles soient transférés.
d) Conditions de lavages incorrectes	Laver soigneusement les puits de la microplaque 6 fois avec le tampon de lavage, en inondant les puits ou en utilisant le laveur Automated Plate Washer.
e) Contamination des puits de microplaque par le réactif DR1	S'assurer que toutes les surfaces de travail sont propres et sèches. Manipuler le réactif DR1 avec précautions. Éviter les aérosols.

Résultats faussement positifs obtenus à partir d'échantillons négatifs connus.

a) Contamination du réactif DR2	S'assurer de ne pas provoquer de contamination croisée entre les échantillons lors de la distribution des fractions aliquotes de réactif DR2 entre les échantillons. En cas d'utilisation d'une partie du kit seulement, transférer la fraction aliquote requise pour ce test dans un réservoir pour réactifs jetable propre avant de remplir la pipette.
b) Contamination des puits de microplaque par le réactif DR1	Laver soigneusement les puits de la microplaque 6 fois avec le tampon de lavage, en inondant les puits ou en utilisant le laveur Automated Plate Washer. On ne doit pas observer de liquide résiduel rose dans les puits de la microplaque après le lavage.
c) Plusieurs rangées séchées sur la même surface de lingette Kimtowels ou le même papier absorbant non pelucheux équivalent	Ne pas sécher sur une surface déjà utilisée.
d) Préparation incorrecte des échantillons	Ajouter le volume de réactif DNR correct et mélanger soigneusement par vortexage. Pour éviter les résultats faussement positifs, s'assurer que le liquide lave l'intégralité de la surface interne du tube. Pour la préparation manuelle d'échantillons en solution PreservCyt, s'assurer que le mélange est suffisant et le culot cellulaire complètement remis en suspension avant

Commentaires et suggestions

l'étape de dénaturation. Se référer à la notice d'instructions du kit *digene* HC2 Sample Conversion.

Un net changement de coloration de violet clair à violet foncé doit être observé. Placer en incubation pendant 45 ± 5 minutes à 65 ± 2 °C. Pour la préparation manuelle d'échantillons en solution SurePath, veiller à incuber les échantillons pendant 90 ± 5 minutes à 65 ± 2 °C.

- e) Conditions de lavages inappropriées Laver soigneusement 6 fois les puits de la microplaque avec le tampon de lavage, en inondant les puits ou en utilisant le laveur Automated Plate Washer.
- f) Contamination de l'embout de pipette par des substances non dénaturées pendant le transfert de l'échantillon dénaturé vers le microtube d'hybridation ou vers le puits de la microplaque d'hybridation L'étape de dénaturation de la procédure de traitement des échantillons doit être réalisée comme indiqué dans la présente notice d'instructions. Un mélange insuffisant des échantillons par vortexage, retournement des tubes ou agitation peut se traduire par une dénaturation incomplète des hybrides d'ARN-ADN non spécifiques endogènes présents dans les échantillons cervicaux. Dans le cas particulier des échantillons en solution PreservCyt ou SurePath, il est probable que ces hybrides soient présents sur les parois internes du tube de dénaturation des échantillons. Pour éviter tout risque de contamination par entraînement de ces substances cellulaires non dénaturées, l'embout de pipette ne doit pas toucher les parois du tube de dénaturation des échantillons pendant le transfert de l'échantillon dénaturé au microtube d'hybridation ou au puits de la microplaque d'hybridation.

Valeurs RLU élevées des NC (> 200 RLU). Les autres critères du test sont satisfaits.

- a) Le réactif DR2 a été incubé à une température supérieure à 20-25 °C. Refaire le test et s'assurer que les étapes de capture et de détection sont incubées à une température de 20 à 25 °C.
- b) Le réactif DR2 a été incubé pendant plus de 30 minutes. Lire la microplaque après 15 minutes d'incubation (ne pas dépasser 30 minutes d'incubation) à une température de 20 à 25 °C.

Commentaires et suggestions

- c) Le réactif DR2 ou le tampon de lavage a été contaminé par de la phosphatase alcaline ou du réactif DR1. Se référer à « Vérification de la contamination du réactif DR2 », page 138, ou à « Vérification de la contamination de l'appareil de lavage et/ou de la source d'alimentation en eau », page 138.

Le test ne satisfait pas aux critères de validation de l'essai. Rapport $PC\bar{X}/NC\bar{X}$ élevé.

- a) Positions HRC et QC2-HR inversées Tester à nouveau les échantillons. Lire attentivement les étiquettes des flacons des étalons et des contrôles de qualité pour éviter d'inverser les positions de ces réactifs.

Vérification de la contamination du réactif DR2

1. Distribuer 75 µl de réactif DR2 issu d'une fraction aliquote, d'une fraction résiduelle ou du flacon d'origine dans un puits de microplaque de capture vide.

Remarque : L'analyse du réactif DR2 en triplicat fournit une évaluation optimale de la performance.

2. Incuber à une température de 20 à 25 °C pendant 15 minutes. Éviter toute exposition à la lumière solaire directe.
3. Mesurer la microplaque en utilisant un luminomètre DML.

Le contrôle de réactif DR2 doit présenter une valeur < 50 RLU.

Si le réactif DR2 donne des valeurs < 50 RLU, le réactif DR2 peut être utilisé pour recommencer le test.

En cas de contamination (valeur > 50 RLU), prendre un nouveau kit et recommencer le test.

Vérification de la contamination de l'appareil de lavage et/ou de la source d'alimentation en eau

1. Numéroté les puits 1 à 4. Distribuer 75 µl de réactif DR2 dans 4 puits distincts d'une microplaque de capture.
Le puits 1 est utilisé pour le contrôle de réactif DR2.
2. Pipeter 10 µl de tampon de lavage de la bouteille de tampon et les transférer dans le puits de microplaque n° 2.

3. Laisser le tampon de lavage s'écouler le long des tubulures de l'appareil de lavage. Pipeter 10 µl du tampon de lavage provenant des tubulures et les transférer dans le puits de microplaque n° 3.
4. Se procurer une fraction aliquote de l'eau utilisée pour préparer le tampon de lavage. Pipeter 10 µl de cette eau et les transférer dans le puits de microplaque n° 4.
5. Incuber à une température de 20 à 25 °C pendant 15 minutes. Éviter toute exposition à la lumière solaire directe.
6. Mesurer la microplaque en utilisant un luminomètre DML.

Le contrôle de réactif DR2 (puits 1) doit présenter une valeur < 50 RLU.

Comparer les valeurs RLU des puits 2, 3 et 4 à la valeur RLU du contrôle de réactif DR2. Les valeurs RLU individuelles des puits 2, 3 et 4 ne doivent pas dépasser de 50 RLU la valeur du contrôle de réactif DR2.

Des valeurs supérieures de 50 RLU par rapport à la valeur mesurée pour le contrôle de réactif DR2 indiquent une contamination. Voir « Méthode de lavage manuel », page 61, pour plus d'instructions concernant le nettoyage et l'entretien du laveur.

Vérification de la contamination du laveur Automated Plate Washer

1. Numéroté les puits 1 à 5. Distribuer 75 µl de réactif DR2 dans 5 puits distincts d'une microplaque de capture. Distribuer 75 µl de réactif DR2 dans 5 puits distincts d'une microplaque de capture.
Le puits 1 est utilisé pour le contrôle de réactif DR2.
2. Pipeter 10 µl du tampon de lavage dans la bouteille de lavage du laveur de plaques et les transférer dans le puits de microplaque n° 2.
3. Pipeter 10 µl du liquide de rinçage dans la bouteille de rinçage du laveur de plaques et les transférer dans le puits de microplaque n° 3.
4. Appuyer sur le bouton **Prime** (Amorcer) du clavier du laveur de plaques, permettant au tampon de lavage de s'écouler dans les tubulures. Pipeter 10 µl du tampon de lavage provenant des tubulures et les transférer dans le puits de microplaque n° 4.
5. Appuyer sur le bouton **Rinse** (Rincer) du clavier du laveur de plaques, ce qui déclenche l'écoulement du liquide de rinçage à travers les tubulures. Pipeter 10 µl du tampon de lavage provenant des tubulures et les transférer dans le puits de microplaque n° 5.
6. Couvrir et incubé pendant 15 minutes à une température de 20 à 25 °C. Éviter toute exposition à la lumière solaire directe.
7. Mesurer la microplaque en utilisant un luminomètre DML.

Le contrôle de réactif DR2 (puits 1) doit présenter une valeur < 50 RLU.

Comparer les valeurs RLU des puits 2, 3, 4 et 5 à la valeur RLU du contrôle de réactif DR2. Les valeurs RLU individuelles des puits 2, 3, 4 et 5 ne doivent pas dépasser de 50 RLU la valeur du contrôle de réactif DR2.

Des valeurs supérieures de 50 RLU par rapport à la valeur mesurée pour le contrôle de réactif DR2 indiquent une contamination du laveur de plaques.

Se référer au manuel d'utilisation du laveur Automated Plate Washer (*Automated Plate Washer User Manual*) pour la procédure de décontamination.

Coordonnées

Pour vous mettre en relation avec votre représentant local QIAGEN, veuillez vous reporter à la fiche des coordonnées de QIAGEN fournie dans le kit du test.

Page laissée volontairement vierge

Page laissée volontairement vierge

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

Les noms déposés, les marques de commerce, etc., cités dans le présent document, même s'ils ne sont pas spécifiquement signalés comme tels, ne doivent pas être considérés comme non protégés par la loi

Ce produit et son mode d'utilisation sont protégés par un ou plusieurs des brevets suivants :

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

Brevet US sur la technologie Hybrid Capture

6,228,578B1

Brevets US sur le HPV

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

© 2012–2015 QIAGEN, tous droits réservés

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