

Test*digene*[®] HC2 HPV DNA

Notice d'instructions

IVD



Test d'hybridation moléculaire in vitro avec amplification du signal par chimiluminescence en format microplaque pour la détection qualitative de l'ADN de 18 types de papillomavirus humains (HPV) à haut risque et à bas risque dans les prélèvements cervicaux

À utiliser avec :

digene HC2 DNA Collection Device (système de prélèvement d'ADN)

digene Specimen Transport Medium (milieu de transport d'échantillons)

Hologic PreservCyt[®] Solution (solution de conservation)

BD SurePath[®] Preservative Fluid (liquide conservateur)



REF

5196-1330



QIAGEN

19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874
ÉTATS-UNIS

EC REP

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
Allemagne

L2126fr Rev. 4



Sample & Assay Technologies

TABLE DES MATIERES

NOM ET UTILISATION PREVUE	1
RESUME ET DESCRIPTION.....	2
PRINCIPE DE LA TECHNIQUE	3
REACTIFS ET MATERIEL FOURNIS	4
MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI.....	5
AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS.....	7
PRECAUTIONS DE SECURITE	7
CONSIGNES RELATIVES A LA SECURITE ET AUX RISQUES POUR LA SANTE	7
PRÉCAUTIONS D'EMPLOI	9
PREPARATION ET STOCKAGE DES REACTIFS	10
PRELEVEMENT ET MANIPULATION DES ECHANTILLONS	14
ÉCHANTILLONS CERVICAUX EN STM	14
BIOPSIES CERVICALES.....	14
ÉCHANTILLONS CERVICAUX EN SOLUTION PRESERVCYT	14
ÉCHANTILLONS CERVICAUX DANS LE LIQUIDE CONSERVATEUR SUREPATH.....	15
PROCEDURE	16
TESTER UN GRAND NOMBRE D'ECHANTILLONS AVEC LE RAPID CAPTURE SYSTEM.....	16
MÉTHODE MANUELLE.....	16
DENATURATION.....	17
VORTEXAGE ET DENATURATION.....	21
HYBRIDATION : METHODE AVEC LE COCKTAIL DE SONDAS COMBINEES (CPC) ET METHODE A DOUBLE SONDAS.....	24
CAPTURE DES HYBRIDES	27
DÉTECTION DES HYBRIDES.....	28
LAVAGE.....	28
AMPLIFICATION DU SIGNAL	30
CRITERES DE VERIFICATION DE LA CALIBRATION DU TEST	31
CALCULS DE LA VALEUR SEUIL	34
CONTRÔLE DE QUALITÉ	35
INTERPRETATION DES RESULTATS DES ECHANTILLONS.....	36
CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE	37
RESULTATS CONFIRMANT UNE INDICATION DE HPV A BAS RISQUE ET DE HPV A HAUT RISQUE.....	37
RESULTATS CONFIRMANT UNE INDICATION DE DEPISTAGE PRIMAIRE DES HPV A HAUT RISQUE.....	41
SENSIBILITE ANALYTIQUE.....	44
PERFORMANCE DU COCKTAIL DE SONDAS COMBINEES (CPC).....	45
ÉQUIVALENCE ENTRE LES ECHANTILLONS EN MILIEU STM ET PRESERVCYT	45
CORRELATION DES RESULTATS D'ECHANTILLONS EN MILIEU SUREPATH ET EN MILIEU STM AU SEIN D'UNE POPULATION CLINIQUE.....	45
REPRODUCTIBILITE	46
SONDE HPV A HAUT RISQUE	47
REACTIONS CROISEES	48
PANEL DE REACTIONS CROISEES	48
HYBRIDATION CROISEE	49
IMPACT DU SANG ET D'AUTRES SUBSTANCES SUR LES ECHANTILLONS EN STM	49
IMPACT DU SANG ET D'AUTRES SUBSTANCES SUR LES ECHANTILLONS EN SOLUTION PRESERVCYT	49
REPRODUCTIBILITE DU TEST <i>DIGENE</i> HC2 HPV DNA AVEC DES ECHANTILLONS CLINIQUES PRELEVES EN MILIEU STM	49
RLU/CO	50
REPRODUCTIBILITE DU TEST <i>DIGENE</i> HC2 HPV DNA AVEC DES ECHANTILLONS CLINIQUES PRELEVES EN SOLUTION PRESERVCYT	50
RLU/CO	51
REPRODUCTIBILITE DU TEST <i>DIGENE</i> HC2 HIGH-RISK HPV DNA AVEC DES ECHANTILLONS PRELEVES EN MILIEU CONSERVATEUR SUREPATH.....	52

REPRODUCTIBILITÉ DES RÉSULTATS EN MILIEU SUREPATH EN TRAITANT LES TESTS AVEC LE RAPID CAPTURE SYSTEM	52
LIMITES DE LA TECHNIQUE	54
REFERENCES.....	56
RÉSOLUTION DES PRINCIPAUX PROBLÈMES RENCONTRÉS.....	59
VERIFICATION DES CONTAMINATIONS	63
CONTACTS	65

NOM ET UTILISATION PREVUE

Pour utilisation en diagnostic in vitro.

Le test *digene* HC2 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 18 types de papillomavirus à haut risque et à bas risque dans des prélèvements cervicaux.

Les échantillons cervicaux pouvant être analysés avec le test *digene* HC2 HPV DNA sont les suivants :

- Échantillons collectés avec le système de prélèvement *digene* HC2 DNA Collection Device
- Échantillons collectés avec un système de prélèvement de type balai ou avec une combinaison brosse/spatule, puis placés dans une solution PreservCyt (voir la notice d'utilisation du kit *digene* HC2 Sample Conversion pour de plus amples informations)
- Échantillons collectés et placés dans le liquide conservateur SurePath Preservative Fluid (UNIQUEMENT pour l'analyse d'ADN de HPV à haut risque)
- Biopsies prélevées dans le milieu de transport *digene* Specimen Transport Medium (STM)

Lorsque les sondes HPV à bas risque et haut risque sont utilisées, ce test est préconisé :

- Pour aider à diagnostiquer les infections à HPV de types 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68 transmises sexuellement.
- Pour différencier les deux groupes d'ADN de HPV : HPV à bas risque de types 6, 11, 42, 43 et 44 et HPV à haut risque de types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68 ; cependant, il n'est pas possible de déterminer le type de HPV spécifique présent.

Lorsque la sonde HPV à haut risque est utilisée, 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 colposcopie 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 colposcopie. Pour ces patientes, un résultat de test *digene* HC2 HPV DNA peut aider le médecin dans la prise en charge de la patiente en facilitant l'évaluation du risque de présence ou d'absence de lésions de haut grade.

Le test *digene* HC2 HPV DNA doit être utilisé conjointement avec d'autres données cliniques provenant de divers diagnostics et tests de dépistage, d'examen physiques et d'antécédents médicaux complets, conformément aux procédures appropriées de prise en charge du patient. Les résultats obtenus avec le test *digene* HC2 HPV DNA **ne devront pas** être utilisés comme le seul fondement d'un jugement clinique et de traitement des patients.

RESUME 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

Les papillomavirus humains sont composés d'une particule virale icosahédrique (virion) contenant une molécule d'ADN circulaire bicaténaire de 8 000 paires de bases enveloppée d'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.

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 et les types 6 et 11 comme les types à bas risque de développement d'un cancer.⁸⁻¹⁰ Quant aux HPV de types 31, 33 et 35, il a été démontré qu'ils présentaient un risque moyen de survenue de cancer.^{2,11-14} En dépit de ce schéma conceptuel utile, ces 7 types de HPV ne sont responsables que d'environ 70 % des néoplasies cervicales.⁹⁻¹¹ D'autres types de HPV, notamment les types 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68 ont été identifiés comme les principaux types de HPV détectables dans les autres lésions^{15-20,32-36}. Ces types de HPV peuvent également être classés dans les groupes de HPV à bas risque, à risque moyen et à haut risque, d'après leur distribution relative dans diverses catégories de diagnostics histo-pathologiques.^{21, 32-37}

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.^{2,10,21,31} 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.^{22,23} 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.²²

PRINCIPE DE LA TECHNIQUE

Le test *digene* HC2 HPV DNA qui utilise la technologie HC2 est un test de capture d'anticorps par hybridation avec amplification du signal utilisant la détection chimiluminescente sur microplaque. Les échantillons contenant l'ADN cible s'hybrident avec une sonde ARN spécifique au type de HPV. Les hybrides ARN:ADN résultants sont capturés à la surface d'un puits de microplaque revêtu d'anticorps anti-hybrides ARN:ADN spécifiques. On fait ensuite réagir les hybrides immobilisés avec des anticorps anti-hybrides AN-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. Quand le substrat est clivé par la phosphatase alcaline liée, une radiation lumineuse est émise qui est mesurée en unités de lumière relative RLU (Relative Light Units) par un luminomètre. L'intensité de la lumière émise indique la présence ou l'absence d'ADN cible dans l'échantillon.

Une intensité RLU égale ou supérieure à la valeur seuil indique la présence de séquences d'ADN d'HPV dans l'échantillon. Une intensité RLU inférieure à la valeur seuil indique, soit l'absence des séquences d'ADN d'HPV spécifiques recherchées, soit une quantité d'ADN d'HPV inférieure au seuil de détection du test.

L'analyse d'échantillons à haut débit avec le test *digene* HC2 HPV DNA peut être réalisée en utilisant le système Rapid Capture[®] System (RCS). Celui-ci peut traiter jusqu'à 352 échantillons en huit heures. Afin de permettre le traitement d'un grand nombre d'échantillons, toutes les étapes de la procédure sont effectuées par l'appareil RCS, à l'exception de la dénaturation des échantillons, de la détection du signal chimiluminescent et du rapport des résultats.

REACTIFS ET MATERIEL FOURNIS

Un seul kit digene HC2 HPV DNA permet la réalisation de 96 tests (référence 5196-1330). Le nombre de résultats patientes variera suivant le nombre de séries faites par kit :

- 1 utilisation = 40 résultats patientes (bas risque et haut risque)
- 2 utilisations = 32 résultats patientes (bas risque et haut risque)

- 1 x 0,35 ml **Indicateur coloré**
Contient 0,05 % p/v d'azide de sodium.
- 1 x 50 ml **Réactif de dénaturation**
Solution diluée d'hydroxyde de sodium (NaOH).
- 1 x 5 ml **Diluant de sonde**
Solution tamponnée avec 0,05 % p/v d'azide de sodium.
- 1 x 150 µl **Sonde HPV à bas risque**
Sonde ARN d'HPV de types 6/11/42/43/44 en solution tamponnée (bouchon vert).
- 1 x 100 µl **Sonde HPV à haut risque**
Sonde ARN d'HPV de types 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68 en solution tamponnée (bouchon rouge).
- 1 x 1 ml **Contrôle de qualité HPV à 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 x 1 ml **Contrôle de qualité HPV à 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 x 2.0 ml **Calibrateur négatif**
ADN porteur en milieu de transport pour échantillon (STM) avec 0,05 % p/v d'azide de sodium.
- 1 x 1,0 ml **Calibrateur HPV à haut risque**
1 pg/ml d'ADN d'HPV 11 cloné et d'ADN porteur en STM avec 0,05 % p/v d'azide de sodium.
- 1 x 1,0 ml **Calibrateur HPV à bas risque**
1 pg/ml d'ADN d'HPV 16 cloné et d'ADN porteur en STM avec 0,05 % p/v d'azide de sodium.
- 1 x 1 **Microplaque de capture**
Revêtue d'anticorps anti-hybrides ARN:ADN.
- 1 x 12 ml **Réactif de détection 1**
Anticorps anti-hybrides ARN:ADN conjugués à de la phosphatase alcaline, en solution tamponnée avec 0,05 % p/v d'azide de sodium.
- 1 x 12 ml **Réactif de détection 1**
CDP-Star® avec Emerald II (substrat chimiluminescent).
- 1 x 100 ml **Tampon de lavage concentré**
Contient 1,5 % p/v d'azide de sodium.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

Équipement et accessoires de diagnostic *In Vitro* du système Hybrid Capture System^A

digene Hybrid Capture 2 System (« *digene* HC2 System »), comprenant un luminomètre agréé par QIAGEN (« DML instrument »), un ordinateur personnel (PC) et des périphériques agréés par QIAGEN (écran, clavier, souris, imprimante et câble d'imprimante), le logiciel *digene* HC2 System Software (logiciel d'analyse d'essai « *digene* assay analysis software »), les protocoles *digene* HC2 System Assay Protocols pour HPV, le logiciel LumiCheck Plate et le manuel d'utilisation du logiciel du système *digene* HC2 (*digene* HC2 System Software User Manual)

Hybrid Capture System Rotary Shaker I

Hybrid Capture System Microplate Heater I

Hybrid Capture System Automated Plate Washer

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

Portoir de conversion et couvercle pour portoir (en option)

digene Specimen Rack and Rack lid (portoir d'échantillons et son couvercle, en option)

Pipette EXPAND-4 et portoir (en option)^C

digene HC2 DNA Collection Device^D

Thermoscelleuse avec dispositif de coupe (en option, utilisation avec le MST Vortexer 2)

Rapid Capture System (en option pour les analyses d'échantillons à haut débit)^E

Laveur

Microplaques d'hybridation

Couvercles de microplaques

Empty Microplate Strips (barrettes de puits de microplaque vides disponibles chez Costar, référence n° 2581) ; en option pour une utilisation avec l'Automated Plate Washer

Embouts pour pipette extra-longue pour le prélèvement des échantillons

Tubes de prélèvement d'échantillons

Portoir pour tubes de prélèvement d'échantillons

Bouchons à vis pour tubes de prélèvement d'échantillons

Réservoirs pour réactif à usage unique

Film de scellage DuraSealTM pour tubes

Microtubes d'hybridation

Portoir pour microtubes

Films étanches pour plaque

Matériel et accessoires de laboratoire d'usage courant

Bain-marie à 65 ± 2 °C, assez large pour recevoir un portoir de conversion (36 x 21 x 9 cm) ou des portoirs pour échantillons

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

Agitateur Vortex avec attaches de puits

Micropipette monocanal à volume variable de 20 à 200 µl et de 200 à 1 000 µl

Pipette à répétition à déplacement direct de type Eppendorf[®] Repeater[®] ou équivalent

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

Minuterie

Solution d'hypochlorite de sodium, à 5 % v/v (ou eau de javel à usage domestique)

Film Parafilm[®] ou équivalent

Embouts à usage unique pour pipette avec filtre aérosol pour micropipette monocanal (20 à 200 µl et 200 à 1 000 µl)

Embouts jetables pour pipette à répétition Eppendorf (25 et 500 µl)

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

Lingettes Kimtowels[®] ou papier absorbant équivalent non pelucheux

Revêtement de pailleuse à usage unique

Gants sans poudre

Tubes en polypropylène à fond rond et bouchon presseur de 5 ml et/ou de 15 ml (pour la dilution des sondes)

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

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

Une centrifugeuse à godets oscillants capable d'atteindre 2 900 ± 150 x g et de contenir des tubes de centrifugeuse coniques en polypropylène de 10 ou 15 ml

Pipettes sérologiques ou pipettes de transfert de 5 ml *digene* HC2 Sample Conversion Kit (kit de conversion)^A

Embouts jetables pour pipette à répétition Eppendorf (50 et 100 µl)

Pour la procédure de mélange manuel au Vortex :

digene HC2 Sample Conversion Tubes (tubes de conversion coniques de 15 ml)^F, tubes coniques Sarstedt de 10 ml avec bouchons ou tubes de centrifugation en polypropylène à fond conique de 15 ml avec bouchons de marque VWR[®] or Corning[®]

Portoir pour tubes coniques de 10 ml ou de 15 ml

Pour la procédure utilisant le MST Vortexer 2

digene HC2 Sample Conversion Tubes (tubes de conversion coniques de 15 ml)^F

Agitateur pour tubes multi-échantillons MST Vortexer 2

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

Distributeur de film étanche pour tube et cutter

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

Matériel et accessoires supplémentaires pour le traitement des échantillons en solution de conservation Surepath

Une centrifugeuse à godets oscillants capable d'atteindre 800 ± 15 x g et de contenir des tubes de centrifugeuse coniques en polypropylène de 15 ml

digene HC2 Sample Conversion Tubes (tubes de conversion coniques de 15 ml)^F

Pipettes de transfert avec embout standard de 7 ml ou pipette équivalente

QIAGEN Specimen Transport Media (Milieu de transport d'échantillons)

Embouts jetables pour pipette à répétition Eppendorf (100 µl)

^A Seuls l'équipement et le matériel compatibles avec les tests *digene* HC2 HPV DNA sont disponibles auprès de QIAGEN.

^B Également requis lors de l'exécution de l'application Semi-automated RCS (RCS semi-automatisé).

- ^C Pièce sur mesure. D'autres pipettes multicanaux pouvant être agrandies sur commande peuvent être utilisées, à condition qu'un espace de 3,2 cm puisse être aménagé entre les embouts lorsque la pipette est agrandie. Un autre choix consiste à utiliser une pipette monocanal pouvant effectuer un pipetage de 75 µl.
- ^D Les caractéristiques de performance du test *digene* HC2 HPV DNA n'ont été établies que pour les kits de prélèvement mentionnés.
- ^E Se référer au manuel d'utilisation du *Rapid Capture System (Rapid Capture System User Manual)* pour des instructions spécifiques à l'utilisation de ce système pour l'analyse d'échantillons à haut débit avec ce test.
- ^F Il est impératif d'utiliser les tubes *digene* HC2 Sample Conversion Tubes (tubes de conversion de marque VWR ou Corning®) disponibles auprès de QIAGEN pour garantir des performances de test appropriées lors de l'application de la procédure Multi-Specimen Tube Vortexer 2.

AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

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

PRECAUTIONS DE SECURITE

TOUS LES ÉCHANTILLONS doivent être considérés 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 en vigueur sur le plan régional et national. 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 :

1. Ne pas pipeter à la bouche.
2. Ne pas fumer, manger ou boire dans les lieux où les réactifs ou les échantillons sont manipulés.
3. Porter des gants jetables, non poudrés, lors de la manipulation des réactifs et des échantillons. Se laver les mains soigneusement après avoir réalisé le test.
4. Nettoyer et désinfecter toute substance renversée issue d'un échantillon en utilisant un désinfectant tuberculocide, par exemple une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5 % v/v ou un autre désinfectant adéquat.^{42,43}
5. Décontaminer et jeter tout échantillon, réactif et tout autre matériel potentiellement contaminé conformément aux normes nationales et régionales.

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. Afin de décontaminer de vieilles canalisations pouvant avoir accumulé de l'azide, l'agence américaine pour la santé et la sécurité au travail (US Occupational Safety and Health Administration) recommande de : (1) siphonner le liquide à l'aide d'un tuyau en caoutchouc ou en plastique, (2) remplir la canalisation d'une solution d'hydroxyde de sodium à 10 % v/v, (3) laisser reposer pendant 16 heures et (4) rincer à grande eau.

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 pour l'analyse d'échantillons à haut débit avec ce test.

CONSIGNES RELATIVES A LA SECURITE ET AUX RISQUES POUR LA SANTE

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

Tampon de lavage concentré



Contient : Azide de sodium. Avertissement ! 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.

Réactif de dénaturation



Contient : hydroxyde de sodium. 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.

Diluant de sonde



Contient : acide acétique ; acide polyacrylique. 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.

Calibrateur HPV haut risque

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

Calibrateur HPV à bas risque

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

Contrôle de qualité HPV haut risque

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

Contrôle de qualité HPV bas risque

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

Calibrateur négatif

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

Informations supplémentaires

Fiches de Données de Sécurité : www.qiagen.com/safety

PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

1. Pour utilisation en diagnostic in vitro.
2. Ne pas utiliser la cytobrosse chez les femmes enceintes.
3. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date d'expiration figurant à côté du symbole  sur l'étiquette du conditionnement extérieur.
4. Effectuer les tests hors des plages de durée et de température indiquées peut fausser les résultats. Les tests résultants seront invalides et devront être recommencés.
5. La procédure du test *digene* HC2 HPV DNA, les critères de vérification de la calibration des essais, le contrôle de qualité et l'interprétation des résultats des échantillons doivent être rigoureusement respectés pour obtenir des résultats de test fiables.
6. Il est important de pipeter le volume exact de réactif indiqué et de bien mélanger après chaque ajout 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.
7. Les composants du kit ont été testés en lot. **Ils ne sont pas interchangeables** avec des composants provenant de sources ou de lots différents.
8. Les acides nucléiques sont 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.**
9. S'assurer d'éviter toute contamination des microplaques de capture et du réactif de détection 2 par de la phosphatase alcaline exogène pendant la réalisation du test. Le réactif de détection 1, les bactéries, la salive, les cheveux et les sécrétions cutanées font partie des substances pouvant contenir de la phosphatase alcaline. **Il est très important de couvrir la microplaque de capture après le lavage et durant l'incubation du réactif de détection 2, car la phosphatase alcaline exogène peut réagir avec le réactif de détection 2 et provoquer des résultats faux positifs.**
10. Éviter d'exposer le réactif de détection 2 à la lumière directe de façon prolongée. Utiliser le réactif immédiatement après avoir pris un aliquot et le protéger des rayons solaires.
11. Amorcer à l'avance la pipette à répétition à déplacement direct 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 précises concernant l'utilisation de la pipette, se reporter au manuel technique de la pipette employée.
12. La distribution des réactifs de détection 1 et 2 avec une pipette multicanaux doit être réalisée en utilisant la méthode de pipetage inversé (voir la section *Détection des hybrides*). Vérifier que chaque embout de la pipette multicanaux est bien engagé et correctement rempli.
13. S'assurer que chaque puits de microplaque est correctement lavé, comme expliqué dans le manuel d'utilisation du QIAcube (*QIAcube User Manual*). Un lavage incomplet se traduira par un bruit de fond accru et peut générer des résultats faussement positifs. Toute trace résiduelle de tampon de lavage dans les puits pourrait entraîner une diminution du signal et une faible reproductibilité.
14. S'il est à l'arrêt, laisser l'appareil Hybrid Capture System Microplate Heater I s'équilibrer à $65\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ pendant au moins 60 minutes. La microplaque d'hybridation peut fondre si ce délai n'est pas respecté. Pour de plus amples informations, voir le manuel d'utilisation du *Microplate Heater I (Microplate Heater I User Manual)*.

PREPARATION ET STOCKAGE DES REACTIFS

1. Dès réception, stocker le kit à une température de 2 à 8 °C. 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.
2. Ne pas utiliser le kit au-delà de la date de péremption inscrite à côté du symbole  situé sur l'étiquette du conditionnement extérieur, ou au-delà de la date de péremption des réactifs préparés (voir ci-dessous).
3. Tous les réactifs sont prêts à l'emploi, à l'exception du réactif de dénaturation, des sondes HPV à bas risque et à haut risque et du tampon de lavage concentré.

Afin de rechercher la présence de n'importe lequel des 18 types d'HPV dans les échantillons, une méthode de cocktail de sondes combinées (CPC) est fournie. Pour effectuer un test en appliquant cette option, il faut préparer un cocktail de sondes combinées en ajoutant le mélange dilué de sondes HPV à bas risque au mélange dilué de sondes HPV à haut risque avant d'effectuer le test *digene* HC2 HPV DNA. La méthode à double sondes utilise des mélanges de sondes HPV à bas risque et à haut risque séparés. Voir les instructions ci-dessous.

Pour une analyse d'échantillons à haut débit, reportez-vous au manuel d'utilisation du *Rapid Capture System (Rapid Capture System User Manual)* pour la préparation du/des mélanges de sondes HPV, du tampon de lavage, du réactif de détection 1 et du réactif de détection 2, car ces instructions sont spécifiques à l'utilisation de ce système d'analyse d'échantillons à haut débit.

RÉACTIF	MÉTHODE DE PRÉPARATION
Réactif de dénaturation	<p>À préparer en premier :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ajouter 5 gouttes d'indicateur coloré dans la bouteille de réactif de dénaturation et mélanger le tout vigoureusement. Le réactif de dénaturation doit être de coloration uniforme violet foncé. • Une fois préparé, le réactif de dénaturation est stable pendant trois mois s'il est conservé à une température comprise entre 2 et 8 °C. Inscire la nouvelle date de péremption sur l'étiquette. Si la coloration s'atténue, ajouter 3 gouttes d'indicateur coloré et mélanger soigneusement avant emploi. <p>Avertissement: Le réactif de dénaturation est corrosif. Porter un vêtement de protection approprié, des gants et une protection oculaire/faciale. Prendre des précautions lors de la manipulation.</p>
Mélange de sondes HPV à bas risque (préparé à partir de la sonde HPV à bas risque et du diluant de sonde)	<p>À préparer pendant l'incubation de l'étape de dénaturation des échantillons :</p> <p>Important : Parfois, la solution de sonde est piégée dans le capuchon des flacons.</p> <p>Remarque : Veillez à éviter toute contamination de la sonde et du mélange de sondes par de la RNase. Utiliser des embouts pour pipette avec filtre aérosol pour pipeter la sonde. Le diluant de sonde est visqueux.</p> <p>Veillez à mélanger vigoureusement les solutions lorsque vous préparez les sondes HPV. Un tourbillon visible doit se former dans le liquide lors de l'étape de mélange. Un mélange incomplet peut entraîner une réduction du signal.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Centrifuger brièvement le flacon de sonde HPV à bas risque pour entraîner le liquide au fond du flacon. Tapoter légèrement pour mélanger. • Déterminer la quantité de mélange de sondes requise (25 µl/test). Il est recommandé de préparer du mélange de sondes supplémentaire pour tenir compte du volume qui peut être perdu dans les embouts de pipette ou sur les bords du flacon. Se reporter à la liste des volumes ci-dessous. Le plus petit nombre de puits recommandé pour chaque série est de 24. Si l'on a besoin de moins de 24 puits par test, le nombre total de tests par kit peut être diminué du fait des volumes limités de sonde et de diluant de sonde. • Transférer la quantité requise de diluant de sonde dans un nouveau récipient jetable. Selon le nombre de tests, un tube en polypropylène, à fond rond et à bouchon presseur, de 5 ml ou de 15 ml est recommandé. Effectuer une dilution dans le rapport 1:25 de la sonde HPV à bas risque dans le diluant de sonde pour préparer le mélange de sondes.

		Nbre de Tests/Barrettes	Volume de diluant de sonde*	Volume de sonde*
		48/6	2,0 ml	80,0 µl
		24/3	1,0 ml	40,0 µl
		Par puits	0,045 ml	1,8 µl

*Ces valeurs incluent le volume supplémentaire recommandé.

- Transférer la sonde HPV à bas risque dans le diluant de sonde en plaçant l'embout de pipette contre la paroi interne du tube, juste au-dessus du ménisque, et en expulsant le contenu. **Ne pas immerger l'embout dans le diluant de sonde.**
- Mélanger au Vortex pendant au moins 5 secondes à vitesse maximale pour un mélange efficace. **Un tourbillon visible doit se former.** Étiqueter avec la mention « Mélange de sondes HPV à bas risque » et conserver dans un récipient propre fermé jusqu'à utilisation. **Le mélange de sondes inutilisé doit être jeté.**

Mélange de sondes HPV à haut risque	Préparer le mélange de sondes HPV à haut risque comme indiqué ci-dessus. Étiqueter avec la mention « Mélange de sondes HPV à haut risque ». Le mélange de sondes inutilisé doit être jeté.
Cocktail de sondes combinées	Préparer les mélanges de sondes HPV à bas risque et de sondes HPV à haut risque de la manière décrite ci-dessus. Ajouter la totalité du contenu du mélange dilué de sondes HPV à bas risque au tube de mélange dilué de sondes HPV à haut risque. Mélanger parfaitement au Vortex pendant au moins 5 secondes à vitesse maximale. Un tourbillon visible doit se former. Étiqueter avec la mention « Cocktail de sondes combinées ». Le mélange de sondes inutilisé doit être jeté.

<p>Tampon de lavage</p>	<p>A préparer pendant l'étape de capture :</p> <p>Concernant le laveur Hybrid Capture System Automated Plate Washer, il est possible de préparer le tampon de lavage comme décrit ci-dessous et de le conserver dans un récipient fermé ou de préparer 1 L à la fois et de le placer dans les réservoirs de lavage du laveur Automated Plate Washer. Voir le tableau ci-dessous pour les volumes de mélanges :</p> <p>Pour plus d'instructions sur l'entretien et la maintenance, se référer au manuel d'utilisation de l'Automated Plate Washer (<i>Automated Plate Washer User Manual</i>).</p> <p>Avertissement : Le tampon de lavage concentré est toxique par ingestion. Porter un vêtement de protection approprié, des gants et une protection oculaire/ faciale. Afin de s'exposer le moins possible, ajouter de l'eau au tampon de lavage concentré lors de la préparation.</p> <table border="1" data-bbox="435 541 1427 716"> <thead> <tr> <th>Quantité de tampon de lavage concentré</th> <th>Quantité d'eau d'eau distillée ou désionisée</th> <th>Volume final de tampon de lavage</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>33,3 ml</td> <td>966,7 ml</td> <td>1 L</td> </tr> <tr> <td>66,6 ml</td> <td>1 933,4 ml</td> <td>2 L</td> </tr> <tr> <td>100 ml</td> <td>2 900 ml</td> <td>3 L</td> </tr> </tbody> </table> <p>Remarque : il est très important de laisser le laveur Automated Plate Washer sous tension en permanence. Cela permet au rinçage d'entretien de se mettre en marche après huit heures d'inutilisation.</p> <p>Avant chaque test, vérifier que le réservoir à déchets du laveur Automated Plate Washer est vide et le réservoir de rinçage plein d'eau distillée ou désionisée.</p> <p>Méthode de lavage manuelle des plaques :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bien mélanger le tampon de lavage concentré. • Diluer 100 ml de tampon de lavage concentré avec 2,9 L d'eau distillée ou désionisée dans le laveur et mélanger soigneusement (le volume final doit être de 3 L). • Sceller le récipient pour éviter toute contamination ou évaporation. <p>Une fois préparé, le tampon de lavage est stable pendant trois mois à une température comprise entre 2 et 30 °C. L'étiqueter avec la nouvelle date de péremption. Si le tampon de lavage a été réfrigéré, il doit être équilibré à 20-25 °C avant utilisation.</p> <p>Il est recommandé de laver l'appareil de lavage et les tubulures avec une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5 % et de les rincer soigneusement avec de l'eau distillée ou déminéralisée une fois tous les trois mois afin d'éviter une éventuelle contamination par la phosphatase alcaline présente dans les bactéries et les moisissures.</p>	Quantité de tampon de lavage concentré	Quantité d'eau d'eau distillée ou désionisée	Volume final de tampon de lavage	33,3 ml	966,7 ml	1 L	66,6 ml	1 933,4 ml	2 L	100 ml	2 900 ml	3 L
Quantité de tampon de lavage concentré	Quantité d'eau d'eau distillée ou désionisée	Volume final de tampon de lavage											
33,3 ml	966,7 ml	1 L											
66,6 ml	1 933,4 ml	2 L											
100 ml	2 900 ml	3 L											

VOLUMES POUR LES RÉACTIFS PRÊTS À L'EMPLOI**Réactif de
détection 1 et
réactif de
détection 2****Immédiatement avant utilisation :**

Mélanger vigoureusement le réactif, puis mesurer soigneusement le volume approprié de réactif de détection 1 ou de réactif de détection 2 dans un réservoir pour réactif propre selon les recommandations présentées ci-dessous. Pour éviter toute contamination, ces réactifs **NE DOIVENT PAS** être reversés dans les bouteilles originales : **Éliminer le matériel inutilisé une fois la procédure terminée**. Il est possible d'utiliser une pipette à répétition appropriée à la place d'une pipette à 8 canaux. Dans ce cas, les aliquots de réactif devront être effectués dans un tube en polypropylène de taille suffisante pour contenir le volume nécessaire indiqué ci-dessous.

**Nbre de
Tests/bandelettes****Volume de réactif
de détection 1 ou 2**

96/12

contenu de la bouteille

72/9

7,0 ml

48/6

5,0 ml

24/3

3,0 ml

1 test

0,125 ml

PRELEVEMENT ET MANIPULATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons cervicaux prélevés et transportés à l'aide du système de prélèvement *digene* HC2 DNA Collection Device (comportant une cytotrosse et le milieu de transport *digene* Specimen Transport Medium), ou les échantillons prélevés avec un système de prélèvement de type balai ou de type combinaison brosse/spatule et placés dans une solution PreservCyt, ou les échantillons cervicaux prélevés dans un liquide conservateur Sure Path sont les seuls échantillons recommandés pour le test *digene* HC2 HPV DNA. Les échantillons recueillis par d'autres systèmes de prélèvement ou transportés dans d'autres milieux de transport n'ont pas été validés pour être testés avec ce test. La performance de ce kit a été établie uniquement pour les kits de prélèvement indiqués. Les échantillons cervicaux doivent être recueillis avant l'application d'acide acétique ou d'iode si on procède à un examen colposcopique. Se référer à la notice d'instructions du système de prélèvement *digene* HC2 DNA Collection Device pour obtenir des procédures supplémentaires de prélèvement et de manipulation des échantillons.

ÉCHANTILLONS CERVICAUX EN STM

Les échantillons en STM peuvent être conservés pendant deux semaines à température ambiante et expédiés sans réfrigération au laboratoire. Les échantillons doivent être expédiés dans un conteneur calorifugé soit sur la nuit, soit dans les 48 heures. Au laboratoire, les échantillons doivent être conservés entre 2 et 8 °C s'ils sont testés dans la semaine qui suit. Si le test doit être effectué après plus d'une semaine, conserver les échantillons à -20 °C pendant une durée maximum de 3 mois (voir les *Remarques* de la section *Biopsies cervicales* avant de procéder à la congélation). 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 et des cellules. Le système de prélèvement *digene* HC2 DNA Collection Device ne doit pas être utilisé pour prélever des échantillons chez la femme enceinte.

BIOPSIES CERVICALES

Des biopsies cervicales fraîchement prélevées, en coupes transversales de 2 à 5 mm d'épaisseur, peuvent également être analysées avec le test *digene* HC2 HPV DNA. La biopsie doit être immédiatement placée dans 1,0 ml de STM et conservée sous forme congelée à -20 °C. Les biopsies peuvent être expédiées à une température de 2-30 °C pour une livraison le lendemain au laboratoire d'analyse et conservées à -20 °C jusqu'au traitement. Ne pas utiliser de biopsies de moins de 2 mm de diamètre.

Remarques : Recommandation pour empêcher les bouchons des tubes de prélèvement de sauter durant le transport et la conservation des échantillons congelés :

- Recouvrir les bouchons de film Parafilm avant d'expédier les tubes d'échantillons préalablement congelés. Les échantillons peuvent être expédiés congelés ou à une température comprise entre 20 et 25 °C.
- 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'échantillons.

ÉCHANTILLONS CERVICAUX EN SOLUTION PRESERVCYT

Les échantillons prélevés avec un système de prélèvement de type balai ou de type combinaison brosse/spatule et placés dans une solution PreservCyt pour préparer des lames de frottis cervical ThinPrep® peuvent être utilisés avec le test *digene* HC2 HPV DNA. Les échantillons doivent être prélevés de la manière habituelle et les lames de frottis cervical ThinPrep® préparées selon les instructions Hologic.

Remarque: Il doit rester au moins 4 ml de solution PreservCyt pour la réalisation du test *digene* HC2 HPV DNA. Les échantillons présentant un volume inférieur à 4 ml après que le frottis cervical a été préparé risquent de ne pas contenir suffisamment de matière et peuvent engendrer un résultat faussement négatif au test *digene* HC2 HPV DNA.

Une fois le prélèvement effectué, les échantillons en solution PreservCyt peuvent être conservés 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 HPV DNA. Les échantillons en solution PreservCyt ne peuvent pas être congelés. Pour traiter ces échantillons, se référer à la procédure *PreservCyt Specimen Preparation Procedure* (procédure de préparation d'échantillons PreservCyt).

ÉCHANTILLONS CERVICAUX DANS LE LIQUIDE CONSERVATEUR SUREPATH

(UNIQUEMENT pour les tests d'ADN de HPV à haut risque)

La préparation manuelle des échantillons en solution SurePath est réalisée sur le culot cellulaire post-gradient obtenu par la préparation des lames de frottis cervical SurePath. Préparer les lames de frottis cervical SurePath selon les instructions pertinentes pour l'appareil BD PrepStain[®] Slide Processor.

Important : Immédiatement après la préparation des lames de frottis cervical SurePath, 2,0 ml de liquide conservateur SurePath doivent être pipetés dans le tube de centrifugeuse contenant le culot cellulaire résiduel. Ceci préserve l'intégrité du culot cellulaire post-gradient pour que le test *digene* HC2 HPV DNA soit efficace.

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 de préparer l'échantillon pour le test *digene* HC2 HPV DNA Test.

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.

PROCEDURE

Les échantillons sont susceptibles de contenir des agents infectieux et doivent être manipulés de manière appropriée. Le test *digene* HC2 HPV DNA peut être exécuté manuellement selon les indications de la présente notice d'instructions ou en utilisant l'appareil Rapid Capture System pour analyser des échantillons à haut débit.

TESTER UN GRAND NOMBRE D'ECHANTILLONS AVEC LE RAPID CAPTURE SYSTEM

Le Rapid Capture System est un système automatisé de pipetage et de dilution à usage général, qui peut être utilisé avec le test *digene* HC2 HPV DNA pour analyser des échantillons à haut débit. Ce système peut traiter jusqu'à 352 échantillons en huit heures, durée pendant laquelle une période de 3,5 heures ne requiert aucune intervention de la part de l'utilisateur. Il peut produire jusqu'à 704 résultats d'échantillons en 13 heures. La dénaturation des échantillons précédant le test est effectuée indépendamment du RCS, avant de les placer sur la plate-forme du RCS. En outre, la détection du signal chimiluminescent et le rapport des résultats sont effectués en utilisant le luminomètre DML hors ligne commun aux deux types d'analyse manuelle et par RCS. Les étapes de la procédure du test *digene* HC2 HPV DNA sont effectuées selon la même séquence que celle de la procédure d'analyse manuelle. L'application RCS est étonnante puisqu'elle permet de traiter jusqu'à 4 microplaques, chaque plaque contenant les échantillons, les calibrateurs et les contrôles de qualité nécessaires pour le test.

Lors de l'utilisation du Rapid Capture System, veuillez vous référer au Manuel d'utilisation du Rapid Capture System (*Rapid Capture System User Manual*) fourni avec l'appareil, en plus de la présente notice d'instructions, pour toutes les informations nécessaires en termes de procédure et de description.

MÉTHODE MANUELLE

Mise en place

1. Si le Microplate Heater I est à l'arrêt, **le laisser s'équilibrer pendant au moins 60 minutes à 65 ± 2 °C.** Pour plus d'informations, voir le manuel d'utilisation du *Microplate Heater I (Microplate Heater I User Manual)*.
2. Vérifier que la température du bain-marie est à 65 °C et qu'il y a suffisamment d'eau pour recouvrir complètement le volume des tubes d'échantillons.
3. Sortir les échantillons et **tous** les réactifs requis du réfrigérateur **avant de commencer le test.** Les laisser atteindre 20 à 25 °C pendant une durée de 15 à 30 minutes.

Remarque: Préparer les échantillons en solution PreservCyt et SurePath avant d'équilibrer tout échantillon dénaturé et tout réactif de kit à température ambiante.

4. Utiliser le logiciel d'analyse d'essai *digene* pour créer l'agencement des plaques de test. Se référer au manuel d'utilisation respectif pour plus de détails sur la création d'un agencement de plaque.
5. Placer les calibrateurs, les contrôles de qualité et les échantillons à tester dans un portoir pour tubes, dans l'ordre dans lequel ils seront testés. **Le calibrateur négatif, le calibrateur HPV à bas risque et le calibrateur HPV à haut risque doivent être testés EN PREMIER.** Le calibrateur négatif (NC), le calibrateur HPV à bas risque (LRC) et le calibrateur HPV à haut risque (HRC), le contrôle de qualité à bas risque (QC1-LR), le contrôle de qualité à haut risque (QC2-HR) et les échantillons doivent être placés selon une configuration en colonnes constituées de huit puits de microplaques. Voir *l'exemple de schéma* ci-dessous.

Exemple de schéma pour une série de 24 puits de microplaque :			
Rangée	Colonne		
	1	2	3
A	NC	Spéc. 1	Spéc. 9
B	NC	Spéc. 2	Spéc. 10
C	NC	Spéc. 3	Spéc. 11
D	LRC ou HRC	Spéc. 4	Spéc. 12
E	LRC ou HRC	Spéc. 5	Spéc. 13
F	LRC ou HRC	Spéc. 6	Spéc. 14
G	QC1-LR	Spéc. 7	Spéc. 15
H	QC2-HR	Spéc. 8	Spéc. 16

6. Lorsque la méthode de cocktail de sondes combinées (CPC) est employée, NC, LRC et HRC sont testés en triple avec le cocktail de sondes combinées placé sur la même microplaque. Utiliser les puits A1, B1 et C1 pour le NC et les puits D1, E1, F1, G1, H1 et A2 pour le LRC et le HRC, respectivement. Utiliser les puits B2 et C2 pour les contrôles de qualité QC1-LR et QC2-HR, respectivement et les échantillons commençant en D2. **La procédure CPC n'a pas été validée pour être utilisée avec le Rapid Capture System.**
7. Pour la méthode à double sondes, effectuer les tests en plaçant le mélange de sondes HPV à bas risque sur le côté gauche de la microplaque et le mélange de sondes HPV à haut risque sur le côté droit de la microplaque.

EN PREMIER LIEU, le calibrateur négatif (NC) et le calibrateur HPV à bas risque (LRC) sont testés en triple avec le mélange de sondes HPV à bas risque. Puis les contrôles de qualité (QC1-LR et QC2-HR) et les échantillons sont testés en simple, également avec le mélange de sondes HPV à bas risque. Placer les répliqués du NC en A1, B1, C1 ; les répliqués du LRC en D1, E1, F1 ; le QC1-LR en G1 ; le QC2-HR en H1 et les échantillons en commençant en A2.

ENSUITE, le NC et le calibrateur HPV à haut risque (HRC) sont testés en triple avec le mélange de sondes HPV à haut risque. Puis les échantillons QC1-LR et QC2-HR sont testés en simple, également avec le mélange de sondes HPV à haut risque. Placer les répliqués du NC en A7, B7, C7 ; les répliqués du HRC en D7, E7, F7 ; le QC1-LR en G7 ; le QC2-HR en H7 et les échantillons en commençant en A8. Voir l'exemple de schéma de répartition ci-dessus.

Se référer au manuel d'utilisation applicable pour une configuration appropriée des calibrateur/contrôle de qualité/échantillon dans le logiciel.

8. La procédure alternative consiste à utiliser deux microplaques indépendantes pour les calibrateurs, les contrôles de qualité et les échantillons testés avec la sonde HPV à bas risque et la sonde HPV à haut risque. NC et LRC sont testés en triple et QC1-LR et QC2-HR sont testés en simple avec le mélange de sondes HPV à bas risque sur une microplaque ; et NC et HRC sont testés en triple et QC1-LR et QC2-HR sont testés en simple avec le mélange de sondes HPV à haut risque sur une seconde microplaque. Utiliser les puits A1, B1 et C1 pour le NC et les puits D1, E1 et F1 pour LRC ou HRC, respectivement. Utiliser les puits G1 et H1 pour les contrôles de qualité QC1-LR et QC2-HR, respectivement.
9. Les échantillons peuvent être testés en simple avec le cocktail de sondes combinées lorsque la méthode CPC est utilisée, ou bien en simple avec le mélange de sondes HPV à bas risque, et en simple avec le mélange de sondes HPV à haut risque lorsque la méthode à double sondes est utilisée.

DENATURATION

Remarques:

- **Avertissement:** Le réactif de dénaturation est corrosif. Soyez prudent et portez des gants non poudrés pendant la manipulation.

- **Important:** Certains échantillons cervicaux peuvent contenir du sang ou d'autres substances biologiques susceptibles de masquer le changement de coloration lors de l'addition du réactif de dénaturation. Les échantillons qui présentent une couleur sombre avant l'addition du réactif de dénaturation 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 de l'essai. Un mélange correct peut être vérifié en observant le changement de coloration des calibrateurs et des contrôles de qualité.
- Pendant les étapes de dénaturation et d'hybridation, s'assurer que le niveau d'eau dans le bain-marie est suffisant pour couvrir la totalité du volume d'échantillon contenu dans le tube.
- Les calibrateurs, les contrôles de qualité et les échantillons peuvent être préparés jusqu'à l'étape de dénaturation et conservés à une température de 2.8°C jusqu'au lendemain, ou à -20 °C pendant une période de 3 mois au maximum. Il est possible d'effectuer 3 cycles de congélation/décongélation maximum et de laisser les échantillons à température ambiante pendant 2 heures maximum au cours de chaque cycle de décongélation. Bien agiter avant utilisation.
- Après les étapes de dénaturation et d'incubation, les échantillons ne sont plus considérés comme infectieux.²⁶ Pour autant, il est vivement conseillé au personnel de laboratoire de respecter les règles de précautions nationales et locales.
- Ne pas retirer le dispositif de prélèvement des échantillons avant la dénaturation.
- Afin d'éviter des résultats faux positifs, il est essentiel que tous les calibrateurs, les contrôles de qualité et les échantillons en STM soient en contact avec le réactif de dénaturation. Bien agiter après l'ajout du réactif de dénaturation est une étape capitale : **S'assurer que le Multi-Specimen Tube Vortexer 2 est réglé sur 100 (vitesse maximale) et qu'un vortex visible de liquide est observé pendant le mélange, de sorte que le liquide atteigne toute la surface interne du tube. Lorsque l'opération est effectuée manuellement, s'assurer que chaque calibrateur, contrôle de qualité et échantillon est agité individuellement en les vortexant chacun pendant au moins 5 secondes à vitesse maximale afin que le tourbillon de liquide lave la totalité de la surface interne du tube. Puis retourner le tube une fois.**

Procédure de préparation des calibrateurs, des contrôles de qualité et des échantillons en STM

1. Retirer et jeter les bouchons des calibrateurs, des contrôles de qualité et des tubes d'échantillons en STM.

Remarque : Les bouchons retirés des tubes d'échantillons sont considérés comme potentiellement infectieux. Les jeter en respectant les réglementations nationales et régionales.

2. Transférer le réactif de dénaturation avec l'indicateur coloré dans chaque calibrateur, contrôle de qualité ou échantillon en milieu STM en utilisant une pipette à répétition ou une pipette réglable. S'assurer de ne pas toucher les parois du tube, car cela pourrait entraîner une contamination croisée des échantillons. Le volume de réactif de dénaturation nécessaire est équivalent à la moitié du volume de l'échantillon. Le volume exact pour chaque type de calibrateur, de contrôle de qualité et d'échantillon est reporté dans le tableau ci-dessous.

Diluer le réactif de dénaturation restant dans un flacon avant de le jeter en respectant les procédures de laboratoire nationales/régionales.

Calibrateur, contrôle de qualité ou échantillon	Volumes de réactif de dénaturation nécessaire
Calibrateur négatif	1 000 µl
Calibrateur HPV à bas ou à haut risque	500 µl
Contrôles de qualité à bas ou à haut risque	500 µl
Échantillon cervical	500 µl

3. Mélanger les échantillons selon l'une des deux méthodes indiquées ci-dessous.

Méthode Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2

Remarque : Les échantillons prélevés avec le système *digene* HC2 DNA Collection Device et mélangés avec le MST Vortexer 2 **doivent** être hybridés selon la méthode d'hybridation sur microplaque avec le Microplate Heater I.

- a) Recouvrir les tubes de calibrateur, de contrôles de qualité et d'échantillons STM avec le film de scellage DuraSeal pour tubes en étirant le film sur les tubes placés dans le portoir.
- b) Placer le couvercle du portoir sur les tubes revêtus du film et le bloquer à l'aide des deux pinces latérales. Découper le film avec le dispositif de coupe.
- c) Placer le portoir dans le Multi-Specimen Tube Vortexer 2 et le fixer avec la pince. S'assurer que le réglage de la vitesse est sur 100 (vitesse maximale) et mettre le Vortexer sous tension (ON). Vortexer les tubes pendant 10 secondes.

Méthode de vortexage manuelle pour tube individuel

- a) Reboucher les tubes de calibrateur, de contrôles qualité et d'échantillons STM avec des bouchons à vis propres pour tubes de prélèvement d'échantillons.
- b) Mélanger soigneusement chaque tube individuellement par vortexage à vitesse élevée, pendant 5 secondes.
- c) Retourner chaque tube d'échantillon une fois pour laver l'intérieur du tube, le bouchon et le bord.
- d) Remettre les tubes dans le portoir.

Indépendamment de la méthode utilisée pour mélanger les échantillons, **un tourbillon de liquide doit être visible à l'intérieur de chaque tube pendant le mélange afin que le liquide lave complètement la paroi interne du tube**. Les calibrateurs, les contrôles de qualité et les échantillons doivent virer au violet.

4. Incuber les tubes placés sur le portoir dans un bain-marie à 65 ± 2 °C pendant 45 ± 5 minutes (les calibrateurs, les contrôles de qualité et les échantillons dénaturés peuvent être testés immédiatement, ou conservés suivant la manière décrite dans les Remarques précédentes). Préparer le(s) mélange(s) de sondes HPV durant l'incubation. Voir le chapitre *Préparation et conservation des réactifs*.

Procédure de préparation des échantillons en solution PreservCyt

Remarques :

- Se référer à la notice d'instructions du kit *digene* HC2 Sample Conversion pour des informations complètes.
- Le traitement d'un aliquot de 4 ml de solution PreservCyt donne suffisamment de matériau pour 2 tests, en cas de tests effectués manuellement. Le volume minimum pouvant être traité est de 4 ml.
- Préparer les échantillons en solution PreservCyt par lots de 36 au maximum. Au-delà de 36, les culots pourraient être délogés lors de la décantation du surnageant. Ceci est important pour maintenir l'intégrité des culots cellulaires pendant l'étape de décantation. Pour la préparation de flacons supplémentaires de solution PreservCyt, attendre d'avoir terminé la préparation du premier lot.

Préparation du réactif

Utiliser le réactif de dénaturation (DNR) fourni avec le kit *digene* HC2 HPV DNA (voir la section Préparation et stockage des réactifs, *Reagent Preparation and Storage*) ou le DNR fourni avec le kit *digene* HC2 Sample Conversion. Pour préparer le DNR fourni avec le kit *digene* HC2 Sample Conversion, ajouter 3 gouttes d'indicateur coloré au flacon de DNR et mélanger vigoureusement. La solution doit alors avoir une coloration violet foncé uniforme. Pour déterminer les volumes nécessaires, se reporter au tableau 1.

Tableau 1
Volumes nécessaires : Préparation du réactif

Nombre de tests	Volume de solution PreservCyt	Volume de tampon de conversion
1-2	4 ml	0,4 ml
3	6 ml	0,6 ml
4	8 ml	0,8 ml
5	10 ml	1,0 ml
6	12 ml	1,2 ml

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

Remarque : La procédure MST Vortexer 2 n'a pas été approuvée pour le vortexage des échantillons en solution PreservCyt avec tampon de conversion d'échantillons avant la centrifugation, en conséquence elle ne doit pas être utilisée pour cette étape.
5. Centrifuger les tubes dans un rotor à godets oscillants à $2\ 900 \pm 150 \times g$ pendant 15 ± 2 minutes.

6. Pendant la centrifugation, préparer le mélange à base de milieu de transport des échantillons (STM)/réactif de dénaturation (DNR) dans le rapport 2/1, conformément au tableau 2.

Remarque : Le mélange STM/DNR doit être préparé frais, chaque jour où un test est effectué.

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

Tableau 2
Volumes nécessaires : STM/DNR

Nombre de Tests	Volume de solution PreservCyt	Volume de STM par tube pour le mélange STM/DNR final*	Volume de DNR par tube pour le mélange STM/DNR final*	Mélange STM/DNR ajouté par tube
1-2	4 ml	120 µl	60 µl	150 µl
3	6 ml	170 µl	85 µl	225 µl
4	8 ml	220 µl	110 µl	300 µl
5	10 ml	270 µl	135 µl	375 µl
6	12 ml	320 µl	160 µl	450 µl

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

- b. Mélanger soigneusement la solution par vortexage.
7. Retirer les tubes de la centrifugeuse un par un et les placer sur un portoir ou sur un portoir de conversion. Un culot rose/orange doit être présent au fond de chaque tube.

Remarque : Les échantillons ne présentant pas de culot visible après la centrifugation ne sont pas acceptables pour le test et doivent être jetés.
 8. En manipulant chaque tube individuellement :
 - a. Retirer le bouchon et le poser sur une serviette en papier non pelucheux propre.
 - b. Décanter soigneusement le surnageant.
 - c. Maintenir le tube à l'envers et tapoter délicatement (environ 6 fois) sur les serviettes en papier absorbant non pelucheux jusqu'à ce qu'aucun liquide ne s'égoutte du tube. Utiliser une zone propre de la serviette à chaque fois. **Ne pas** laisser le culot cellulaire glisser le long du tube lors du séchage.

Remarques :

 - Ne pas tapoter le tube sur la même zone de la serviette en papier absorbant non pelucheux plus d'une fois.
 - Il est important d'éliminer la quantité maximum de solution PreservCyt en tapotant le tube. Cependant, il est normal d'observer de la solution PreservCyt résiduelle après le tapotage.
 - d. Placer le tube sur un portoir pour échantillons ou sur un portoir de conversion.

VORTEXAGE ET DENATURATION

Procédure de vortexage manuelle

1. Ajouter le volume approprié de mélange STM/DNR à chaque culot (voir le tableau 2). Reboucher chaque tube et remettre en suspension les culots en vortexant chaque tube individuellement pendant au moins 30 secondes à vitesse maximale. Si un des culots s'avère difficile à remettre en suspension, vortexer pendant 10 à 30 secondes supplémentaires ou jusqu'à ce que le culot se détache du fond du tube. Si un des culots ne se dissout toujours pas après l'avoir vortexé à nouveau (au total, 2 minutes maximum), noter l'identification de l'échantillon et passer à l'étape suivante.

2. Placer les tubes sur un portoir.
3. Placer le portoir dans un bain-marie à 65 ± 2 °C pendant 15 ± 2 minutes. S'assurer que le niveau d'eau est assez haut pour dépasser les liquides contenus dans les tubes.
4. Retirer le portoir avec les échantillons du bain-marie et vortexer les échantillons individuellement pendant 15 à 30 secondes.

Remarque : S'assurer que tous les culots sont entièrement remis en suspension à ce stade. Les échantillons contenant encore des culots visibles ne sont pas acceptables pour le test et doivent être jetés.
5. Replacer le portoir dans le bain-marie à 65 ± 2 °C et poursuivre la dénaturation pendant 30 ± 3 minutes supplémentaires.
6. Passer à l'étape Hybridization (*hybridation*) ou consulter la section *Optional Stop Point* (pause optionnelle) pour le stockage et le traitement des échantillons dénaturés.

Procédure Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2

Remarques :

- La méthode utilisant le MST Vortexer 2 est validée pour le traitement des échantillons en solution PreservCyt après la centrifugation et la décantation du surnageant.
 - Seul le MST Vortexer 2 est conçu pour le traitement des échantillons en solution PreservCyt.
 - Le portoir de conversion et son couvercle sont spécifiquement conçus pour recevoir les tubes de conversion d'échantillons *digene* HC2 Sample Conversion (tubes coniques de 15 ml de marque VWR ou Corning). Il est recommandé de n'utiliser qu'un type de tubes à la fois sur le portoir de conversion. L'utilisation d'autres marques n'a pas été validée.
 - Se conformer strictement aux durées de vortexage spécifiques au portoir de conversion et à son couvercle.
 - Le portoir de conversion et son couvercle ne peuvent pas être utilisés pour le vortexage des calibrateurs ou des contrôles de qualité du test *digene* HC2 DNA. La hauteur des tubes STM empêche le vortexage adéquat à l'aide du portoir de conversion et de son couvercle.
1. Après avoir tapoté chaque tube conique de 15 ml étiqueté, placer chaque tube à sa position appropriée sur le portoir de conversion.
 2. Ajouter le volume approprié de mélange STM/DNR à chaque culot (voir le tableau 2).
 3. Couvrir les tubes coniques de 15 ml de film étanche pour tube DuraSeal en étirant le film par-dessus les tubes situés sur le portoir.
 4. Placer le couvercle du portoir sur les tubes recouverts de film et bloquer le couvercle en place à l'aide des deux attaches latérales. Découper le film à l'aide du cutter une fois que le couvercle est bien attaché.
 5. Soulever le levier à poignée rouge jusqu'à ce qu'il soit en position horizontale.
 6. Placer le portoir de conversion et son couvercle sur le MST Vortexer 2 de manière à ce que le coin diagonal le plus grand du portoir de conversion soit situé dans le coin avant droit. Placer le portoir avec son couvercle sur la plate-forme du MST Vortexer 2 de manière à ce qu'il soit fermement ajusté dans les guides prévus à cet effet. Pousser ensuite le levier à poignée rouge complètement vers le bas jusqu'à ce qu'il soit en position verticale. Cela bloquera le portoir en place.
 7. S'assurer que le réglage de vitesse est défini sur 100 (vitesse maximale) et que le commutateur à bascule Pulser est sur la position OFF.
 8. Mettre le commutateur à bascule de l'agitateur sur la position ON. **Vortexer les tubes pendant 30 secondes.**
 9. Basculer l'interrupteur d'alimentation du Vortexer sur la position OFF.
 10. Retirer le portoir de conversion avec son couvercle du MST Vortexer 2 en soulevant le levier à poignée rouge.

11. Placer le portoir dans le bain-marie à 65 ± 2 °C pendant 15 ± 2 minutes. S'assurer que le niveau d'eau couvre complètement tout le liquide présent dans les tubes.
12. Après l'incubation de 15 minutes, retirer le portoir avec les échantillons du bain-marie.
13. Pour éviter les projections, sécher tout surplus d'eau présent sur le portoir avant de placer celui-ci dans le MST Vortexer 2.
14. Fixer le portoir de conversion sur le MST Vortexer 2 comme décrit dans l'Étape 6.
15. S'assurer que le réglage de vitesse est défini sur 100 et mettre le commutateur du vortexer sur la position ON. **Vortexer les tubes pendant 1 minute.**
16. Mettre le commutateur à bascule Power de l'agitateur sur la position OFF.
Remarque : La procédure de vortexage à l'aide du MST Vortexer 2 standardise la vitesse, la durée et le processus de mélange, éliminant ainsi la nécessité de vérifier visuellement la présence de culots cellulaires qui est nécessaire lorsqu'on procède à un vortexage manuel.
17. Replacer le portoir dans le bain-marie à 65 ± 2 °C et poursuivre la dénaturation pendant 30 ± 3 minutes.
18. Retirer le portoir du bain-marie, sécher le portoir et le fixer sur l'agitateur.
19. Basculer le commutateur du Vortexer sur la position ON. **Vortexer pendant 10 secondes à la vitesse maximum.**
20. Basculez l'interrupteur d'alimentation du Vortexer sur la position OFF. Retirer le portoir.
21. Enlever immédiatement le couvercle du portoir et le film étanche pour tube DuraSeal des échantillons.
22. Passer à l'étape Hybridization (*hybridation*) ou consulter la section *Optional Stop Point* (pause optionnelle) pour le stockage et le traitement des échantillons dénaturés.

Procédure de préparation des échantillons en solution SurePath (UNIQUEMENT pour le test d'ADN de HPV à haut risque)

Après le traitement cytologique, procéder de la manière suivante :

1. S'assurer que le volume de liquide observé est de 2,8 ml.

ATTENTION : Si le culot cellulaire résiduel semble contenir moins de 1 ml de liquide, il est possible que le liquide conservateur SurePath n'ait pas été ajouté post-cytologie et que l'échantillon NE conviennent PAS au test d'ADN de HPV à haut risque.

2. Vérifier que les échantillons ont été amenés à température ambiante.
3. Centrifuger l'échantillon dans un rotor à godets oscillants à $800 \pm 15 \times g$ pendant 10 ± 1 minutes.
4. Retirer les tubes de la centrifugeuse.
5. Décanter avec précaution le surnageant immédiatement après la centrifugation et tapoter délicatement chaque tube (environ 3 fois) sur des serviettes en papier absorbant pour éliminer l'excès de liquide. Observer le culot de chaque tube. **Ne pas laisser le culot cellulaire glisser le long du tube lors du séchage sur le papier absorbant.**
6. Placer les tubes dans le portoir.
7. Ajouter 200 µl de STM à chaque culot en utilisant une pipette à répétition ou une pipette réglable.
Remarque : Les tubes peuvent être mélangés sans être bouchés.
8. Remettre chaque culot en suspension en vortexant chaque tube individuellement pendant 15 secondes à grande vitesse. S'il est difficile de remettre le culot en suspension, vortexer pendant 5 à 30 secondes supplémentaires ou jusqu'à ce que le culot se décolle du fond du tube et se dissolve.

- Ajouter 100 µl de réactif de dénaturation préparé (contenant de l'indicateur coloré) à chaque échantillon à l'aide d'une pipette à répétition ou d'une pipette réglable.

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

Si vous devez jeter le réactif de dénaturation restant, veuillez vous soumettre aux réglementations locales, nationales et régionales en vigueur relatives à l'élimination des substances corrosives.

- Bien mélanger chaque tube en les vortexant individuellement pendant 5 secondes à grande vitesse.

Remarque : Les tubes peuvent être mélangés sans être bouchés.

Étiqueter des tubes coniques de 15 ml à l'aide de l'identification et du type de l'échantillon appropriés (par exemple, « SP » pour un échantillon de type SurePath) puis les placer dans un portoir.

Remarque : Si le Rapid Capture System est utilisé pour un traitement semi-automatisé des tests, il est impératif d'utiliser des tubes coniques de 15 ml de marque VWR ou Corning pour que le positionnement dans le portoir de conversion *digene* soit correct (portoir argenté).

- Transférer tout le volume dans un tube conique de 15 ml avec bouchon à vis en utilisant une pipette de transfert standard jetable de 7-ml ou une pipette équivalente¹.
- Mettre des bouchons sur les tubes coniques de 15 ml.
- Incuber dans un bain-marie à 65 ± 2 °C pendant 90 ± 5 minutes.

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

- Si les tests de HPV doivent être terminés le même jour, dénaturer les calibrateurs du test *digene* HC2 DNA selon la présente notice d'instructions.
- Retirer le portoir d'échantillons du bain-marie.

Pause optionnelle

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

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

Il est possible d'effectuer 3 cycles de congélation/décongélation maximum et de laisser les échantillons à température ambiante pendant 2 heures maximum au cours de chaque cycle de décongélation.

HYBRIDATION : METHODE AVEC LE COCKTAIL DE SONDAS COMBINEES (CPC) ET METHODE A DOUBLE SONDAS

Remarques :

- Les mélanges de sondes HPV sont 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. Se reporter à la section *Reagent Preparation and Storage* (préparation et stockage des réactifs).

¹ Les tests de vérification de QIAGEN utilisaient des tubes coniques de 15 ml de marque VWR

- Si les échantillons dénaturés ont été conservés à -20 °C, laisser les échantillons décongeler à une température comprise entre 20 et 25 °C et les vortexer soigneusement avant de procéder à l'hybridation.
- Préchauffer le Microplate Heater I à 65 ± 2 °C pendant au moins 60 minutes avant de l'utiliser. Pour obtenir des instructions supplémentaires, se référer au manuel d'utilisation du *Microplate Heater I (Microplate Heater I User Manual)*.

Méthode d'hybridation utilisant la microplaque d'hybridation et le Microplate Heater I

Remarque : Les échantillons prélevés avec le système de prélèvement *digene* HC2 DNA Collection Device en solution STM et traités selon la procédure MST Vortexer 2 peuvent être hybridés **uniquement** en utilisant la méthode Microplate Heater I.

1. Se procurer une microplaque d'hybridation et l'étiqueter.
2. Après l'incubation, retirer du bain-marie les calibrateurs, les contrôles de qualité et les échantillons. Si le Multi-Specimen Tube Vortexer 2 est utilisé, mélanger tout le portoir d'échantillons en solution STM au Vortex pendant 5 secondes minimum à la vitesse maximale. Pour les échantillons en solution PreservCyt ou en solution SurePath, mélanger au vortex la totalité du portoir de conversion pendant au moins 10 secondes à vitesse maximale. Une autre méthode consiste à mélanger chaque tube individuellement au vortex pendant au moins 5 secondes.
3. Transférer 75 µl de chaque tube de calibrateur, de contrôle de qualité ou d'échantillon au **fond** d'un puits vide d'une microplaque d'hybridation selon l'agencement de plaque créé sous *Setup* (configuration). Éviter de toucher les parois des puits et limiter la formation de bulles d'air. Utiliser un embout pour pipette extra-long et propre pour chaque transfert afin d'éviter la contamination croisée des calibrateurs, des contrôles de qualité ou des échantillons. Ne pas retirer le dispositif de prélèvement du tube de transport des échantillons. Les échantillon dénaturés peuvent être rebouchés avec des bouchons à vis pour tubes de prélèvement d'échantillons et conservés avec le système de prélèvement d'échantillons restant dans les tubes. Les échantillons en solution PreservCyt dénaturés peuvent être rebouchés avec leur bouchon d'origine.

Remarque : Des résultats faussement positifs peuvent être obtenus si les fractions aliquotes des échantillons ne sont pas transférées avec soin. Pendant le transfert des échantillons, ne pas toucher l'intérieur du tube avec l'embout de la pipette lorsque les 75 µl d'aliqots sont retirés.

4. Une fois le dernier échantillon transféré, couvrir la plaque à l'aide d'un couvercle de plaque et **incuber la microplaque d'hybridation pendant 10 minutes entre 20 et 25 °C**.
5. Aliquoter le mélange de sondes préparé et soigneusement mélangé au Vortex dans un réservoir pour réactif à usage unique. Distribuer soigneusement 25 µl de mélange de sondes dans chaque puits contenant les calibrateurs, les contrôles de qualité et les échantillons à l'aide d'une pipette à 8 canaux et d'embouts neufs pour chaque rangée. Distribuer le volume de sonde dans chaque puits d'hybridation, en s'assurant de ne pas éclabousser. Éviter de toucher les bords des puits. Placer le couvercle sur la microplaque et le garder pendant toute la durée de l'incubation de l'étape de dénaturation.
6. Couvrir la microplaque d'hybridation avec un couvercle pour microplaque et mélanger avec le dispositif Hybrid Capture System Rotary Shaker I réglé à $1\ 100 \pm 100$ tours/min. pendant 3 ± 2 minutes. *Les calibrateurs, contrôles de qualité et échantillons doivent virer au jaune après avoir été mélangés.* Les puits dont la coloration violette persiste, peuvent ne pas avoir reçu la quantité exacte de mélange de sondes. Ajouter 25 µl supplémentaires de mélange de sondes dans les échantillons qui ont conservé une coloration violette et mélanger à nouveau. Si les puits demeurent violets après avoir suivi cette procédure, les échantillons devront être de nouveau testés.

Remarques :

- Après agitation, les échantillons en solution PreservCyt doivent virer au rose au lieu de virer au jaune.
 - En plaçant la microplaque d'hybridation dans le Microplate Heater I, veillez à ne pas provoquer d'éclaboussures.
7. Incuber dans un Microplate Heater I préalablement chauffé et équilibré à 65 ± 2 °C pendant 60 ± 5 minutes.

Méthode d'hybridation avec microtubes et bain-marie

Remarques :

- Le traitement d'échantillons prélevés avec le système *digene* HC2 DNA Collection Device en solution STM **n'a pas été validé** avec la méthode MST Vortexer 2 pour effectuer le mélange et la méthode du bain-marie pour effectuer l'hybridation. Les échantillons prélevés avec le système *digene* HC2 DNA Collection Device en solution STM et traités selon la méthode MST Vortexer 2 peuvent être hybridés **uniquement** en utilisant la méthode Microplate Heater I.
 - Si l'échantillon dénaturé a été conservé à -20 °C, laisser l'échantillon décongeler à une température de $20-25$ °C, puis le mélanger vigoureusement au vortex avant d'effectuer l'hybridation.
1. Étiqueter et placer le nombre requis de microtubes d'hybridation propres dans le portoir de microtubes.
 2. Après incubation, retirer les calibrateurs, les contrôles de qualité et les échantillons du bain-marie. Juste avant de prélever les aliquots, vortexer chaque tube individuellement pendant au moins 5 secondes.
 3. Transférer 75 µl de chaque tube de calibrateur, de contrôle de qualité ou d'échantillon au **fond** d'un microtube d'hybridation selon l'agencement de plaque créée sous Setup (configuration). Éviter de toucher les parois des microtubes et limiter la formation de bulles d'air. Utiliser un embout pour pipette extra-long et propre pour chaque transfert afin d'éviter la contamination croisée des calibrateurs, des contrôles de qualité ou des échantillons. Il n'est pas nécessaire de retirer le dispositif de prélèvement du tube de transport des échantillons. Les échantillon dénaturés peuvent être rebouchés avec des bouchons à vis pour tubes de prélèvement d'échantillons et conservés avec le système de prélèvement d'échantillons restant dans les tubes.

Remarque : Des résultats faussement positifs peuvent être obtenus si les fractions aliquotes des échantillons ne sont pas transférées avec soin. Lors du transfert des échantillons de 75 µl, ne pas toucher l'intérieur du tube avec l'embout de la pipette.

4. Après avoir transféré le dernier échantillon, **incuber les microtubes d'hybridation pendant 10 minutes à $20-25$ °C.**
5. Aliquoter le mélange de sondes préparé et soigneusement mélangé au Vortex dans un réservoir pour réactif à usage unique. Distribuer soigneusement 25 µl de mélange de sondes dans chaque microtube contenant les calibrateurs, les contrôles de qualité et les échantillons à l'aide d'une pipette à 8 canaux et d'embouts neufs pour chaque rangée. Distribuer le volume de sonde dans chaque microtube d'hybridation, en veillant à ne pas faire d'éclaboussures. Éviter de toucher les parois des tubes. Inspecter le portoir pour vérifier que tous les tubes ont reçu la quantité appropriée de mélange de sondes.
6. Couvrir les microtubes avec du film étanche pour microplaque. Placer un couvercle sur le portoir. Agiter le portoir de microtubes en utilisant le Rotary Shaker I réglé à $1\ 100 \pm 100$ tr/min pendant 3 ± 2 minutes. *Les calibrateurs, contrôles de qualité et échantillons doivent virer au jaune après avoir été mélangés.* Les tubes dont la coloration violette persiste peuvent ne pas avoir reçu la quantité exacte de mélange de sondes. Ajouter 25 µl supplémentaires de mélange de sondes

dans les échantillons qui ont conservé une coloration violette et mélanger à nouveau. Si les tubes demeurent violet après avoir suivi cette procédure, les échantillons devront être de nouveau testés.

Remarque : Après la phase d'agitation, la coloration des échantillons en solution PreservCyt doit virer au rose au lieu du jaune.

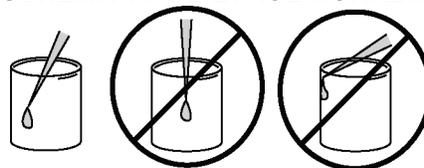
7. Incuber dans un bain-marie à 65 ± 2 °C pendant 60 ± 5 minutes. S'assurer que le niveau d'eau du bain-marie soit suffisant pour couvrir tous le volume du mélange d'hybridation. Le portoir pour microtubes flottera dans le bain-marie.

Remarque : Créer un fichier d'agencement de plaque en utilisant le logiciel d'analyse d'essai *digene* si cela n'a pas déjà été fait.

CAPTURE DES HYBRIDES

1. Retirer du cadre de la microplaque tous les puits de microplaque de capture qui ne sont pas nécessaires. Replacer dans le sac d'origine les puits de microplaque inutilisés et refermer hermétiquement. Numéroter chaque colonne 1, 2, 3 etc. au stylo-feutre. . . . Étiqueter la microplaque avec un identifiant approprié. Les échantillons seront ajoutés dans les puits en respectant l'exemple de schéma de microplaque créé sous « Setup ».
2. Avec précaution, retirer la microplaque d'hybridation contenant les calibrateurs, les contrôles de qualité et les échantillons du Microplate Heater I. Retirer immédiatement le couvercle de la microplaque et le placer sur une surface propre. En variante, retirer le portoir de microtubes du bain-marie. Enlever immédiatement le couvercle du portoir et retirer lentement la feuille adhésive du portoir.
3. À l'aide d'une pipette à 8 canaux, transférer la totalité du contenu (environ 100 µl) des calibrateurs, des contrôles de qualité et des échantillons des puits de la microplaque d'hybridation ou des microtubes, dans les puits des microplaques de capture correspondants. Changer les embouts de la pipette à 8 canaux à chaque transfert de colonne et laisser chaque embout de pipette se vider pour s'assurer du transfert complet des échantillons. Si cela est nécessaire, la pipette peut être stabilisée en posant le **milieu** de l'embout sur le bord supérieur des puits de la microplaque de capture. (voir le *Schéma 1*).

SCHÉMA 1 : PIPETAGE CORRECT



Correct

Ne pas pipeter en tenant la pipette verticalement. Éviter les éclaboussures.

Ne pas laisser l'embout toucher la paroi du puits.

4. Recouvrir la microplaque de capture avec le couvercle pour microplaque ou une feuille adhésive et incuber au Rotary Shaker I à 100 ± 100 tours min., à $20-25$ °C pendant 60 ± 5 minutes.
5. Préparer le tampon de lavage et vérifier les réservoirs de rinçage et de lavage de l'Automated Plate Washer pendant cette incubation. Voir le chapitre « Préparation et conservation des réactifs ».
6. Lorsque l'étape de capture est terminée, retirer la microplaque de capture du Rotary Shaker I et enlever avec précaution le couvercle pour microplaque ou la feuille adhésive. Éliminer le liquide

des puits en retournant complètement la microplaque au-dessus d'un évier et en la secouant vers le bas. Prendre des précautions pour ne pas décanter trop près du fond de l'évier ce qui pourrait causer des éclaboussures. **Ne pas retourner la plaque** ; 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 et que la partie supérieure de la plaque est sèche.

DÉTECTION DES HYBRIDES

Remarques :

- Effectuer les additions en travers de la plaque, de gauche à droite, en utilisant une pipette à 8 canaux.
 - La méthode de pipetage inversé est recommandée pour obtenir une distribution constante de réactif. Avec cette technique, en se servant du deuxième cran du bouton d'aspiration/distribution de la pipette (piston), les embouts de pipette débordent initialement. Voir la procédure ci-dessous. Essuyer les embouts sur le réservoir à réactif à usage unique afin de retirer l'excès de réactif avant la distribution dans la microplaque.
 - Si cela est nécessaire, la pipette peut être stabilisée en posant le milieu de l'embout de pipette sur le bord supérieur des puits de la microplaque. Pour éviter une contamination croisée des échantillons, s'assurer que la pipette ne touche pas la surface interne des puits de la microplaque. Se reporter au schéma 1 ci-dessus.
1. Distribuer en fractions aliquotes le volume approprié de réactif de détection 1 dans un réservoir jetable pour réactif (voir la section *Reagent Preparation and Storage* (préparation et stockage des réactifs) pour plus d'instructions). Distribuer soigneusement 75 µl de réactif de détection 1 dans chaque puits de la microplaque de capture à l'aide d'une pipette à 8 canaux et de la méthode de pipetage inversé.

Procédure de pipetage inversé :

- 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 la solution de réactif de détection 1.
 - d) Relâcher lentement le piston de manière à remplir les embouts de réactif.
 - e) Distribuer la solution dans les puits de la microplaque (75 µl) en appuyant sur le piston jusqu'au premier cran. Ne pas relâcher le piston avant d'avoir de nouveau immergé les embouts de la pipette dans la solution de réactif de détection 1.
 - f) Remplir à nouveau les embouts et recommencer l'opération jusqu'à ce que les puits de la microplaque soient remplis. Remplir les puits de la microplaque de gauche à droite. S'assurer que tous les puits ont été remplis en observant l'intensité de la coloration rose. Tous les puits doivent présenter une intensité similaire.
2. Couvrir les microplaques avec un couvercle pour microplaque ou du Parafilm propre (ou un équivalent) et incubé à 20-25 °C pendant 30 à 45 minutes.

LAVAGE

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

Méthode utilisant le laveur Automated Plate Washer

Remarque : Maintenir le laveur Automated Plate Washer sous tension (**ON**) en permanence. 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 de l'Automated Plate Washer (*Automated Plate Washer User Manual*).

AVANT CHAQUE UTILISATION :

- S'assurer que le réservoir de lavage soit rempli de tampon de lavage au moins jusqu'au repère indiquant 1 L. S'il ne l'est pas, préparer de la solution de tampon de lavage. Voir le chapitre « Préparation et conservation des réactifs ».
- 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.

1. Retirer le couvercle de la plaque et placer la plaque sur la plateforme du laveur Automated Plate Washer.
2. Vérifier que le laveur est sous tension et qu'il affiche le message « Digene Wash Ready » (Prêt pour lavage) ou « P1 ».

Remarque : Dans le cas où une barrette de puits de capture est partiellement utilisée, il sera nécessaire de placer des puits de microplaque vides sur la microplaque de capture de façon à compléter la colonne avant l'opération de lavage.

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

Méthode de lavage manuelle

1. Éliminer le réactif de détection 1 des puits en plaçant un papier absorbant propre (lingettes Kimtowels ou un papier absorbant non-pelucheux équivalent) sur la microplaque, puis en la retournant délicatement. Avant de retourner la plaque, s'assurer que le papier absorbant est en contact avec toute la surface de la plaque. Laisser la plaque s'égoutter pendant 1 à 2 minutes. La sécher correctement sur des lingettes KimTowels propres ou un papier absorbant équivalent non pelucheux. Jeter le papier utilisé afin d'éviter une contamination par de la phosphatase alcaline lors des étapes suivantes.
2. Laver la microplaque manuellement 6 fois à l'aide de l'appareil de lavage. L'eau dans chaque puits doit déborder de façon à retirer le réactif de détection 1 de la partie supérieure des puits. Laver en commençant en A1 et continuer en dessinant un serpentín de gauche à droite et de haut en bas. Lorsque tous les puits ont été remplis, renverser la microplaque vigoureusement dans l'évier pour en décanter le liquide. Commencer le second lavage dans le puits H12 en dessinant un serpentín de droite à gauche et de bas en haut. Cette séquence de 2 cycles de lavage est répétée encore 2 fois pour obtenir un total de 6 cycles de lavage par puits.
3. Après le cycle de lavage final, sécher la microplaque en la retournant sur du papier absorbant (lingettes Kimtowels ou un papier absorbant non-pelucheux équivalent) et en la tapotant fermement 3 ou 4 fois. Changer le papier absorbant et sécher à nouveau. Laisser la microplaque retournée pendant 5 minutes pour lui permettre de s'égoutter. Essuyer la microplaque une dernière fois.
4. La microplaque doit être de couleur blanche sans liquide résiduel rose dans les puits de la microplaque.

AMPLIFICATION DU SIGNAL

REMARQUES :

- Utiliser une nouvelle paire de gants pour manipuler le réactif de détection 2.
 - Ne distribuer **que** la quantité de réactif requise pour le test dans le réservoir pour réactif jetable afin d'éviter toute contamination du réactif de détection 2. Voir le paragraphe « Préparation du réactif ». **Ne pas verser le réactif de détection 2 dans son flacon d'origine. Après l'opération, jeter le réactif inutilisé.**
 - Le réactif de détection 2 doit être ajouté sans interruption. Dans la mesure du possible, la durée d'incubation doit être la même pour tous les puits.
 - S'assurer de ne pas toucher les parois des puits de la microplaque ou d'éclabousser le réactif sur les embouts de pipette en raison de risques éventuels de contamination croisée des échantillons (voir Schéma 1).
1. Distribuer avec soin 75 µl de réactif de détection 2 dans chaque puits de la microplaque de capture à l'aide d'une pipette à 8 canaux, de la manière décrite précédemment. *Tous les puits de la microplaque doivent virer au jaune.* S'assurer que tous les puits ont été remplis en observant l'intensité de la coloration. Tous les puits doivent présenter une intensité similaire.
 2. Couvrir les microplaques avec un couvercle pour microplaque ou un film étanche et propre (Parafilm ou équivalent), et incuber à 20-25 °C pendant 15 minutes. Éviter toute exposition à la lumière solaire directe.
 3. Lire la microplaque sur l'appareil DML après 15 minutes d'incubation (ne pas dépasser 30 minutes d'incubation).
 4. Le protocole du logiciel spécifique au test permettra d'entrer des informations de test pertinentes directement dans le logiciel.
 5. Si la totalité de la microplaque n'a pas été utilisée, enlever du support pour microplaque les puits utilisés, rincer le support soigneusement à l'eau déminéralisée ou distillée, le sécher et le conserver pour le prochain test.

CRITERES DE VERIFICATION DE LA CALIBRATION DU TEST

La vérification de la calibration de l'essai est effectuée pour garantir la fiabilité des réactifs, des calibrateurs et des contrôles de qualité fournis, ce qui permet une détermination précise de la valeur de seuil de l'essai. Le test *digene* HC2 HPV DNA requiert une calibration à chaque test, il est donc nécessaire de vérifier chaque test selon les critères suivants. Cette procédure de vérification d'essai n'est pas destinée à se substituer aux tests internes de contrôle de qualité. Les protocoles de test du logiciel d'analyse d'essai *digene* vérifient automatiquement les critères suivants.

1. Calibrateur négatif

Le calibrateur négatif doit être testé en triple avec chaque test. La moyenne du calibrateur négatif doit être ≥ 10 et ≤ 250 RLU pour pouvoir poursuivre la procédure. Les résultats du calibrateur négatif affichent un coefficient de variation (CV %) de ≤ 25 %. Si le CV % est > 25 %, éliminer la valeur ayant une valeur RLU la plus éloignée de la moyenne, comme valeur aberrante, et recalculer la moyenne en utilisant les deux valeurs restantes. Si la différence entre la moyenne et chacune des deux valeurs est ≤ 25 %, aller à l'étape 2. Autrement la vérification de la calibration de l'essai n'est pas valide et le test doit être recommencé pour tous les échantillons des patientes. Par conséquent, ne pas reporter les résultats des échantillons des patientes.

2. Calibrateurs

Les calibrateurs doivent être testés en triple avec chaque test. Pour le CPC, les deux calibrateurs doivent être testés en triple. Les résultats des calibrateurs doivent présenter un coefficient de variation (CV %) de ≤ 15 %. Pour la méthode CPC, le CV % des LRC, HRC et LRC-HRC combinées doit présenter un CV % ≤ 15 %. Si le CV % est > 15 %, éliminer la valeur du calibrateur ayant une valeur RLU la plus éloignée de la moyenne, comme valeur aberrante, et recalculer la moyenne en utilisant les valeurs de calibrateur restantes. Seuls 1 réplicat de LRC et 1 réplicat de HRC peuvent être supprimés. Si le CV % du calibrateur est ≤ 15 %, aller à l'étape 3. Autrement la vérification de la calibration de l'essai n'est pas valide et le test doit être recommencé pour tous les échantillons des patientes. Par conséquent, ne pas reporter les résultats des échantillons des patientes.

La vérification de la calibration de l'essai décrite ci-dessus pour les calibrateurs est réalisée automatiquement par le logiciel d'analyse d'essai *digene* et imprimée dans le rapport d'analyse des données. **Les protocoles d'analyse d'essais *digene* pour le HPV vérifient automatiquement si le CV % des calibrateurs de HPV à bas risque et à haut risque est ≤ 15 %.** Cependant, les versions v1.0.2 et v1.0.3 du logiciel d'analyse d'essais *digene* n'invalideront PAS le test à moins que le CV % soit > 25 % pour les calibrateurs. En conséquence, l'utilisateur doit vérifier manuellement que le CV % calculé par le logiciel d'analyse d'essais *digene* est ≤ 15 % et suivre la procédure indiquée pour la situation 1 dans le tableau présenté ci-dessous. Si le CV % des réplicats des calibrateurs est compris entre 15 et 25, se reporter aux instructions de la situation 2 ou 3 dans le tableau ci-dessous et suivre la procédure indiquée sous « User action » (Mesure à prendre).

Situation	CV % établi pour les répliqués de LRC et/ou HRC	Mesure prise par le logiciel d'analyse d'essai <i>digene</i>	Mesure à prendre
1	≤ 15 %	Test reporté comme « Valide »	Résultats acceptés ; pas d'autre mesure à prendre.
2	Entre 15 % et 25 %	Pas de valeur aberrante éliminée et test reporté comme « Valide »	Éliminer la valeur RLU du calibrateur la plus éloignée de la moyenne. Recalculer le CV % du calibrateur avec les 2 valeurs restantes. Si le CV % des valeurs RLU restantes est > 15 %, le test est invalide. Les résultats ne doivent pas être reportés. Si le % CV des valeurs RLU restantes est ≤ 15 %, recalculer la valeur de seuil du test, puis recalculer le rapport RLU/seuil de chaque échantillon en utilisant ce seuil. Ces valeurs recalculées peuvent être reportées.
3	Entre 15 % et 25 %	1 valeur aberrante par calibrateur éliminée et test reporté comme « Valide »	Le test est invalide. Les résultats ne doivent pas être reportés. Le test doit être répété.
4	> 25 %	1 valeur aberrante éliminée et test reporté comme « Invalide »	Le test est invalide. Les résultats ne doivent pas être reportés. Le test doit être répété.

Pour calculer manuellement le CV % comme indiqué dans la situation 2 décrite ci-dessus, l'utilisateur doit diviser l'écart-type (STDEV) (n-1) des valeurs RLU restantes du répliquat par la moyenne des valeurs RLU restantes du répliquat (LRC ou HRC ou les deux) et multiplier ce résultat par 100.

Pour calculer le % CV avec Microsoft[®] Excel[®] (livré avec la version antérieure de logiciel d'analyse d'essai *digene*), l'utilisateur peut calculer l'écart type des répliqués de calibrateur en utilisant la formule *STDEV* et déterminer la RLU moyenne du calibrateur en utilisant la formule *AVERAGE*. Une fois ces valeurs obtenues, diviser *STDEV* par *AVERAGE* et multiplier le résultat par 100 pour obtenir le CV %.

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

Pour toute question relative au calcul des CV %, au nouveau calcul de la valeur seuil du test ou du rapport RLU/CO (RLU/valeur seuil) des échantillons, veuillez contacter votre représentant local QIAGEN.

Pour déterminer la reproductibilité du calibrateur et estimer la fréquence à laquelle les calculs manuels doivent être recommencés, les résultats de trois évaluations cliniques impliquant 152 cycles de test réalisés avec le test *digene* HC2 HPV DNA ont été compilés. Les résultats montrent que la moyenne des CV % pour ces 152 séries de tests était de 8,1. Prenant en compte les trois répliqués du calibrateur par série de tests, une reproductibilité du calibrateur avec un CV % > 15 a été observée seulement pour 17 séries de tests sur 152 (11,2 %), avec 10 séries de test sur 17 dont le CV % était compris entre 15 et 25 (Situation 2). Pour les 17 séries de tests présentant un CV % > 15, une seule valeur aberrante a été éliminée et le CV % recalculé. En suivant la « Mesure à prendre » de la Situation 2, un seul CV % des séries de tests était encore > 15, rendant la série de tests invalide. Les CV % des 151 séries de tests restantes étaient de 6,0 en moyenne.

- Les résultats de la moyenne des calibrateurs (LRC ou HRC) et de la moyenne du calibrateur négatif (NC) sont utilisés pour calculer le rapport LRC/NC ou HRC/NC pour chaque sonde. Les versions antérieures (V1.0.2 et V1.0.3) des protocoles du logiciel d'analyse d'essai *digene* ne calculent pas correctement les plages acceptables. Ces rapports doivent remplir les critères suivants de façon à vérifier la calibration du test avant que les résultats des échantillons ne soient interprétés :

MÉTHODE CPC	MÉTHODE À DOUBLE SONDES
Vérification de la calibration de l'essai Plages acceptables	Vérification de la calibration de l'essai Plages acceptables
$2,0 \leq LRC\bar{x} / NC\bar{x} \leq 15$	$2,0 \leq LRC\bar{x} / NCLR\bar{x} \leq 15$ (partie LR)
$2,0 \leq HRC\bar{x} / NC\bar{x} \leq 15$	$2,0 \leq HRC\bar{x} / NCHR\bar{x} \leq 15$ (partie HR)
$2,0 \leq (LRC \text{ et } HRC) \bar{x} / NC\bar{x} \leq 15$	

4. Calculer le rapport $LRC\bar{x}/NC\bar{x}$ ou $HRC\bar{x}/NC\bar{x}$ approprié pour chaque jeu de sondes. Si les rapports sont $\geq 2,0$ et ≤ 15 , aller à l'étape suivante. Si l'un quelconque des rapports est $< 2,0$ ou > 15 , **l'essai n'est pas valide pour cette sonde spécifique et le test doit être recommencé.** Tous les échantillons de patientes de cette série doivent être de nouveau testés.

Remarque : Des plages acceptables pour les calibrateurs négatifs et positifs ont été établies uniquement pour un luminomètre DML.

CALCULS DE LA VALEUR SEUIL

Une fois qu'une série a été validée selon les critères mentionnés ci-dessus, les valeurs du seuil de positivité sont calculées comme suit :

1) Méthode avec cocktail de sondes combinées :
$$\frac{(\text{réplicats LRC} + \text{réplicats HRC})}{\text{Nombre de réplicats}}$$

2) Méthode à double sondes : Seuil des sondes HPV à bas risque = $LRC\bar{x}$
Seuil de sondes HPV à haut risque = $HRC\bar{x}$

Exemple de calculs de la valeur seuil					
pour :		Sonde HPV à bas risque ou à haut risque Méthode double sonde	Sonde HPV à bas risque, Méthode CPC	Sonde HPV à haut risque Méthode CPC	Sondes HPV combinées Méthode CPC
	Valeurs RLU NC	Valeurs RLU LRC ou HRC	Valeurs RLU LRC	Valeurs RLU HRC	Valeurs RLU LRC et HRC
	97	312	330	235*	330
	101	335	305	295	305
	91	307	385	279	385
					295
					235*
					279
Valeur RLU moyenne	96	318	340	287*	318,8*
CV %	4,9	4,7	12,0	3,9*	13,0
$LRC\bar{x}/NC\bar{x}$	S.O.	3,31	3,54	3,00	3,32

La valeur RLU moyenne pour le calibrateur positif détermine la valeur seuil du test. La valeur du seuil positive est donc $(LRC\bar{x}) = 318$.

* Le CV % moyen des 6 répliqués était de 16,8. Les répliqués d'une valeur de 235 ont été éliminés comme valeur aberrante. Le CV % des répliqués restants était de 13,0 avec une moyenne de 318,8. Le CV % initial pour HRC était de 11,5.

Toutes les valeurs RLU des échantillons doivent être converties en un rapport par rapport à la valeur seuil appropriée. Par exemple, tous les échantillons testés avec la sonde HPV à bas risque doivent être exprimés sous la forme RLU Échantillon/Valeur seuil à bas risque. La même procédure peut être suivie pour les échantillons testés avec la sonde HPV à haut risque ou la sonde CPC.

Remarques : Les valeurs RLU/CO et les résultats positif/négatif de tous les échantillons sont consignés dans le *Data Analysis Report* (rapport d'analyse des données) de l'appareil DML.

Pour l'application d'appareil Rapid Capture System, le protocole de logiciel HPV du RCS a été programmé pour appliquer un facteur d'ajustement de la calibration (CAF) de 0,8 à la moyenne de la valeur RLU des répliqués du calibrateur positif. Ce CAF est nécessaire de manière à ce que les performances du test restent équivalentes à la procédure de test manuelle. Ce changement s'applique uniquement aux tests effectués à l'aide de l'application d'appareil Rapide Capture System. C'est pourquoi il est essentiel de sélectionner le protocole de logiciel adéquat à utiliser avec chaque méthode de test spécifique afin de générer des résultats de test exacts. Toutes les valeurs RLU des échantillons doivent être converties en un rapport par rapport à la valeur seuil (CO) appropriée. Par exemple, tous les tests doivent être exprimés sous la forme du rapport RLU Échantillon/Valeur CO.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Les échantillons de contrôle de qualité sont fournis avec le test *digene* HC2 HPV DNA. Consulter le manuel d'utilisation approprié pour obtenir des instructions sur la manière d'entrer les numéros de lots et les dates d'expiration des contrôles de qualité. Pour que la série de tests soit considérée comme valide, ces contrôles de qualité doivent être inclus dans chaque série de tests et le rapport RLU/CO de chaque contrôle de qualité doit être compris dans les marges acceptables suivantes. **Si les contrôles de qualité n'entrent pas dans ces plages, l'essai n'est pas valide et le test doit être recommencé.** Par conséquent, ne pas reporter les résultats obtenus lors d'une série invalide.

Contrôle de qualité	Type de HPV	Résultat attendu (RLU/valeur seuil) Sonde HPV à bas risque			
		Minimum	Maximum	Moyenne	CV %
QC1-LR	Bas risque (HPV 6)	2	8	5,0	25
QC2-HR	Haut risque (HPV 16)	0,001	0,999	0,5	25

Contrôle de qualité	Type de HPV	Résultat attendu (RLU/valeur seuil) Sonde HPV à haut risque			
		Minimum	Maximum	Moyenne	CV %
QC1-LR	Bas risque (HPV 6)	0,001	0,999	0,5	25
QC2-HR	Haut risque (HPV 16)	2	8	5,0	25

Contrôle de qualité	Type de HPV	Résultat attendu (RLU/valeur seuil) Sonde HPV CPC			
		Minimum	Maximum	Moyenne	CV %
QC1-LR	Bas risque (HPV 6)	2	8	5,0	25
QC2-HR	Haut risque (HPV 16)	2	8	5,0	25

1. Les échantillons des contrôles de qualité fournis dans le kit consistent en des cibles d'ADN d'HPV clonés qui ne sont pas dérivées d'HPV de type sauvage. Ces produits sont du même type que ceux utilisés pour les calibrateurs fournis avec le test *digene* HC2 HPV DNA.
2. Ces contrôles de qualité ne seront pas utilisés comme contrôles de qualité appropriés pour le traitement de la solution PreservCyt ou du liquide conservateur SurePath.
3. Les contrôles de qualité fournis avec ce kit de test doivent être utilisés pour le contrôle de qualité interne. Des contrôles de qualité supplémentaires peuvent être testés conformément aux directives ou aux recommandations des réglementations régionales et/ou nationales ou des organismes d'accréditation.

INTERPRETATION DES RESULTATS DES ECHANTILLONS

Remarque : La valeur seuil du test *digene* HC2 HPV DNA de 1 pg/ml est équivalente à 100 000 copies de HPV/ml ou à 5 000 copies de HPV par test.

1. Les échantillons en milieu STM présentant des rapports RLU/valeur seuil $\geq 1,0$ **uniquement avec les sondes HPV à bas risque** sont considérés comme « Positive » (positif) pour 1 ou plusieurs HPV de types 6, 11, 42, 43 ou 44.
2. Les échantillons en milieu STM présentant des rapports RLU/valeur seuil $\geq 1,0$ **uniquement avec les sondes HPV à haut risque** sont considérés « Positive » pour 1 ou plusieurs HPV de types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68.
3. Lorsque le test est effectué sur des échantillons en solution PreservCyt, si le rapport RLU/CO est $\geq 1,0$ et $< 2,5$, QIAGEN recommande de tester de nouveau les échantillons. Si le résultat initial de l'analyse répétée est positif (RLU/CO $\geq 1,0$), les échantillons peuvent être reportés comme étant positifs et il n'est pas nécessaire de procéder à des tests supplémentaires. Mais si le résultat du premier test recommencé est négatif ($< 1,0$), il conviendra de recommencer une seconde fois le test (troisième résultat) pour obtenir un résultat final. Le résultat de la deuxième analyse répétée est considéré comme le résultat final et doit être reporté dans le rapport.
4. Si le rapport RLU/Valeur seuil d'un échantillon est proche mais inférieur à 1,0 et qu'on soupçonne la présence d'une infection à HPV à haut risque, envisager d'utiliser des méthodes de test alternatives et/ou de tester à nouveau l'échantillon.
5. Les échantillons en milieu STM présentant des rapports RLU/valeur seuil $\geq 1,0$ pour les deux jeux de sondes HPV à bas risque et à haut risque sont considérés « Positive » pour 1 ou plusieurs des types de HPV de chacun des groupes de sondes.
6. Les échantillons en milieu STM présentant un rapport RLU/CO $\geq 1,0$ avec le cocktail de sondes combinées sont considérés comme positifs pour 1 ou plusieurs HPV de types 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68.
7. Les échantillons avec des rapports RLU/Valeur seuil $< 1,0$ avec le cocktail de sondes combinées ou avec les deux sondes HPV à bas risque et HPV à haut risque sont considérés comme « Negative » (négatif) ou « No HPV DNA detected » (Aucun ADN d'HPV détecté) pour les 18 types d'HPV testés. Les séquences d'ADN d'HPV sont soit absentes, soit en quantité inférieure au seuil de détection du test.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

RESULTATS CONFIRMANT UNE INDICATION DE HPV A BAS RISQUE ET DE HPV A HAUT RISQUE

Dépistage clinique de patientes avec des résultats de frottis ASC-US pour déterminer si une colposcopie est nécessaire

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 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 utérin⁴⁰. 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 colposcopie et une biopsie. Des échantillons histologiques réalisés sous colposcopie ont été examinés par des pathologistes et un diagnostic initial a été formulé. Chaque échantillon histologique a été également examiné par un pathologiste indépendant et les divergences entre l'examen initial et l'examen indépendant ont été arbitrées par un troisième pathologiste.

L'analyse de l'ADN de HPV a été effectuée sur l'échantillon initial en utilisant exclusivement la sonde HPV à haut risque. L'analyse de l'ADN de HPV a été effectuée avec un test *digene* HC2 HPV DNA prototype, contenant des sondes pour 11 des 13 types de HPV dans le jeu de sondes HPV à haut risque, à l'exception des sondes HPV pour les types 59 et 68. Cette différence ne devrait pas donner des profils de performance considérablement différents pour les deux tests.

Les résultats du test HPV et les diagnostics histologiques des examens cytologiques de 885 patientes avec 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. Comme le test *digene* HC2 HPV DNA présente des caractéristiques de performance similaires en milieu STM et 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, le tableau 3 indique que la valeur prédictive négative du test *digene* HC2 HPV DNA pour la présence d'une HSIL ou de lésions de grade supérieur à la colposcopie est de 99 %.

Tableau 3
Comparaison de résultats obtenus avec le test *digene* HC2 HPV DNA et par histologie classique
Population avec un frottis cytologique ASC-US
Étude Kaiser, Échantillons en solution PreservCyt

	HSIL ou lésions plus sévères lors de la colposcopie			Total
		+	-	
HPV à haut risque	+	66	317	383
	-	5	497	502
	Total	71	814	885

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

Le tableau 4 présente les valeurs prédictives positive et négative théoriques basées sur des prévalences diverses pour un ASC-US initial démontré comme étant des lésions HSIL ou des lésions plus graves établies d'après les résultats obtenus avec les sondes HPV à haut risque.

Tableau 4
Valeurs prédictives positive et négative théoriques
Sonde HPV à haut risque
Résultat de frottis cytologique ASC-US

Prévalence théorique pour HSIL	Résultat de frottis cytologique initial ASC-US	
	Valeur prédictive positive du test	Valeur prédictive négative du test
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

Le tableau 5 illustre la variation entre les divers groupes d'âge compris dans cette étude :

Tableau 5
Données de l'étude Kaiser
Comparaison des performances du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA aux résultats d'histologie classique (HSIL)
Caractéristiques en fonction de l'âge

	Âge < 30	Âge 30–39	Âge > 39
n	287	233	365
Prévalence des lésions (%)	12,2	11,2	2,7
Sensibilité (%)	100,00 (35/35)	88,46 (23/26)	80,00 (8/10)
Intervalle de confiance à 95 %	90,0-100	69,9-97,6	44,4-97,5
Spécificité (%)	31,4 (79/252)	66,2 (137/207)	79,15 (281/355)
Intervalle de confiance à 95 %	25,7-37,5	59,3-72,6	74,6-83,3
Valeur prédictive négative (%)	100 (79/79)	97,86 (137/140)	99,29 (281/283)
Valeur prédictive positive (%)	16,83 (35/208)	24,73 (23/93)	9,76 (8/82)

Sensibilité et spécificité cliniques pour la détermination du risque de lésions de haut grade chez les femmes ayant des frottis LSIL ou HSIL

Une étude clinique multicentrique utilisant le test *digene* HC2 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 effectué dans 3 sites d'investigation n'ayant aucune affiliation avec les cliniques de colposcopie à partir desquelles les échantillons avaient été prélevés. La population de cette étude clinique comprenait des femmes diagnostiquées pour LSIL ou pour HSIL d'après un frottis cytologique récent et 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 système *digene* HC2 DNA Collection Device et ensuite placés dans du milieu STM, ou à l'aide d'un système de brosse

ensuite rincé dans une solution PreservCyt. Les échantillons ont été recueillis au moment de la colposcopie. Les échantillons ont été analysés avec le test *digene* HC2 HPV DNA et les résultats ont été comparés au statut de la pathologie déterminé pour chaque patiente. Le statut de la pathologie repose sur les résultats obtenus par évaluation histologique, mais en cas de résultat histologique négatif ou en l'absence de résultat histologique, le statut de la pathologie a été déterminé par cytologie au moment de l'examen colposcopique (voir le tableau 6). Le test *digene* HC2 HPV DNA a été réalisé dans 3 grands centres médicaux urbains sans affiliation avec sites où ont été prélevés les échantillons lors de la colposcopie. La cytologie a été effectuée dans un laboratoire de pathologie de référence et l'histologie dans un établissement effectuant 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 HPV DNA en milieu STM et PreservCyt, les performances du test sont présentées uniquement pour la solution PreservCyt.

Aucune différence dans les résultats d'analyse des sondes HPV à haut risque n'a été observée entre les échantillons en milieu STM et ceux en solution PreservCyt. Le tableau suivant présente les résultats de la sonde HPV à haut risque dans cette population :

Tableau 6
Algorithme du statut de la pathologie des patientes

Résultat cytologique	Résultat histologique	Statut de la pathologie
NEG	NÉG ou pas effectué*	NEG
LSIL	NEG	LSIL
HSIL	NEG	HSIL
Cancer	NEG	HSIL+
NEG	LSIL	LSIL
LSIL	pas effectué*	LSIL
LSIL	LSIL	LSIL
HSIL	LSIL	LSIL
Cancer	LSIL	LSIL
NEG	HSIL	HSIL
LSIL	HSIL	HSIL
HSIL	HSIL	HSIL
HSIL	pas effectué*	HSIL
Cancer	HSIL	HSIL
NEG	Cancer	HSIL+
LSIL	Cancer	HSIL+
HSIL	Cancer	HSIL+
Cancer	pas 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.

Les tableaux 7 et 8 présentent la performance du test *digene* HC2 HPV DNA déterminée en utilisant 327 échantillons en solution PreservCyt, dont 96 provenaient de femmes présentant un diagnostic de lésions cervicales de haut grade. Les comparaisons ont été effectuées en utilisant toutes les patientes de l'étude qui présentaient des résultats de frottis cervical de référence anormaux. Les comparaisons sont affichées pour les échantillons PreservCyt testés avec la sonde HPV à haut risque.

Tableau 7
Résultats de la sonde HPV à haut risque

Résultat du frottis	Statut pathologique final						Total
	HSIL		LSIL		Négatif		
Résultats HPV à haut risque	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	
LSIL	44	4	78	33	28	37	224
HSIL	45	3	29	14	5	7	103
Total	89	7	107	47	33	44	327
	96		154		77		

Le tableau 8 montre que le test *digene* HC2 HPV DNA utilisé avec la sonde HPV à haut risque affiche environ 93 % de sensibilité globale en matière d'identification de femmes présentant une néoplasie de haut grade et issues d'une population orientée vers une colposcopie sur la base d'un résultat diagnostique de frottis cervical indiquant un état LSIL, HSIL ou équivalent. Le test montre également une valeur prédictive négative atteignant presque 93% dans cette population.

Tableau 8
Caractéristiques de performance
du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA 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

Résultat Sonde HPV à haut risque	Cytologie LSIL ou HSIL → pathologie HSIL			Total
		+	-	
+		89	140	229
-		7	91	98
Total		96	231	327

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

IC à 95 % = 85,6 à 97,0

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

IC à 95 % = 33,1 à 46,0

Prévalence des lésions initialement étiquetées LSIL et finalement diagnostiquées HSIL = 21,4 %

Prévalence des lésions initialement étiquetées HSIL et finalement diagnostiquées HSIL = 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 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 d'HPV peut être présent chez des femmes qui ne progressent pas vers des lésions cervicales de plus haut grade. En fait, lorsque l'on effectue une amplification du HPV par réaction en chaîne par polymérase (PCR, un essai uniquement destiné à la recherche) sur des échantillons présentant des résultats HPV positifs et dont le statut pathologique correspondant est inférieur à une néoplasie de bas grade, on obtient presque 75 % de résultats positifs.

Le tableau 9 présente les valeurs prédictives positive et négative théoriques de la sonde HPV à haut risque pour une LSIL ou une HSIL initiale avérée être une HSIL ou une lésion plus sévère par colposcopie.

Tableau 9
Valeurs prédictives positive et négative théoriques
Sonde HPV à haut risque
Résultats de frottis cytologiques initialement étiquetés LSIL ou HSIL

Prévalence théorique pour une HSIL	Résultat de frottis cytologiques initialement étiquetés LSIL ou HSIL	
	Test positif	Test négatif
	Valeur prédictive	Valeur prédictive
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

RESULTATS CONFIRMANT UNE INDICATION DE DEPISTAGE PRIMAIRE DES HPV A HAUT RISQUE

Performance clinique lors du dépistage de patientes ayant des résultats de frottis normaux dans le but de faciliter l'évaluation du risque lors de la prise en charge des patientes

Les résultats de huit études cliniques indépendantes conduites par de prestigieux établissements médicaux, universitaires et gouvernementaux dans des centres aux États-Unis et dans d'autres parties du monde 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 sauf deux, la classification de Bethesda a été utilisée pour interpréter les résultats des frottis cytologiques. 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 établi l'utilité clinique du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA en comparaison du frottis cervical chez les femmes plus âgées (en général de plus de 30 à 35 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. Comme cela a été indiqué, 2 des 8 études de dépistage ont été conduites aux États-Unis ; 2 en Europe, 2 en Amérique latine, 1 en Afrique et 1 en Asie.

Les performances du test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA observées sur 6 études transversales sont résumées dans les tableaux 10 et 11 pour des femmes âgées de 30 ans et plus et chez lesquelles a été diagnostiqué une néoplasie cervicale de haut grade confirmée par histologie (définie comme une néoplasie intra-épithéliale cervicale (CIN) de grade 3 ou de grade plus sévère).

Tableau 10
Estimation des performances du test *digène* HC2 High-Risk HPV DNA
Sensibilité et spécificité

Population	n		Sensibilité (%)			Spécificité (%)		
			Cytologie seule	HPV seul	HPV + frottis cervical	Cytologie seule	HPV seul	HPV + frottis cervical
Europe de l'Ouest 1	7 592		51,6 (14/27)	96,3 (26/27)	100 (27/27)	98,5 (7 453/7 565)	96,2 (275/7 565)	95,1 (7 193/7 565)
		IC à 95 %	32,0-71,3	81,0-99,9	87,2-100	98,2- 98,8	95,7-96,6	94,6-95,6
Amérique latine 1	6115		58,4 (45/77)	94,8 (73/77)	97,4 (75/77)	98,7 (5 962/6 038)	93,9 (5 669/6 038)	93,4 (5 637/6 038)
		IC à 95 %	46,68-69,6	87,2-98,6	90,9-99,7	98,4-99,0	93,3-94,5	92,7-94,0
Amérique latine 2 [†]	6176		77,9 (53/68)	89,7 (61/68)	94,1 (64/68)	94,1 (5 745/6 108)	94,0 (5742/6 108)	89,9 (5 490/6 108)
		IC à 95 %	66,2-87,1	79,9-95,8	85,6-98,4	93,4-94,6	93,4-94,6	89,1-90,6
Afrique	2925		84,1 (90/107)	89,7 (96/107)	92,5 (99/107)	86,4 (2 436/2 818)	80,0 (2 253/2 818)	76,4 (2 152/2 818)
		IC à 95 %	75,8-90,5	82,4-94,8	85,8-96,7	85,1-87,7	78,4-81,4	74,8-77,9
Asie	1 936		97,6 (41/42)	100 (42/42)	100 (42/42)	76,3 (1 445/1 894)	83,0 (1 572/1 894)	68,0 (1 287/1 894)
		IC à 95 %	87,4-99,9	91,6-100,0	91,6-100,0	74,3-78,2	81,2-85,0	65,8-70,1
États-Unis 1	1040		50,0 (1/2)	100 (2/2)	100 (2/2)	97,6 (1 013/1 038)	96,2 (999/1 038)	95,5 (991/1 038)
		IC à 95 %	1,26-98,7	15,8-100,0	15,8-100,0	96,5-98,4	94,9-97,3	94,0-96,7

[†] Données HC2 selon leur disponibilité, autrement les données HCS sont utilisées ; données combinées.

Tableau 11
Estimation des performances du test *digène* HC2 High-Risk HPV DNA
Valeur prédictive positive et négative

Population	n		Prévalence (%)	Valeur prédictive positive (%)			Valeur prédictive négative (%)		
				Cytologie seule	HPV seul	HPV + frottis cervical	Cytologie seule	HPV seul	HPV + frottis cervical
Europe de l'Ouest 1	7 592		0,36 (27/7592)	11,1 (14/126)	8,23 (26/316)	6,77 (27/399)	99,83 (7 453/7 466)	99,99 (7 275/7 276)	100,0 (7 193/7 193)
		IC à 95 %	0,23-0,52	6,21-17,9	5,45-11,8	4,51-9,69	99,70-99,91	99,92-100,0	99,95-100,0
Amérique latine 1	6115		1,26 (77/6 115)	37,2 (45/121)	16,5 (73/442)	15,8 (75/476)	99,47 (5 962/5 994)	99,93 (5 669/5 673)	99,96 (5 637/5 639)
		IC à 95 %	0,99-1,57	28,6-46,4	13,2-20,3	12,6-19,4	99,25-99,63	99,82-99,98	99,87-100,0
Amérique latine 2 [†]	6176		1,10 (68/6176)	12,7 (53/416)	14,3 (61/427)	9,4 (64/682)	99,74 (5 745/5 760)	99,88 (5 742/5 749)	99,93 (5 490/5 494)
		IC à 95 %	0,86-1,39	9,69-16,3	11,1-18,0	7,30-11,8	99,57-99,85	99,75-99,95	99,81-99,98
Afrique	2925		3,66 (107/2925)	19,1 (90/472)	14,5 (96/661)	12,9 (99/765)	99,31 (2 436/2 453)	99,51 (2 253/2 264)	99,63 (2 152/2 160)
		IC à 95 %	3,01-4,40	15,6-22,9	11,9-17,4	10,6-15,5	98,89-99,60	99,13-99,76	99,27-99,84
Asie	1 936		2,17 (42/1 936)	8,37 (41/490)	11,5 (42/364)	6,47 (42/649)	99,93 (1 445/1 446)	100,0 (1 572/1 572)	100,0 (1 287/1 287)
		IC à 95 %	1,57-2,92	6,07-11,2	8,44-15,3	4,70-8,65	99,62-100,0	99,77-100,0	99,71-100,0
États-Unis 1	1040		0,19 (2/1040)	3,85 (1/26)	4,88 (2/41)	4,08 (2/49)	99,90 (1 013/1 014)	100,0 (999/999)	100,0 (991/991)
		IC à 95 %	0,02-0,69	0,10-19,6	0,60-16,5	0,50-14,0	99,45-100,0	99,63-100,0	99,63-100,0

[†] Données HC2 selon leur disponibilité, 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 *digène* HC2 High-Risk HPV DNA par rapport au frottis cervical seul. Comme pour la sensibilité,

dans tous les cas, la valeur prédictive négative (NPV) du HPV est meilleure que celle du frottis cytologique seul, s'approchant de 100 %. Cette NPV démontre une très forte probabilité d'absence de lésions de haut grade ou de cancer chez les femmes ayant une cytologie normale sans 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 des frottis anormaux, l'âge lors du premier rapport sexuel, le nombre de partenaires sexuels et les maladies sexuellement transmissibles concomitantes.^{27,28}

Bien que la prévalence des lésions de haut grade ne varie pas de manière significative parmi les études pour lesquelles la performance a été déterminée, la prévalence d'une infection à HPV dans l'ensemble de la population peut affecter la performance, et généralement varie suivant la population de patientes. De plus, on a montré que la prévalence d'une infection au HPV diminuait considérablement avec l'âge.^{28, 30-37,}

⁴¹ Les valeurs prédictives positives diminuent lorsque l'on teste des populations présentant une faible prévalence ou des personnes présentant un faible risque d'infection.

Des analyses longitudinales ont été effectuées avec les résultats de deux études ; l'une menée aux États-Unis par le National Cancer Institute (Institut national du cancer, NCI) à Portland, Orégon, l'autre menée en France dans le Laboratoire Pol Bouin du C.H.U. de Reims. Ces analyses longitudinales ont été entreprises pour démontrer que les patientes ayant une cytologie négative et une infection à HPV négative présentent un risque moins élevé d'avoir une pathologie cervicale en comparaison avec les femmes définies traditionnellement à bas risque dont le statut HPV n'est pas connu et en comparaison avec les patientes ayant une cytologie négative et une infection à HPV positive.

Les résultats de ces analyses longitudinales sont présentées dans les tableaux 12 et 13 ci-dessous.

Tableau 12
Résumé des résultats : Études au NCI et en France
Risque relatif de lésions de haut grade

Groupe d'études	Âge	Classification à bas risque	n	Cas de CIN 3+	Taux (par 100 années de patientes)	Risque relatif (IC à 95 %)
NCI	30 et plus	Frottis cytologique normal, HPV Négatif	12 054	28	0,043	0,897 (0,596, 1,348)
		Frottis cytologiques* consécutifs normaux	9 429	19	0,048	1,000
	Toutes	Frottis cytologique normal, HPV Négatif	17 594	48	0,056	0,678 (0,514, 0,894)
		Frottis cytologiques* consécutifs normaux	13 392	44	0,082	1,000
France	30 et plus	Frottis cytologique normal, HPV Négatif	1 690	3	0,084	0,849 (0,307, 2,35)
		Frottis cytologiques* consécutifs normaux	2 026	4	0,099	1,000
	Toutes	Frottis cytologique normal, HPV Négatif	2 180	3	0,066	0,491 (0,221, 1,09)
		Frottis cytologiques* consécutifs normaux	2 650	7	0,136	1,000

*Trois frottis cytologiques annuels normaux sur environ 2 ans

Tableau 13
Résumé des résultats : Études au NCI et en France
Taux de pathologie stratifiés par statut HPV de base

Groupe d'études	Âge	Statut de base	n	Cas de CIN 3+	Taux (par 100 années de patientes)	Risque relatif (IC à 95 %)
NCI	30 et plus	Frottis cytologique normal, HPV positif	1 078	24	0,451	10,50 (6,13, 18,0)
		Frottis cytologique normal, HPV négatif	12 054	28	0,043	1,00
	Toutes	Frottis cytologique normal, HPV positif	2 561	63	0,096	10,64 (7,33 – 15,5)
		Frottis cytologique normal, HPV négatif	17 594	48	0,056	1,00
France	30 et plus	Frottis cytologique normal, HPV positif	419	14	2,346	27,3 (8,41, 88,3)
		Frottis cytologique normal, HPV négatif	1696	3	0,084	1,00
	Toutes	Frottis cytologique normal, HPV positif	619	22	2,520	37,0 (11,8, 116)
		Frottis cytologique normal, HPV négatif	2180	3	0,066	1,00

L'utilité clinique des résultats du test HPV est démontrée encore davantage du fait du risque accru de pathologie cervicale chez les femmes ayant un résultat HPV positif en comparaison aux femmes ayant un résultat HPV négatif.

SENSIBILITE ANALYTIQUE

Un panel non clinique d'ADN plasmidique de HPV cloné a été testé pour déterminer si chacun des 18 types de HPV pouvait être détecté par le test *digene* HC2 HPV DNA et pour déterminer la sensibilité analytique de l'essai pour chaque type de HPV. Chaque concentration cible d'HPV (100 pg/ml, 10 pg/ml, 2,5 pg/ml, 1 pg/ml, 0,5 pg/ml et 0,2 pg/ml) de chacun des 18 types d'ADN d'HPV (6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68) a été testée en triple avec une sonde HPV à bas risque ou une sonde HPV à haut risque, suivant le cas. La signal moyen, exprimé en RLU, de chaque concentration des divers types de HPV a été calculée et comparée au calibrateur positif pour la partie de test appropriée.

La limite détectable de chaque type d'HPV en STM est présentée dans le tableau 14. Les limites détectables variaient de 0,62 pg/ml à 1,39 pg/ml selon le type d'HPV testé. Tous les types d'HPV étaient détectables à un taux estimé de 1,09 pg de la cible ADN d'HPV par ml d'échantillon en STM. La limite détectable moyenne de l'ensemble des 18 types d'ADN d'HPV était de 1,09 pg/ml avec un écart-type de 0,05.

Tableau 14
Résumé des limites de détection de sensibilité du test *digene* HC2 HPV DNA
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	Intervalle de confiance de 95 %
6	1,33	0,03	1,22-1,46
11	1,13	0,05	1,00-1,29
16	1,09	0,06	0,94-1,29
18	1,05	0,05	0,88-1,29
31	1,01	0,05	0,91-1,15
33	1,35	0,02	1,26-1,45
35	1,11	0,05	0,95-1,31
39	1,39	0,09	1,16-1,71
42	1,20	0,05	1,02-1,44
43	0,85	0,03	0,86-1,07
44	1,17	0,04	1,02-1,36
45	1,14	0,04	0,99-1,35
51	0,78	0,10	0,70-0,88
52	1,37	0,06	1,21-1,58
56	0,62	0,04	0,58-0,67
58	0,82	0,04	0,73-0,94
59	1,10	0,06	1,00-1,21
68	1,19	0,04	1,03-1,39
Moyenne (tous les types)	1,09	0,05	0,97-1,27

PERFORMANCE DU COCKTAIL DE SONDÉS COMBINÉES (CPC)

Le même panel non clinique d'ADN plasmidique de HPV que celui décrit ci-dessus a été testé pour déterminer la sensibilité analytique de chacun des 18 types de HPV avec le test *digene* HC2 HPV DNA selon le protocole du cocktail de sondes combinées (CPC) décrit dans la présente notice. La sensibilité analytique du protocole CPC variait de 0,58 pg/ml à 1,39 pg/ml et tous les types d'HPV étaient détectables à un taux estimé à 0,95 pg/ml de la cible ADN d'HPV par ml d'échantillon. La limite détectable moyenne pour les 18 types d'HPV était de 0,95 pg/ml avec un écart-type de 0,07. Cette sensibilité est équivalente à la sensibilité analytique déterminée pour la méthode à double sondes du test *digene* HC2 HPV DNA.

ÉQUIVALENCE ENTRE LES ÉCHANTILLONS EN MILIEU STM ET PRESERVCYT

L'équivalence entre les échantillons en milieu STM et PreservCyt a été examinée pour une quantité identique d'ADN de HPV de type 18 extrait à partir d'environ 10^6 cellules HeLa positives contenant le génome du HPV 18 sous forme intégrée, inoculées 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/dénaturation, comme indiqué dans la présente notice d'instructions, et a été analysé avec le test *digene* HC2 HPV DNA en utilisant la sonde HPV à haut risque. 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 procédure de préparation en solution PreservCyt n'affecte pas la sensibilité analytique du test *digene* HC2 HPV DNA.

CORRELATION DES RESULTATS D'ÉCHANTILLONS EN MILIEU SUREPATH ET EN MILIEU STM AU SEIN D'UNE POPULATION CLINIQUE

Une évaluation clinique en deux phases a été menée à l'aide de 6 centres de prélèvement et de 3 sites d'analyses aux États-Unis. Les patientes présentes dans une clinique traitant les MST, une clinique

obstétrique/gynécologique, une clinique colposcopique, un hôpital ou un centre de planning familial répondaient aux conditions requises pour participer à cette évaluation selon des critères d'inclusion et d'exclusion prédéterminés. La phase de faisabilité, censée déterminer une valeur de seuil appropriée 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 validation clinique, dans laquelle environ 1 500 patientes ont été recrutées pour valider la valeur de seuil choisie, a commencé après une analyse intermédiaire de la phase de faisabilité qui a révélé qu'une valeur de seuil de 1,0 RLU/CO avec des échantillons en solution SurePath présentait une concordance acceptable avec les résultats d'échantillons en milieu STM.

Dans les deux phases de l'évaluation, les échantillons cervicaux en solution SurePath et en STM appariés ont été obtenus auprès de 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, l'échantillon en solution SurePath restant et l'échantillon en milieu STM correspondant étaient analysés avec le test *digene* HC2 High-Risk HPV DNA en utilisant une valeur de seuil de 1,0 RLU/CO.

Le tableau 15 présente la corrélation des résultats en solution SurePath avec l'échantillon en STM apparié observée dans les résultats finaux satisfaisant les conditions requises pour une analyse de données obtenue à partir de la population totale participante.

Tableau 15
Concordance des résultats d'échantillons en milieu SurePath et STM
(tous âges et toutes classifications cytologiques)
(n = 1490)

% de concordance positive IC à 95 % (n/N)		% de concordance négative IC à 95 % (n/N)	
Tous positifs	Sous-ensemble fortement positif (RLU/CO ≥ 2,5)	Tous négatifs	Sous-ensemble faiblement négatif RLU/CO (< 0,80)
93,5 90,7, 95,6 (401/429)	96,4 94,1, 98,0 (378/392)	95,3 93,8, 96,5 (1 011/1 061)	96,0 94,6, 97,1 (1 002/1 044)

Ces résultats prédisent que les sensibilité et spécificité d'essai relatives de l'analyse des échantillons en solution 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'intervalle de confiance à 95 % pour les deux concordances positive et négative.

REPRODUCTIBILITE

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 HPV DNA en utilisant un panel de cibles d'ADN de HPV et des échantillons cliniques 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 HPV DNA sur 3 jours différents et avec le même panel de reproductibilité. Le panel de reproductibilité comprenait les échantillons suivants : 12 pools d'échantillons cliniques en STM dénaturés ; 3 pools d'échantillons cliniques non dénaturés en solution PreservCyt ; le calibrateur négatif ; et les calibrateurs positifs HPV à bas risque et HPV à haut risque à des 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 triple avec les deux méthodes de sonde HPV à haut risque et de CPC. Les résultats sont présentés dans le tableau 16.

Tableau 16
Résumé des données statistiques totales
pour la reproductibilité multicentrique du test *digene* HC2 HPV DNA

Mesure statistique	SONDE HPV A HAUT RISQUE	Cocktail de sondes combinées (CPC)	Résultats combinés pour la sonde HPV à haut risque et la méthode CPC^a
Proportion de positifs attendus avec un résultat positif observé	100% (99,0-100,0)	99,8% (98,92-100,0)	99,9% (99,38-100,0)
Proportion de négatifs attendus avec un résultat négatif observé	99,0% (97,49-99,73)	98,9% (96,79-99,77)	99,0% (97,88-99,58)
Concordance	99,5% (98,70-99,86)	99,5% (98,70-99,86)	99,5% (99,0-99,78)
Kappa	0,990	0,989	0,990

^a Les chiffres entre parenthèses indiquent les intervalles de confiance à 95 %. L'ensemble des données est une combinaison de toutes les séries effectuées sur tous les sites.

Les résultats indiquent que la reproductibilité du test *digene* HC2 HPV DNA sur des échantillons cliniques en milieu STM est très bonne.

REACTIONS CROISEES

PANEL DE REACTIONS CROISEES

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 les sondes HPV utilisées dans le test *digene* HC2 HPV DNA. Tous les micro-organismes ont été testés à des concentrations comprises entre 1×10^5 et 1×10^7 organismes par ml. Les ADN purifiés des virus et des plasmides ont été testés à une concentration de 4 ng/ml.

Une liste des bactéries testées est fournie ci-dessous. Toutes les bactéries testées ont donné des résultats négatifs avec le test *digene* HC2 HPV DNA.

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

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

Ci-dessous, la liste de l'ADN viral, de l'ADN plasmidique ou du sérum humain testés :

Adénovirus 2	Papillomavirus humain de type 1
Cytomégalovirus	Papillomavirus humain de type 2
Epstein-Barr Virus	Papillomavirus humain de type 3
Sérum positif pour l'antigène de surface de l'hépatite B	Papillomavirus humain de type 4
Herpes Simplex I	Papillomavirus humain de type 5
Herpes Simplex II	Papillomavirus humain de type 8
Virus de l'immunodéficience humaine (HIV, ADN de RT)	Papillomavirus humain de type 13
Virus simien de type 40 (SV40)	Papillomavirus humain de type 30
	pBR322

Les seuls virus ou plasmides présentant une réactivité croisée dans le test *digene* HC2 HPV DNA sont le HPV de type 13 est le plasmide pBR322. L'ADN du HPV 13 a réagi uniquement avec la sonde HPV à bas risque. Le HPV de type 13 est couramment détecté dans les lésions aux lèvres de certains groupes ethniques, mais n'a pas été détecté dans le tractus ano-génital.²⁹ En conséquence, la réactivité croisée entre le HPV 13 et la sonde HPV à bas risque du test *digene* HC2 HPV DNA n'est pas supposée générer un résultat erroné au plan clinique pour les échantillons ano-génitaux. Cette réactivité croisée entre le plasmide pBR322 et les sondes HPV à bas risque et à haut risque du test *digene* HC2 HPV DNA 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 plasmide bactérien. Toutefois, 298 échantillons cliniques analysés positifs avec les sondes HPV à bas risque et à haut risque du test *digene* HC2 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 HPV DNA soit dû à des séquences de plasmide pBR322 homologues dans les échantillons cliniques.

HYBRIDATION CROISEE

Chacun des 18 types d'HPV a été testé avec les deux sondes HPV à bas risque et HPV à haut risque à une concentration de 4 ng/ml d'ADN d'HPV. Toutes les cibles HPV devaient être positives avec le groupe de sondes appropriées alors qu'aucun des échantillons ne devait être positif avec le groupe opposé de sondes. Cette étude a montré qu'il y avait une légère hybridation croisée entre les HPV de types 6 et 42 (types de HPV à bas risque) et le groupe de sondes HPV à haut risque (sonde HPV à haut risque). Certains échantillons contenant un taux élevé (4 ng/ml ou plus) d'ADN d'HPV 6 ou d'HPV 42 peuvent être positifs pour les deux groupes de sondes. La signification clinique qui en découle est que les patientes avec 4 ng/ml ou plus d'ADN d'HPV 6 ou d'HPV 42 peuvent être orientées vers un examen colposcopique.

Une réactivité croisée entre la sonde HPV à haut risque 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 grade³⁸. Les patientes dont les échantillons contiennent des niveaux élevés de ces types d'ADN de HPV peuvent être orientées à tort vers un examen colposcopique. 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 MM9.³⁹ Bien que plusieurs de ces types de HPV soient rares ou d'un genre nouveau rarement associés 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.

IMPACT DU SANG ET D'AUTRES SUBSTANCES SUR LES ECHANTILLONS EN STM

L'effet du sang et d'autres substances définies ou indéfinies pouvant interférer a été évalué dans le test *digene* HC2 HPV DNA. Du sang total, des produits de douche intime, une crème anti-fongique 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) en 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. Cependant, un résultat faussement négatif peut être reporté dans les échantillons cliniques avec un taux d'ADN d'HPV proche de celui de la valeur seuil positive du test (1 pg/ml) si une quantité importante de crème anti-mycose ou de gel contraceptif est présente. Il demeure cependant très improbable qu'un échantillon clinique soit composé presque entièrement d'une de ces substances puisque, préalablement au recueil d'échantillon en vue d'un frottis cytologique ou d'un test HPV, le col de l'utérus est habituellement nettoyé.

IMPACT DU SANG ET D'AUTRES SUBSTANCES SUR LES ECHANTILLONS EN SOLUTION PRESERV CYT

L'effet du sang et d'autres substances définies ou indéfinies pouvant interférer et éventuellement présentes dans des échantillons cliniques en solution PreservCyt a été évalué dans le test *digene* HC2 HPV DNA. Du sang total, des produits de douche intime, une crème anti-fongique 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 en 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 HPV DNA.

REPRODUCTIBILITE DU TEST *digene* HC2 HPV DNA AVEC DES ECHANTILLONS CLINIQUES PRELEVES EN MILIEU STM

La reproductibilité du test *digene* HC2 HPV DNA sur des échantillons cliniques prélevés en milieu STM a été déterminée dans le cadre d'une étude regroupant 20 lots cliniques (10 éléments positifs et 10

éléments négatifs) préparés en combinant des échantillons prélevés à la brosse cervicale dans du milieu STM préalablement dénaturés et 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. Le test a été effectué en utilisant la méthode du cocktail de sondes combinées. Les moyennes, l'écart type et les intervalles de confiance à 95 % sur la moyenne (IC) ont été calculés pour chaque échantillon pour chaque jour et sur l'ensemble des 5 jours et sont présentés dans le tableau 17.

Tableau 17
RLU/CO moyen avec intervalles de confiance et pourcentage de positifs
(Ordre décroissant par RLU/CO moyen)

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

Pour les 5 échantillons avec un rapport RLU/CO moyen à 20 % ou plus au-dessus de la valeur seuil (Nos 1 à 5), 100 réplicats sur 100 (100,0 %) étaient positifs. Pour les 5 échantillons présentant un rapport RLU/CO moyen dans la plage des 20 % supérieurs ou inférieurs au seuil du test (n° 6-10), 60 réplicats sur 100 (60 %) 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 seuil du test, 200 réplicats sur 200 (100 %) se sont révélés négatifs.

Par conséquent, les échantillons avec un rapport RLU/CO moyen de 20 % ou plus au-dessus de la valeur seuil étaient positifs dans 100 % des cas, alors que les échantillons avec un rapport RLU/CO moyen de 20 % ou plus en-dessous de la valeur seuil étaient négatifs dans 100 % des cas, cela indiquant que les échantillons éloignés de la valeur seuil de 20 % ou plus devraient donner des résultats cohérents. Les échantillons dont les résultats sont proches de la valeur de seuil donnent des résultats positifs et négatifs en nombres à peu près égaux. Ces données démontrent que les échantillons en milieu STM fournissent des résultats reproductibles avec le test *digene* HC2 HPV DNA.

REPRODUCTIBILITE DU TEST *digene* HC2 HPV DNA AVEC DES ECHANTILLONS CLINIQUES PRELEVES EN SOLUTION PRESERVCYT

La reproductibilité du test *digene* HC2 HPV DNA sur des échantillons cliniques prélevés en solution PreservCyt a été déterminée dans le cadre d'une étude regroupant 24 échantillons de simulation à une concentration dans la plage des 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 étaient testés par réplicat de 4 chaque jour pendant 5 jours pour un total de 20 réplicats par échantillon. Chaque jour de la période d'étude de 5 jours, une fraction aliquote de 8 ml de chaque échantillon est préparée et traitée selon la notice d'instructions du kit *digene* HC2 Sample Conversion en utilisant uniquement la sonde HPV à haut risque. Les moyennes, les écarts types, et les intervalles de confiance à 95 % (IC) ont été calculés pour chaque échantillon chaque jour séparément et pour l'ensemble des 5 jours et des réplicats. Le rapport RLU/CO moyen, l'intervalle de confiance de la moyenne et le pourcentage de réplicats positifs sont présentés dans le tableau 18 pour chaque échantillon, par ordre décroissant établi sur le rapport RLU/CO moyen.

Tableau 18
RLU/CO moyen avec intervalles de confiance et pourcentage de positifs
(Ordre décroissant par RLU/CO moyen)

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

Pour les 6 échantillons avec un rapport RLU/CO moyen à 20 % ou plus au-dessus de la valeur seuil (Nos. 1 à 6), 114 réplicats sur 120 (95,0 %) étaient positifs. Pour les 7 échantillons avec un rapport RLU/CO moyen dans les 20 % au-dessus ou en dessous de la valeur seuil du test (Nos. 7 à 13), 88 réplicats sur 139 (63,3 %) étaient positifs et 51 sur 139 (36,7 %) étaient négatifs. Pour les 4 échantillons dans les 10 % au-dessus ou en dessous de la valeur seuil (Nos. 10 à 13), 41 réplicats sur 79 (51,9 %) étaient positifs et 38 (48,1 %) étaient négatifs. Pour les 11 échantillons avec un rapport RLU/CO moyen à plus de 20 % en dessous de la valeur seuil du test, 220 réplicats sur 220 (100 %) étaient négatifs.

Ainsi, les échantillons avec un rapport RLU/CO moyen de 20 % ou plus au-dessus de la valeur seuil étaient positifs dans plus de 95 % des cas, alors que les échantillons avec un rapport RLU/CO moyen de 20 % ou plus en dessous de la valeur seuil étaient négatifs dans 100 % des cas, cela indiquant que les échantillons éloignés de 20 % ou plus de la valeur seuil devraient donner des résultats cohérents. Les échantillons dont les résultats sont proches de la valeur de seuil donnent des résultats positifs et négatifs

en nombres à peu près égaux. Ces données démontrent que les échantillons en solution PreservCyt fournissent des résultats reproductibles avec le test *digene* HC2 HPV DNA.

REPRODUCTIBILITE DU TEST *digene* HC2 HIGH-RISK HPV DNA AVEC DES ECHANTILLONS PRELEVES EN MILIEU CONSERVATEUR SUREPATH

Des évaluations de la reproductibilité ont été réalisées afin de caractériser la capacité de 3 laboratoires distincts d'obtenir un résultat diagnostique similaire sur des jours différents et sur différents cycles à partir d'un ensemble identique d'échantillons d'état HPV positif/négatif connu si on utilise une valeur seuil de rapport RLU/CO égal à 1,0. Le panel des échantillons pour la reproductibilité était composé de 5 échantillons HPV positifs, 2 échantillons ayant des concentrations en ADN d'HPV proches de la valeur seuil du test et 5 échantillons HPV négatifs.

Les éléments du panel ont été préparés en combinant des échantillons de patients en solution SurePath uniques ayant un état HPV négatif ou positif connu afin d'obtenir les valeurs de RLU/CO cibles souhaitées. Chaque élément du panel a été testé en double, deux fois par jour sur une période de cinq jours à chacun des trois laboratoires participants.

Tableau 19
Étude de la reproductibilité des échantillons en solution SurePath
Résultats qualitatifs par élément du panel

Élément du panel	Moyenne RLU/CO	Résultat attendu	Positif au HPV n (%)	Négatif au HPV n (%)
1	0,20	négatif	0 (0)	60 (100)
2	0,21	négatif	0 (0)	60 (100)
3	0,22	négatif	0 (0)	60 (100)
4	0,28	négatif	2 (3,3)	58 (96,7)
5	0,36	négatif	2 (3,3)	58 (96,7)
6	0,83	négatif	13 (21,7)	47 (78,3)
7	1,17	positif	26 (43,3)	34 (56,7)
8	19,47	positif	60 (100)	0 (0)
9	25,65	positif	60 (100)	0 (0)
10	81,52	positif	60 (100)	0 (0)
11	154,18	positif	60 (100)	0 (0)
12	765,29	positif	60 (100)	0 (0)

REPRODUCTIBILITÉ DES RÉSULTATS EN MILIEU SUREPATH EN TRAITANT LES TESTS AVEC LE RAPID CAPTURE SYSTEM

La reproductibilité des résultats des échantillons en solution SurePath lors de l'utilisation du Rapid Capture System pour le traitement des tests a été comparée aux résultats obtenus lors de l'utilisation d'un traitement manuel des tests. Deux tests comparatifs ont été réalisés sur des aliquots distincts provenant du même échantillon traité.

Tableau 20
Concordance des résultats intra-échantillons SurePath avec le RCS
(RCS/Procédure manuelle)

% de concordance positive IC à 95 % (n/N)		% de concordance négative IC à 95 % (n/N)	
Tous positifs	Sous-ensemble fortement positif (RLU/CO \geq 2,5)	Tous négatifs	Sous-ensemble faiblement négatif RLU/CO ($<$ 0,80)
99,0 417/421 97,6, 99,7	100 375/375 99,0, 100	97,7 1057/1079 96,9, 98,7	98,7 1050/1064 97,8, 99,28

LIMITES DE LA TECHNIQUE

Pour utilisation en diagnostic in vitro

Se référer au manuel d'utilisation du *Rapid Capture System (Rapid Capture System User Manual)* pour les limites supplémentaires de la procédure spécifiques à l'utilisation de ce système d'analyse d'échantillons à haut débit.

- Le test *digene* HC2 HPV DNA pour les papillomavirus de types 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 et 68 n'est pas recommandé pour évaluer les cas de présomption d'abus sexuel.
- La prévalence de l'infection à HPV dans une population peut affecter la performance. 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 négatif n'exclut pas la possibilité d'une infection à HPV car une infection très faible ou une erreur d'échantillonnage peuvent causer un résultat faussement négatif.
- Le test *digene* HC2 HPV DNA permet de discriminer 2 groupes de types de HPV : HPV 6/11/42/43/44 et HPV 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68. Il ne pourra pas différencier les types viraux à l'intérieur de ces groupes.
- Le test *digene* HC2 HPV DNA ne peut être utilisé que sur des échantillons cervicaux prélevés avec le système *digene* HC2 DNA Collection Device, ou sur des biopsies prélevées en milieu STM, ou sur des échantillons cervicaux prélevés en utilisant un système de type balai ou une combinaison brosse/spatule et placés en solution PreservCyt, ou sur des échantillons cervicaux prélevés en milieu conservateur SurePath. Les biopsies ne peuvent être testées que si elles ont été immédiatement placées dans un milieu STM et conservées à -20 °C jusqu'au moment de l'analyse.
- Le système de prélèvement *digene* HC2 DNA Collection Device ne doit pas être utilisé pour prélever des échantillons sur la femme enceinte.
- Une infection à HPV en elle-même n'indique pas automatiquement la présence de lésions cervicales de haut grade et ne signifie pas non plus de manière certaine que des lésions de haut grade ou un cancer se développeront.
- Une faible hybridation croisée existe entre les HPV de types 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 et MM9 et la sonde HPV à haut risque. Les patientes dont les échantillons contiennent un taux important de ces types d'HPV peuvent être orientées à tort vers un examen colposcopique³⁸.
- Le but du test *digene* HC2 HPV DNA est de détecter des types de HPV à bas risque et à haut risque, notamment les types 39, 58, 59 et 68. Des études analytiques conduites par QIAGEN, utilisant de l'ADN plasmidique d'HPV cloné, démontrent que ce test décèle ces types d'HPV à des taux s'étendant 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 HPV DNA. QIAGEN a pu valider la détection de ces types de HPV uniquement sur un nombre limité d'échantillons cliniques. Du fait de la faible prévalence de ces types d'HPV dans l'ensemble de la population (comme il l'a été démontré par Bosch et. Al³⁶.), les caractéristiques de performance du test *digene* HC2 HPV DNA dans la détection des HPV de types 39, 58, 59 et 68 n'ont pas été confirmées au plan statistique.
- Si des concentrations élevées de crème contre les mycoses, de gel contraceptif ou de douche vaginale sont présentes lors du prélèvement d'échantillon pour le test HPV, il existe une probabilité d'obtenir un résultat faussement négatif lorsque ces échantillons contiennent des taux d'ADN d'HPV donnant des valeurs RLU/CO proches de la valeur seuil du test.
- Une réactivité croisée est possible entre la sonde du test *digene* HC2 HPV DNA 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.

REFERENCES

1. Broker, T. R.; Botchan, M. Papillomaviruses: retrospectives ADN prospectives. Dans : *DNA Tumor Viruses*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1986 : 17-36. D'après la conférence 1985 Cancer Cells Conference à Cold Spring Harbor.
2. Lorincz, A. T.; Reid, R. Association of human papillomavirus with gynecologic cancer. *Current Opinion in Oncology* 1:123-132; 1989.
3. Jenson, A. B.; Kurman, R. J.; Lancaster, W. D. Human papillomaviruses. Dans : Belshe, R. B. *Textbook of Human Virology*. Littleton, MA: PSG-Wright; 1984: 951-968.
4. Becker, T. M.; Stone, K. M.; AlexADNer, E. R. Genital human papillomavirus infection: a growing concern. *Obstet Gynecol Clin North Am* 14(2):389-396; 1987.
5. McCance, D. J.; Walker, P. G.; Dyson, J. L.; Coleman, D. V.; Singer, A. Presence of human papillomavirus DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia. *Br Med J* 287:784-788; 1983.
6. Naghashfar, Z.; Sawada, E.; Kutcher, M. J.; Swancar, J.; Gupta, J.; Daniel, R.; Kashima, H.; Woodruff, J. D.; Shah, K. Identification of genital tract papillomaviruses HPV-6 and HPV-16 in warts of the oral cavity. *J Med Virol* 17:313-324; 1985.
7. Gissmann, L.; Wolnik, L.; Ikenberg, H.; Koldovsky, U.; Schnurch, H. G.; zur Hausen, H. Human papillomavirus types 6 ADN 11 DNA sequences in genital ADN laryngeal papillomas ADN in some cervical cancers. *PNAS USA* 80:560-563; 1983.
8. Munoz, N.; Bosch, F. X.; Shah, K. V.; Meheus, A., Eds. *The Epidemiology of Cervical Cancer ADN Human Papillomavirus*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 1992. IARC Scientific Publication No. 119.
9. Reid, R.; Greenberg, M.; Jenson, A. B.; Husain, M.; Willett, J.; Daoud, Y.; Temple, G.; Stanhope, C. R.; Sherman, A. I.; Phibbs, G. D.; Lorincz, A. T. Sexually transmitted papillomaviral infections. I. The anatomic distribution and pathologic grade of neoplastic lesions associated with different viral types. *Am J Obstet Gynecol* 156(1):212-222; 1987.
10. Fuchs, P. G.; Girardi, F.; Pfister, H. Human papillomavirus DNA in normal, metaplastic, preneoplastic ADN neoplastic epithelia of the cervix uteri. *Int J Cancer* 41:41-45; 1988.
11. Lorincz, A. T.; Temple, G. F.; Kurman, R. J.; Jenson, A. B.; Lancaster, W. D. Oncogenic association of specific human papillomavirus types with cervical neoplasia. *JNCI* 79(4):671-677; 1987.
12. Lorincz, A. T.; Lancaster, W. D.; Temple, G. F. Cloning ADN characterization of the DNA of a new human papillomavirus from a woman with dysplasia of the uterine cervix. *J Virol* 58(1):225-229; 1986.
13. Beaudenon, S.; Kremsdorf, D.; Croissant, O.; Jablonska, S.; Wain-Hobson, S.; Orth, G. A novel type of human papillomavirus associated with genital neoplasias. *Nature* 321:246-249; 1986.
14. Lorincz, A. T.; Quinn, A. P.; Lancaster, W. D.; Temple, G. F. A new type of papillomavirus associated with cancer of the uterine cervix. *Virology* 159:187-190; 1987.
15. Naghashfar, Z. S.; Rosenshein, N. B.; Lorincz, A. T.; Buscema, J.; Shah, K. V. Characterization of human papillomavirus type 45, a new type 18-related virus of the genital tract. *J gen Virol* 68:3073-3079; 1987.
16. Nuovo, G. J.; Crum, C. P.; de Villiers, E. M.; Levine, R. U.; Silverstein, S. J. Isolation of a novel human papillomavirus (type 51) from a cervical condyloma. *J Virol* 62(4):1452-1455; 1988.
17. Shimoda, K.; Lorincz, A. T.; Temple, G. F.; Lancaster, W. D. Human papillomavirus type 52: a new virus associated with cervical neoplasia. *J gen Virol* 69:2925-2928; 1988.
18. Lorincz, A. T.; Quinn, A. P.; Goldsborough, M. D.; McAllister, P.; Temple, G. F. Human papillomavirus type 56: a new virus detected in cervical cancers. *J gen Virol* 70:3099-3104; 1989.

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

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

RÉSOLUTION DES PRINCIPAUX PROBLÈMES RENCONTRÉS

Observation	Causes probables	Solution
<p>Aucun changement de coloration ou changement de coloration incorrect pendant la dénaturation.</p>	<p>Préparation incorrecte du réactif de dénaturation ou</p> <p>Le réactif de dénaturation n'a pas été ajouté</p> <p>Les échantillons contiennent du sang ou d'autres substances qui masquent le changement de coloration.</p> <p>Le pH des échantillons est peut-être anormalement acide.</p>	<p>Vérifier que le réactif de dénaturation contient l'indicateur coloré et présente une couleur violet foncé.</p> <p>S'assurer que le réactif de dénaturation a été ajouté à l'échantillon en mesurant le volume de l'échantillon (1,5 ml attendu). Si le volume indique que le réactif de dénaturation n'a pas été ajouté, ajouter le volume approprié, mélanger et procéder au test si le changement de coloration est alors observé.</p> <p>Le changement de coloration exact décrit n'est pas attendu avec ces types d'échantillons ; les résultats du test <i>digene</i> HC2 HPV DNA ne devraient pas être affectés de manière défavorable.</p> <p>Si aucune des autres causes ne s'applique, il est possible que les échantillons soient anormalement acides et le changement de coloration attendu ne se produira pas. Prélever un nouvel échantillon avant d'appliquer l'acide acétique sur le col de l'utérus car un pH incorrect de l'échantillon affectera les résultats du test de manière défavorable.</p>
<p>Les résultats des contrôles de qualité sont incorrects</p>	<p>Protocole du logiciel choisi pour le test incorrect (c-à-d. protocole CPC utilisé pour la méthode à double sondes)</p> <p>Inverser le positionnement de QC1-LR et QC2-HR</p> <p>Inverser le positionnement du LRC et du QC1-LR et/ou du HRC et du QC1-HR.</p>	<p>Si le protocole du logiciel est incorrect pour le test choisi, la microplaque doit être lue de nouveau, dans les 30 minutes après l'ajout du réactif de détection 2, avec le protocole correct.</p> <p>Tester à nouveau les échantillons.</p> <p>Tester à nouveau les échantillons.</p>
<p>Changement de coloration incorrect constaté pendant l'hybridation.</p>	<p>Mauvaise homogénéisation du mélange de sondes avec les calibrateurs, les contrôles et/ou les échantillons dénaturés ; ou le mélange de sondes n'a pas été ajouté ; ou volume de réactif ajouté incorrect.</p> <p>Les échantillons contiennent du sang ou d'autres substances qui masquent le changement de coloration.</p> <p>L'échantillon contient moins de 1 000 µl de STM.</p>	<p>Agiter la microplaque d'hybridation ou le portoir pour microtube pendant 2 minutes supplémentaires. Si certains puits restent violets, ajouter 25 µl de mélange de sondes approprié et bien mélanger. Si après avoir ajouté la sonde et avoir mélangé, le changement de coloration correct ne se produit pas et l'échantillon ne contient pas de sang ou d'autres substances, tester de nouveau l'échantillon.</p> <p>Le changement de coloration exact décrit n'est pas attendu avec ces types d'échantillons ; les résultats du test <i>digene</i> HC2 HPV DNA ne devraient pas être affectés de manière défavorable.</p> <p>Vérifier le volume de l'échantillon d'origine. Le volume doit être de 1 350 µl ± 20 µl (après avoir retiré 75 µl pour les sondes HPV à bas risque et à haut risque). Si le volume est inférieur à 1 350 µl, l'échantillon d'origine contenait moins de 1 000 µl de STM. Se procurer un nouvel échantillon.</p>

Observation	Causes probables	Solution
<p>Le test ne remplit pas les critères de validation. Aucun signal observé dans le calibrateur, les contrôles de qualité ou les échantillons.</p>	<p>La sonde n'a pas été ajoutée au diluant de sonde.</p> <p>La sonde a été contaminée par de la RNase au cours de la préparation.</p> <p>Mélange inadéquat de la sonde et du diluant de sonde.</p> <p>Mélange inadéquat de la sonde diluée et de l'échantillon dénaturé.</p> <p>Durée ou température incorrectes au cours de l'étape d'hybridation.</p> <p>Mélange inadéquat au cours de l'étape de capture.</p> <p>Inversion des sondes / mélanges de sondes / tubes d'hybridation.</p> <p>Ajout d'un volume incorrect de réactif de détection 1 ou temps d'incubation incorrect.</p> <p>Ajout d'un volume incorrect de réactif de détection 2 ou temps d'incubation incorrect.</p> <p>Mauvais fonctionnement du luminomètre ou programmation incorrecte.</p>	<p>Préparer les mélanges de sondes de la manière décrite dans la présente notice d'instructions. Étiqueter les tubes soigneusement.</p> <p>Utiliser des embouts pour pipette avec filtre aérosol lors du pipetage de la sonde et porter des gants. Utiliser uniquement des réservoirs pour réactifs jetables, neufs et propres.</p> <p>Après avoir ajouté la sonde au diluant de sonde, mélanger vigoureusement au vortex à vitesse maximale pendant au moins 5 secondes. Un tourbillon visible doit se former.</p> <p>Après avoir ajouté le mélange de sondes et l'échantillon dans chaque puits de microplaque ou microtube d'hybridation, mélanger à l'aide du Rotary Shaker I réglé à $1\ 100 \pm 100$ tours/min. pendant 3 ± 2 minutes. Vérifier que la coloration vire du violet au jaune dans chaque tube/puits de la microplaque.</p> <p>Hybrider 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 calibrés périodiquement.</p> <p>Agiter au Rotary Shaker I pendant 60 ± 5 minutes à une température de 20-25 °C comme décrit dans la présente notice d'instructions. Vérifiez la vitesse du Rotary Shaker I par calibration comme indiqué dans la section Shaker Speed Calibration (Calibration de la vitesse de l'agitateur) du manuel d'utilisation du <i>Rotary Shaker I (Rotary Shaker I User Manual)</i>.</p> <p>Préparer soigneusement les mélanges de sondes et étiqueter correctement les tubes de mélange de sondes. Prendre soin d'ajouter la bonne sonde à la bonne série de tubes d'hybridation. Étiqueter les tubes de mélange de sondes, les tubes d'hybridation et/ou les portoirs de façon à éviter d'éventuelles permutations.</p> <p>Transférer 75 µl de réactif de détection 1 dans chaque puits en utilisant une pipette à 8 canaux. Incuber à 20-25 °C pendant 30 à 45 minutes.</p> <p>Transférer 75 µl de réactif de détection 2 dans chaque puits en utilisant une pipette à 8 canaux. Incuber à 20-25 °C pendant 15 à 30 minutes.</p> <p>Plus plus d'instructions, consultez le manuel d'utilisation approprié ou contactez votre représentant local QIAGEN.</p>

Observation	Causes probables	Solution
<p>Valeurs de RLU élevées dans le calibrateur, les contrôles de qualité et/ou les échantillons (≥ 200 RLU dans plusieurs puits, voire tous les puits). Le test peut ne pas satisfaire les critères de validation.</p>	<p>Le réactif de dénaturation n'a pas été ajouté ; ou un volume incorrect de réactif a été ajouté ; ou le mélange du réactif de dénaturation avec les échantillons ou les calibrateurs a été inadéquat.</p> <p>Fuite de lumière dans le luminomètre. Porte pas hermétiquement fermée. Étanchéité de la porte défectueuse.</p> <p>Contamination du réactif de détection 2 ou des puits de la microplaque de capture par le réactif de détection 1 ou par de la phosphatase alcaline exogène.</p> <p>Tampon de lavage contaminé.</p> <p>Automated Plate Washer contaminé.</p> <p>Lavage inadéquat des puits de microplaque de capture après incubation du réactif de détection 1.</p> <p>Contamination des puits de la microplaque par le réactif de détection 1.</p> <p>Solution d'hybridation séchée sur la même surface de papier absorbant ou sur un papier absorbant non-pelucheux équivalent.</p> <p>Utilisation de papier absorbant inadéquat.</p>	<p>S'assurer que la pipette à répétition permet une distribution précise avant d'ajouter le réactif de dénaturation. Les pipettes doivent être calibrées. Ajouter un demi-volume de réactif de dénaturation dans chaque tube et bien mélanger. Pour éviter les résultats faussement positifs, s'assurer que le liquide lave l'intégralité de la surface interne du tube. Les calibrateurs, contrôles de qualité et échantillons doivent virer au violet après l'ajout du réactif de dénaturation.</p> <p>Vérifier la lecture du bruit de fond du luminomètre en lisant une microplaque vide. Une valeur supérieure à 50 RLU indique qu'une fuite de lumière existe. Pour plus d'instructions, consultez le manuel d'utilisation approprié ou contactez votre représentant local QIAGEN.</p> <p>Consultez le chapitre Contamination Check (Vérification de la contamination) dans la présente section de résolution des principaux problèmes rencontrés.</p> <p>Consultez le chapitre Contamination Check (Vérification de la contamination) dans la présente section de résolution des principaux problèmes rencontrés.</p> <p>Consultez le chapitre Contamination Check (Vérification de la contamination) dans la présente section de résolution des principaux problèmes rencontrés.</p> <p>Laver soigneusement les puits de la microplaque 6 fois avec le tampon de lavage, en inondant chaque fois les puits ou en utilisant le laveur Automated Plate Washer. Aucun liquide résiduel rose ne doit être visible dans les puits après le lavage. Se référer au manuel d'utilisation de l'<i>Automated Plate Washer (Automated Plate Washer User Manual)</i> pour plus d'instructions concernant les tests de contamination ou de dysfonctionnements.</p> <p>S'assurer que toutes les surfaces de travail sont propres et sèches. Manipuler le réactif de dénaturation 1 avec précautions. Éviter les aérosols.</p> <p>Ne pas sécher sur la surface préalablement utilisée d'un papier absorbant Kimtowels ou équivalent.</p> <p>Utiliser du papier absorbant Kimtowels ou un papier absorbant équivalent non-pelucheux pour sécher.</p>

Observation	Causes probables	Solution
<p>Rapports PC/NC faibles ou nombre important d'échantillons faiblement positifs avec des rapports < 2,0 (> 20 %). Le test peut ne pas satisfaire les critères de validation.</p>	<p>Préparation inadéquate des échantillons.</p> <p>Mélange de sondes inadéquat ou quantité insuffisante de sonde ajoutée.</p> <p>Volume inadéquat de sonde diluée ajoutée dans chaque microtube d'hybridation.</p> <p>Perte de l'activité du réactif de détection 1.</p> <p>Capture insuffisante.</p> <p>Lavage inadéquat.</p> <p>Tampon de lavage contaminé.</p>	<p>Ajouter le volume de réactif de dénaturation approprié et mélanger soigneusement au Vortex. Pour éviter les résultats faussement positifs, s'assurer que le liquide lave l'intégralité de la surface interne du tube. 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. Se référer à la notice d'instructions du kit <i>digene</i> HC2 Sample Conversion pour plus de détails sur le protocole. Un changement sensible de la coloration de violet clair à violet foncé devrait être visible. Incuber pendant 45 ± 5 minutes à 65 ± 2 °C.</p> <p>Préparer les mélanges de sondes de la manière décrite. Mélanger soigneusement au Vortex en s'assurant qu'un tourbillon visible se produise. Les mélanges de sondes doivent être ajoutés dans les tubes en utilisant une pipette à déplacement positif ou une pipette multicanaux pour garantir une distribution précise.</p> <p>S'assurer que la pipette à 8 canaux permet une distribution précise avant d'ajouter le mélange de sondes à la microplaque ou aux microtubes d'hybridation. Ajouter 25 µl de mélange de sondes dans chaque puits de la microplaque ou au microtube contenant les calibrateurs, les contrôles de qualité et les échantillons cliniques dénaturés. S'assurer que la pipette à 8 canaux permet une distribution précise avant d'ajouter le mélange de sondes aux puits de la microplaque d'hybridation. La coloration violet foncé devrait virer au jaune après avoir ajouté et mélangé le mélange de sondes. Les échantillons en solution PreservCyt devraient virer au rose au lieu de virer au jaune.</p> <p>Conserver le réactif de détection 1 à une température de 2 à 8 °C. Utiliser avant la date de péremption figurant sur le conditionnement extérieur du kit.</p> <p>L'étape de capture doit être effectuée en utilisant le Rotary Shaker I à une vitesse de $1\ 100 \pm 100$ tours/min. Confirmer la vitesse de l'agitateur par calibration.</p> <p>Laver soigneusement 6 fois les puits de la microplaque avec le tampon de lavage, en inondant chaque fois les puits ou en utilisant le laveur Automated Plate Washer.</p> <p>Consultez le chapitre Contamination Check (Vérification de la contamination) dans la présente section de résolution des principaux problèmes rencontrés.</p>
<p>Séries d'échantillons positifs avec des valeurs de RLU approximativement identiques.</p>	<p>Contamination des puits de la microplaque de capture lors de la manipulation du test.</p> <p>Contamination du réactif de détection 2.</p> <p>Dysfonctionnement du laveur Automated Plate Washer.</p>	<p>Couvrir la microplaque de capture pendant toutes les incubations. Éviter d'exposer les tubes à une contamination par aérosol pendant le test. Porter des gants non poudrés pendant les manipulations.</p> <p>Prendre soin de ne pas contaminer le stock lors de la distribution du réactif de détection 2 dans les puits de la microplaque de capture. Éviter de contaminer le réactif de détection 2 avec des aérosols du réactif de détection 1 ou avec de la poussière provenant du laboratoire, etc.</p> <p>Se référer au chapitre Contamination Check (Vérification de la contamination) dans la présente section de résolution des principaux problèmes rencontrés ou consultez le manuel d'utilisation <i>Automated Plate Washer (Automated Plate Washer User Manual)</i> pour plus d'instructions concernant les tests de contamination ou de dysfonctionnements.</p>
<p>CV % élevés entre les réplicats.</p>	<p>Pipetage inexact.</p> <p>Mélange insuffisant.</p> <p>Transfert du liquide incomplet des microtubes d'hybridation vers les puits de la microplaque de capture.</p> <p>Conditions de lavages inappropriées.</p> <p>Contamination des puits de la microplaque par le réactif de détection 1.</p>	<p>Vérifier que la pipette distribue des volumes reproductibles. Calibrer les pipettes régulièrement.</p> <p>Mélanger soigneusement à toutes les étapes. Vortexer avant l'incubation de l'étape de dénaturation et après avoir ajouté le mélange de sondes. S'assurer qu'il se forme un tourbillon visible.</p> <p>Effectuer avec précaution le transfert entre les puits de la microplaque d'hybridation ou les microtubes d'hybridation et les puits de microplaque de capture afin de garantir que des volumes reproductibles soient transférés.</p> <p>Laver soigneusement 6 fois les puits de la microplaque avec le tampon de lavage, en inondant les puits à chaque fois ou en utilisant le laveur Automated Plate Washer.</p> <p>S'assurer que toutes les surfaces de travail sont propres et sèches. Manipuler le réactif de dénaturation 1 avec précautions. Éviter les aérosols.</p>

Observation	Causes probables	Solution
Résultats faussement positifs obtenus à partir d'échantillons négatifs connus.	<p>Contamination du réactif de détection 2.</p> <p>Contamination des puits de la microplaque par le réactif de détection 1.</p> <p>Plusieurs rangées séchées sur la même surface de papier absorbant Kimtowels ou sur un équivalent non-pelucheux.</p> <p>Préparation inadéquate des échantillons.</p> <p>Conditions de lavages inappropriées.</p> <p>Contamination de l'embout de la pipette avec une matière non dénaturée pendant le transfert des échantillons dénaturés dans le microtube ou le puits de la microplaque utilisé pour l'hybridation de la sonde HPV.</p>	<p>Lorsque vous aliquotez le réactif de détection 2 entre les échantillons, faire attention de ne pas créer de contamination croisée. Si seulement une partie du kit est utilisée, aliqoter le volume nécessaire pour ce test dans un réservoir à réactif à usage unique avant de remplir la pipette.</p> <p>Laver soigneusement les puits de la microplaque 6 fois avec le tampon de lavage, en inondant les puits à chaque fois 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.</p> <p>Ne pas sécher sur une surface déjà utilisée car cela peut entraîner une contamination.</p> <p>Ajouter le volume de réactif de dénaturation approprié et mélanger soigneusement au Vortex. Pour éviter les résultats faussement positifs, s'assurer que le liquide lave l'intégralité de la surface interne du tube en utilisant la méthode manuelle ou la méthode MST Vortexer 2 (pour la méthode de vortexage manuelle, retourner le tube une fois). 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. Se référer à la notice d'instructions du kit <i>digene</i> HC2 Sample Conversion pour plus de détails sur le protocole. Pour tous les échantillons un changement sensible de coloration au violet foncé doit être visible. Incuber pendant 45 ± 5 minutes à 65 ± 2 °C. Dans le cas d'échantillons en solution SurePath, s'assurer d'incuber les échantillons pendant 90 ± 5 minutes à 65 ± 2 °C.</p> <p>Laver soigneusement 6 fois les puits de la microplaque avec le tampon de lavage, en inondant à chaque fois les puits ou en utilisant le laveur Automated Plate Washer et ses protocoles dédiés.</p> <p>L'étape de dénaturation de la procédure de traitement des échantillons doit être réalisée comme indiquée dans la présente notice d'instructions. Un vortexage des échantillons, une inversion de tube ou une agitation inappropriées peuvent entraîner une dénaturation incomplète des hybrides ARN : ADN non spécifiques endogènes aux échantillons cervicaux. Lorsqu'on utilise des échantillons en solution PreservCyt ou en solution de conservation SurePath en particulier, ces hybrides sont susceptibles d'être présents sur les parois internes du tube de dénaturation des échantillons. Afin d'empêcher un éventuel transfert de cette matière cellulaire non dénaturée, l'embout de la micropipette ne doit pas toucher les parois du tube de dénaturation des échantillons pendant le transfert des échantillons dénaturés dans le microtube ou dans le puits de la microplaque utilisé pour l'hybridation de la sonde HPV.</p>
Valeurs RLU élevées pour le calibrateur négatif (> 200 RLU). Les autres critères du test sont remplis.	<p>Le réactif de détection 2 a été incubé à une température supérieure à 20-25 °C.</p> <p>Le réactif de détection 2 a été incubé pendant plus de 30 minutes.</p> <p>Le réactif de détection 2 ou le tampon de lavage a été contaminé par de la phosphatase alcaline ou du réactif de détection 1.</p>	<p>Refaire le test et s'assurer que les étapes de capture et de détection sont incubées à une température de 20 à 25 °C.</p> <p>Lire la microplaque après 15 minutes d'incubation (ne pas dépasser 30 minutes d'incubation) à 20-25 °C.</p> <p>Consultez le chapitre Contamination Check (Vérification de la contamination) dans la présente section de résolution des principaux problèmes rencontrés.</p>
Le test ne remplit pas les critères de validation. Rapport PC/NC élevé	Inverser le positionnement du HRC et du QC2-HR et/ou du LRC et du QC1-LR	Tester à nouveau les échantillons. Lire attentivement les étiquettes sur les flacons des calibrateurs et des contrôles de qualité afin d'empêcher d'inverser le positionnement de ces réactifs.

VERIFICATION DES CONTAMINATIONS

Réactif évalué	Procédure de vérification des contaminations	Interprétation des résultats
Remarque : Prendre des précautions lors du pipetage du réactif de détection 2 afin d'éviter une contamination. Porter des gants et éviter de faire toucher les embouts de pipette sur les surfaces de travail.		
Réactif de détection 2	<ul style="list-style-type: none"> Distribuer 75 µl de réactif de détection 2 provenant d'un aliquot, d'un résidu et/ou du flacon d'origine dans un puits vide d'une microplaque de capture. Incuber à une température de 20 à 25 °C pendant 15 	<ul style="list-style-type: none"> Le contrôle du réactif de détection 2 doit être < 50 RLU. Si les valeurs du réactif de détection 2 sont < 50 RLU, le réactif de détection 2

	<p>minutes. Éviter toute exposition à la lumière solaire directe.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lire les puits de la microplaque à l'aide du luminomètre. <p>Remarque : Tester le réactif de détection 2 par réplicats de 3 fournit une évaluation optimale de la performance.</p>	<p>peut être utilisé pour répéter le test.</p> <ul style="list-style-type: none"> • S'il est contaminé (> 50 RLU), obtenir un nouveau kit et répéter le test.
Tampon de lavage Appareil et/ou eau d'origine	<ul style="list-style-type: none"> • Distribuer 75 µl de réactif de détection 2 dans 4 puits distincts d'une microplaque de capture. • Numérotter les puits 1 à 4. • Le puits 1 sert de contrôle du réactif de détection 2. • Distribuer 10 µl de tampon de lavage provenant du flacon de lavage dans les puits 2. • Laisser du tampon de lavage s'écouler dans les tubulures du laveur. • Distribuer 10 µl de tampon de lavage provenant des tubulures dans les puits 3. • Se procurer une fraction aliquote de l'eau utilisée pour préparer le tampon de lavage. Distribuer 10 µl de cette eau dans les puits 4. • Incuber à une température de 20 à 25 °C pendant 15 minutes. Éviter toute exposition à la lumière solaire directe. • Lire les puits de la microplaque à l'aide du luminomètre. 	<ul style="list-style-type: none"> • Le contrôle du réactif de détection 2 (puits 1) doit être < 50 RLU. • Comparer la valeur RLU des puits 2, 3 et 4 à la valeur RLU du contrôle du réactif de détection 2 (puits 1). Les valeurs RLU individuelles des puits 2, 3 et 4 ne doivent pas être supérieures de 50 RLU par rapport à la valeur RLU du contrôle du réactif de détection 2 (puits 1). • Les valeurs supérieures de 50 RLU par rapport au contrôle du réactif de détection 2 indique la présence d'une contamination. Voir le chapitre « Préparation et conservation des réactifs » pour des instructions sur le nettoyage et l'entretien de l'appareil de lavage.
Automated Plate Washer	<ul style="list-style-type: none"> • Distribuer 75 µl de réactif de détection 2 dans 5 puits distincts d'une microplaque de capture. • Numérotter les puits 1 à 5. • Le puits 1 sert de contrôle du réactif de détection 2. • Pipeter 10 µl du tampon de lavage dans la bouteille étiquetée <i>Wash</i> (lavage) du laveur de plaques et les transférer dans les puits 2. • Pipeter 10 µl du liquide de rinçage dans la bouteille étiquetée <i>Rinse</i> (rinçage) du laveur de plaques et les transférer dans les puits 3. • Appuyer sur la touche Amorcer sur le clavier du laveur de plaques, permettant au tampon de lavage de s'écouler dans les tuyaux. • Distribuer 10 µl de tampon de lavage provenant de la cuve dans les puits 4. • Appuyer sur la touche Rincer sur le clavier du laveur de plaques, permettant au liquide de rinçage de s'écouler dans les tuyaux. • Distribuer 10 µl de tampon de lavage provenant de la cuve dans les puits 5. • Couvrir et incuber pendant 15 minutes à une température de 20 à 25 °C. Éviter toute exposition à la lumière solaire directe. • Lire les puits de la microplaque à l'aide du luminomètre. 	<ul style="list-style-type: none"> • Le contrôle du réactif de détection 2 (puits 1) doit être < 50 RLU. • Comparer la valeur RLU des puits 2, 3, 4 et 5 à la valeur RLU du contrôle du réactif de détection 2 (puits 1). Les valeurs RLU individuelles des puits 2, 3, 4 et 5 ne doivent pas être supérieures de 50 RLU par rapport à la valeur RLU du contrôle du réactif de détection 2 (puits 1). • Les valeurs supérieures de 50 RLU par rapport au contrôle du réactif de détection 2 indique la présence d'une contamination dans le laveur de plaques. • Se référer au manuel d'utilisation de l'<i>Automated Plate Washer (Automated Plate Washer User Manual)</i>, au chapitre Decontamination Procedure (procédure de décontamination).

CONTACTS

Pour vous mettre en relation avec votre représentant local QIAGEN, veuillez vous reporter à la page intitulée « Contact pour information ».

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

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 :

Numéros de brevets américains sur le HPV

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

Numéro de brevet américain sur la technologie Hybrid Capture

6 228 578B1

Résumé sur le test digene HC2 HPV DNA

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

Procédure

	Méthode de vortexage manuelle	Méthode Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2
DÉNATURATION (Pour les échantillons en solution PreservCyt, se référer à la notice d'instructions du kit <i>digene</i> HC2 Sample Conversion)	<p>Étiqueter les microtubes d'hybridation. Préparer le réactif de dénaturation.</p> <p>↓</p> <p>Distribuer le réactif de dénaturation (le volume est équivalent à la moitié du volume d'échantillon) dans les calibrateurs, contrôles de qualité et échantillons. Mélanger au vortex chaque échantillon, calibrateur et contrôle de qualité individuellement pendant 5 secondes à vitesse élevée (voir la présente notice d'instructions pour plus d'informations). Vérifier que tous les tubes présentent une coloration violette.</p> <p>↓</p> <p>Incuber à 65 ± 2 °C pendant 45 ± 5 minutes.</p> <p>↓</p> <p>Préparer le mélange de sondes HPV.</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p>	<p>Étiqueter la microplaque d'hybridation. Préparer le réactif de dénaturation.</p> <p>↓</p> <p>Distribuer le réactif de dénaturation (le volume est équivalent à la moitié du volume d'échantillon) dans les calibrateurs, contrôles de qualité et échantillons. Vérifier que tous les tubes présentent une coloration violette.</p> <p>↓</p> <p>Couvrir le portoir avec du film et un couvercle.</p> <p>↓</p> <p>Vortexer pendant 10 secondes.</p> <p>↓</p> <p>Incuber à 65 ± 2 °C pendant 45 ± 5 minutes.</p> <p>↓</p> <p>Préparer le mélange de sondes HPV</p> <p>↓</p>
HYBRIDATION Méthode du cocktail de sondes combinées Méthode double sonde	<p>Méthode au bain-marie</p> <p>Bien mélanger l'échantillon dénaturé et distribuer 75 µl dans les tubes.</p> <p>↓</p> <p>Incuber pendant 10 minutes à 20-25 °C</p> <p>↓</p> <p>Distribuer 25 µl de cocktail de sondes combinées dans les microtubes d'hybridation.</p> <p>↓</p> <p>OU</p> <p>Bien mélanger l'échantillon dénaturé et distribuer 75 µl dans les microtubes « LR ». Bien mélanger l'échantillon dénaturé et distribuer 75 µl dans les microtubes « HR ».</p> <p>↓</p> <p>Incuber pendant 10 minutes à 20-25 °C</p> <p>↓</p> <p>Distribuer 25 µl de mélange de sondes HPV à bas risque dans les microtubes « LR ». Distribuer 25 µl de mélange de sondes HPV à haut risque dans les microtubes « HR ».</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>Couvrir les microtubes avec une feuille adhésive et mélanger à l'aide du Rotary Shaker I à $1\ 100 \pm 100$ tours/min. pendant 3 ± 2 minutes. Vérifier que tous les tubes présentent une coloration jaune.</p> <p>↓</p> <p>Incuber à 65 ± 2 °C pendant 60 ± 5 minutes. Préparer la microplaque de capture.</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p>	<p>Méthode avec le Microplate Heater I</p> <p>Bien mélanger l'échantillon dénaturé et distribuer 75 µl dans les puits de microplaque.</p> <p>↓</p> <p>Incuber pendant 10 minutes à 20-25 °C</p> <p>↓</p> <p>Distribuer 25 µl de cocktail de sondes combinées dans les puits de la microplaque d'hybridation.</p> <p>↓</p> <p>OU</p> <p>Bien mélanger l'échantillon dénaturé et distribuer 75 µl dans les puits de la microplaque « LR » et 75 µl dans les puits de la microplaque « HR ».</p> <p>↓</p> <p>Incuber pendant 10 minutes à 20-25 °C</p> <p>↓</p> <p>Distribuer 25 µl de mélange de sondes HPV à bas risque dans les puits de la microplaque « LR ». Distribuer 25 µl de mélange de sondes HPV à haut risque dans les puits de la microplaque « HR ».</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>Couvrir la microplaque avec un couvercle et mélanger à l'aide du Rotary Shaker I à $1\ 100 \pm 100$ tours/min. pendant 3 ± 2 minutes. Vérifier que tous les tubes présentent une coloration jaune.</p> <p>↓</p> <p>Incuber à 65 ± 2 °C pendant 60 ± 5 minutes. Préparer la microplaque de capture.</p> <p>↓</p>
CAPTURE DES HYBRIDES	<p>Transférer le contenu de chaque puits de la microplaque d'hybridation ou de chaque microtube dans le puits correspondant sur la microplaque de capture en utilisant une pipette à 8 canaux.</p> <p>Couvrir avec un couvercle ou une feuille adhésive pour microplaque.</p> <p>Agiter à $1\ 100 \pm 100$ tours/min. à 20-25 °C pendant 60 ± 5 minutes. Préparer le tampon de lavage.</p> <p>↓</p> <p>Décarter et sécher la microplaque de capture (voir la présente notice d'instructions pour plus d'informations).</p> <p>↓</p>	
DÉTECTION DES HYBRIDES	<p>Distribuer 75 µl de réactif de détection 1 dans chaque puits de la microplaque de capture.</p> <p>Couvrir la microplaque de capture avec le couvercle, du Parafilm ou équivalent.</p> <p>Incuber à 20-25 °C pendant 30 à 45 minutes. Laver la microplaque selon la méthode souhaitée.</p> <p>↓</p>	
LAVAGE	<p>Méthode de lavage manuelle</p> <p>Décarter et sécher la microplaque de capture (voir la présente notice d'instructions pour plus d'informations).</p> <p>↓</p> <p>Laver 6 fois.</p> <p>↓</p> <p>Sécher sur du papier absorbant non-pelucreux</p> <p>↓</p>	<p>Méthode utilisant le laveur Automated Plate Washer</p> <p>Placer la microplaque sur le laveur et appuyer sur « START/STOP » pour commencer.</p> <p>↓</p> <p>Passer à l'étape suivante.</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p> <p>↓</p>
AMPLIFICATION DU SIGNAL	<p>Distribuer 75 µl de réactif de détection 2 dans chaque puits de la microplaque de capture.</p> <p>Incuber à 20-25 °C pendant 15 à 30 minutes.</p> <p>↓</p>	
LECTURE	<p>Lisez la microplaque de capture dans l'instrument DML.</p> <p>↓</p> <p>Valider le test et interpréter les résultats des échantillons.</p>	