

Instruções de utilização do teste *digene*[®] HC2 HPV DNA

IVD

 96

Ensaio de hibridização de ácidos nucleicos in vitro com amplificação do sinal, que utiliza a quimioluminescência de microplacas para a detecção qualitativa de 18 tipos de ADN do Papilomavírus Humano (HPV) de alto e baixo risco em amostras cervicais.

Utilizar em conjunto com:

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



REF

5196-1330



QIAGEN

19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874
EUA

EC|REP

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
ALEMANHA
L2126pt Rev. 4



ÍNDICE

NOME E UTILIZAÇÃO PREVISTA	1
SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO	2
PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO	3
REAGENTES E MATERIAIS FORNECIDOS	4
MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS	5
AVISOS E PRECAUÇÕES	7
PRECAUÇÕES DE SEGURANÇA	7
DECLARAÇÕES DE SEGURANÇA E RISCO PARA COMPONENTES	7
PRECAUÇÕES DE MANUSEAMENTO	9
PREPARAÇÃO E ARMAZENAMENTO DOS REAGENTES	10
COLHEITA E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS	14
AMOSTRAS CERVICAIS EM STM	14
BIÓPSIAS CERVICAIS	14
AMOSTRAS CERVICAIS EM SOLUÇÃO PRESERVCYT	14
AMOSTRAS CERVICAIS EM FLUIDO CONSERVANTE SUREPATH	15
PROCEDIMENTO DE TESTE	16
TESTES DE ELEVADOS VOLUMES DE AMOSTRAS UTILIZANDO O RAPID CAPTURE SYSTEM	16
MÉTODO MANUAL	16
DESNATURAÇÃO	17
AGITAÇÃO E DESNATURAÇÃO	21
HIBRIDIZAÇÃO: MÉTODOS DE MISTURA DE SONDAS COMBINADAS (MSC) E DE DUAS SONDAS	24
CAPTURA HÍBRIDA	26
DETEÇÃO HÍBRIDA	27
LAVAGEM	27
AMPLIFICAÇÃO DO SINAL	28
CRITÉRIOS DE VERIFICAÇÃO DA CALIBRAÇÃO DO ENSAIO	30
CÁLCULO DE CORTE	33
CONTROLO DE QUALIDADE	34
INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS DE AMOSTRAS	35
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO	36
DADOS QUE APOIAM A INDICAÇÃO DE HPV DE BAIXO RISCO E DE ALTO RISCO	36
DADOS QUE APOIAM A INDICAÇÃO DE RASTREIO PRIMÁRIO DO HPV DE ALTO RISCO	40
SENSIBILIDADE ANALÍTICA	43
DESEMPENHO DA MISTURA DE SONDAS COMBINADAS (MSC)	44
EQUIVALÊNCIA ENTRE AS AMOSTRAS EM MEIO DE TRANSPORTE DE AMOSTRAS (STM) E EM SOLUÇÃO PRESERVCYT	44
CORRELAÇÃO DOS RESULTADOS DAS AMOSTRAS EM SUREPATH COM AS AMOSTRAS EM MEIO DE TRANSPORTE DE AMOSTRAS (STM) NUMA POPULAÇÃO CLÍNICA	45
REPRODUTIBILIDADE	45
SONDA DE HPV DE ALTO RISCO	46
REATIVIDADE CRUZADA	47
PAINEL DE REATIVIDADE CRUZADA	47
HIBRIDIZAÇÃO CRUZADA	48
EFEITO DO SANGUE E OUTRAS SUBSTÂNCIAS NAS AMOSTRAS STM	48
EFEITO DO SANGUE E OUTRAS SUBSTÂNCIAS NAS AMOSTRAS EM SOLUÇÃO PRESERVCYT	48
REPRODUTIBILIDADE DO TESTE <i>DIGENE</i> HC2 HPV DNA COM AMOSTRAS CLÍNICAS COLHIDAS EM STM	49
MÉDIOS	49
REPRODUTIBILIDADE DO TESTE <i>DIGENE</i> HC2 HPV DNA COM AMOSTRAS CLÍNICAS COLHIDAS EM SOLUÇÃO PRESERVCYT	49
MÉDIOS	50
REPRODUTIBILIDADE DO TESTE <i>DIGENE</i> HC2 HPV DNA COM AMOSTRAS CLÍNICAS COLHIDAS EM FLUIDO CONSERVANTE SUREPATH	51

REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS SUREPATH AO UTILIZAR O RAPID CAPTURE SYSTEM PARA PROCESSAMENTO DO ENSAIO	51
LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO	53
REFERÊNCIAS	54
GUIA DE RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS	57
VERIFICAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO	61
INFORMAÇÕES DE CONTACTO DA QIAGEN.....	63

NOME E UTILIZAÇÃO PREVISTA

Para utilização em diagnóstico in vitro.

O teste *digene* HC2 HPV DNA com utilização da tecnologia Hybrid Capture® 2 (HC2) é um ensaio de hibridização de ácidos nucleicos com amplificação de sinal, que utiliza a quimioluminescência de microplacas para a deteção qualitativa de 18 tipos de ADN do Papilomavírus Humano (HPV) de alto e baixo risco em amostras cervicais.

As amostras cervicais que podem ser testadas com o teste *digene* HC2 HPV DNA incluem:

- Amostras colhidas com o *digene* HC2 DNA Collection Device
- Amostras colhidas utilizando um dispositivo de colheita tipo vassoura ou uma combinação de escova/espátula e colocadas em solução PreservCyt (consultar as instruções de utilização do Kit *digene* HC2 Sample Conversion para obter os detalhes completos)
- Amostras colhidas em fluido conservante SurePath (APENAS para testes High-Risk HPV DNA)
- Biopsias colhidas no *digene* Specimen Transport Medium

Ao utilizar as sondas HPV de baixo e alto risco, a utilização deste teste é indicada:

- Para auxiliar no diagnóstico de infeções de HPV sexualmente transmissíveis com os tipos HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68.
- Para diferenciar entre dois grupos de ADN do HPV: tipos HPV de baixo risco 6, 11, 42, 43 e 44 e tipos HPV de alto risco 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, e 68; no entanto, não é possível determinar o tipo de HPV específico presente.

Ao utilizar a sonda HPV de alto risco, a utilização do teste está indicada:

- Para a deteção de tipos de HPV de alto risco 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68, indicados como o principal fator no desenvolvimento de cancro do colo do útero.
- Como um teste de rastreio inicial da população em geral, a ser utilizado com ou sem amostra citológica, para identificar mulheres com um risco elevado de desenvolvimento de cancro do colo do útero ou a presença de doenças cervicais de alto grau. O diagnóstico do HPV torna-se um indicador de doença do colo do útero cada vez mais rigoroso à medida que a idade aumenta.
- Como teste de seguimento para doentes com resultados anormais das amostras citológicas ou doença do colo do útero para determinar a necessidade de encaminhamento para colposcopia ou outros procedimentos de seguimento.
- Como teste de seguimento para doentes com resultados de Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LSIL) ou Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL) na amostra citológica antes da colposcopia. Para estas doentes, o resultado do teste *digene* HC2 HPV DNA irá ajudar o médico na respetiva gestão, ao constituir um complemento na avaliação dos riscos para as mulheres no sentido de determinar a ausência de doença de alto grau.

O teste *digene* HC2 HPV DNA deve ser utilizado em conjunto com as informações clínicas derivadas de outros testes de diagnóstico e rastreio, exames físicos e historial médico completo em conformidade com os devidos procedimentos de gestão de doentes. Os resultados do teste *digene* HC2 HPV DNA **não devem** ser utilizados como base exclusiva para a avaliação clínica e tratamento de doentes.

SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO

A presença de determinados tipos de HPV no trato genital feminino está associada a diversas doenças, incluindo o condiloma, doença de Bowen, neoplasia e carcinoma intraepitelial do colo uterino, da vagina e da vulva.¹⁻³ É normalmente aceite que estes vírus são predominantemente transmitidos por via sexual e que os tipos de HPV de alto risco constituem o maior fator de risco conhecido para o desenvolvimento do cancro do colo uterino.⁴⁻⁸

Os Papilomavírus humanos são compostos por uma partícula viral icosaédrica (virião) que contém uma molécula circular de ADN de cadeia dupla com cerca de 8000 pares de base, rodeada por uma cápside proteica. Após a infeção das células epiteliais, o ADN viral estabelece-se em toda a espessura do epitélio, mas os viriões intactos só são encontrados nas camadas superiores do tecido. Por isso, o ADN viral pode ser encontrado tanto em viriões como em sequências de HPV epissomais ou integradas, dependendo do tipo e do grau da lesão.

Até à data, o HPV não pode ser cultivado in vitro e os testes imunológicos são inadequados para determinar a presença de infeção cervical por HPV. Podem ser obtidas provas indiretas da existência de uma infeção anogenital por HPV através de um exame físico e pela presença de alterações celulares características associadas à réplica viral em amostras citológicas ou de biopsia. As biopsias podem ser analisadas, alternadamente, por hibridização de ácidos nucleicos para detetar diretamente a presença de ADN do HPV.

Historicamente, os tipos HPV 16 e HPV 18 têm sido considerados como HPVs de alto risco associados a cancro e os tipos HPV 6 e 11 como HPVs de baixo risco.⁸⁻¹⁰ Subsequentemente, os tipos HPV 31, 33 e 35 têm demonstrado ter uma associação intermédia com o cancro.^{2,11-14} Apesar deste quadro concetual útil, estes 7 tipos de HPV apenas são responsáveis por cerca de 70% das neoplasias cervicais.⁹⁻¹¹ HPVs adicionais, incluindo os tipos 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 foram identificados como HPV principal, detetável nas restantes lesões^{15-20,32-36}. Estes tipos de HPV também podem ser classificados em grupos de risco baixo, intermédio e alto, com base na sua distribuição relativa em várias categorias de diagnósticos histopatológicos.^{21, 32-37}

Ficou demonstrado que o ADN do HPV se encontra presente em aproximadamente 10% das mulheres com epitélio cervical normal, mas a prevalência real em grupos específicos de mulheres é fortemente influenciada pela idade e por outras variáveis demográficas.^{2,10,21,31} Estudos prospetivos demonstraram que 15-28% das mulheres com ADN do HPV positivo desenvolveram neoplasia intraepitelial escamosa (SIL) no espaço de 2 anos, em comparação com apenas 1.3% das mulheres com ADN do HPV negativo.^{22,23} Em particular, o risco de desenvolvimento para os tipos de HPV 16 e 18 foi superior (aproximadamente 40%) do que para outros tipos de HPV.²²

PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO

O teste *digene* HC2 HPV DNA, que utiliza a tecnologia HC2, é um ensaio de captura de anticorpos de hibridização com amplificação do sinal que utiliza a detecção quimioluminescente de microplacas. As amostras que contêm o ADN alvo hibridizam com uma mistura específica de sonda de ARN do HPV. Os híbridos ARN:ADN resultantes são capturados para a superfície do poço de uma microplaca revestida com anticorpos específicos para híbridos ARN:ADN. Os híbridos imobilizados reagem então com anticorpos específicos conjugados com fosfatase alcalina para híbridos ARN:ADN e são detetados com um substrato quimioluminescente. Por cada anticorpo, são conjugadas diversas moléculas de fosfatase alcalina. Vários anticorpos conjugados ligam-se a cada híbrido capturado, resultando na amplificação substancial do sinal. À medida que o substrato é clivado pela fosfatase alcalina associada, é emitida uma luz que é medida num luminómetro em Unidades Relativas de Luz (URL). A intensidade da luz emitida indica a presença ou ausência de ADN alvo na amostra.

Um valor de URL igual ou superior ao Valor de Corte (VC) revela a presença de sequências de ADN do HPV na amostra. Um valor de URL inferior ao valor de corte indica a ausência das sequências de ADN do HPV específicas testadas ou níveis de ADN do HPV inferiores ao limite de detecção do ensaio.

Os testes de elevados volumes de amostras com o teste *digene* HC2 HPV DNA podem ser efetuados utilizando o Rapid Capture[®] System (RCS). Este instrumento processa até 352 amostras em oito horas. Para permitir o teste de um volume elevado de amostras, o sistema RCS realiza todos os passos do procedimento de ensaio, exceto a desnaturação da amostra, a detecção do sinal de quimioluminescência e o relatório de resultados.

REAGENTES E MATERIAIS FORNECIDOS

Há 96 testes num kit de teste digene HC2 HPV DNA (n.º de catálogo 5196-1330). O número de resultados de doente varia em função do número de utilizações por kit:

1 utilização = 40 resultados de doente (baixo risco e alto risco)

2 utilizações = 32 resultados de doente (baixo risco e alto risco)

- 1 x 0,35 ml **Corante indicador**
Contém 0,05% p/v de azida de sódio.
- 1 x 50 ml **Reagente de desnaturação**
Solução de hidróxido de sódio (NaOH) diluído.
- 1 x 5 ml **Diluyente de sonda**
Solução tamponada com 0,05% p/v de azida de sódio.
- 1 x 150 µl **Sonda HPV de baixo risco**
Sonda de ARN do HPV 6/11/42/43/44 em solução tamponada (tampa verde).
- 1 x 100 µl **Sonda HPV de alto risco**
Sonda de ARN do HPV 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68 numa solução tamponada (tampa vermelha).
- 1 x 1 ml **Controlo de qualidade do HPV de baixo risco**
5 pg/ml (500 000 cópias/ml) de ADN do HPV 6 clonado e ADN portador em STM com 0,05% p/v de azida de sódio.
- 1 x 1 ml **Controlo de qualidade do HPV de alto risco**
5 pg/ml (500 000 cópias/ml) de ADN do HPV 16 clonado e ADN portador em STM com 0,05% p/v de azida de sódio.
- 1 x 2,0 ml **Calibrador negativo**
ADN portador em STM (Specimen Transport Medium - meio de transporte de amostras) com 0,05% p/v de azida de sódio.
- 1 x 1,0 ml **Calibrador de HPV de baixo risco**
1 pg/ml de ADN de HPV 11 clonado e ADN portador em STM com 0,05% p/v de azida de sódio.
- 1 x 1,0 ml **Calibrador de HPV de alto risco**
1 pg/ml de ADN de HPV 16 clonado e ADN portador em STM com 0,05% p/v de azida de sódio.
- 1 x 1 **Microplaca de captura**
Revestida com anticorpos híbridos anti-ARN:ADN.
- 1 x 12 ml **Reagente de deteção 1**
Anticorpos conjugados com fosfatase alcalina para híbridos ARN:ADN em solução tamponada com 0,05% p/v de azida de sódio.
- 1 x 12 ml **Reagente de deteção 2**
CDP-Star[®] com Emerald II (substrato quimioluminescente).
- 1 x 100 ml **Concentrado de tampão de lavagem**
Contém 1,5% p/v de azida de sódio.

MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS

Equipamento e acessórios de diagnóstico *in vitro* para o Hybrid Capture System^A

digene Hybrid Capture 2 System (“sistema *digene* HC2”), composto por um luminômetro aprovado pela QIAGEN (“instrumento DML”), computador pessoal e periféricos (monitor, teclado, rato, impressora e cabo de impressora) aprovados pela QIAGEN, *digene* HC2 System Software (“software de análise de ensaios *digene*”), *digene* HC2 System Assay Protocols for HPV (protocolos de ensaio do sistema HC2 *digene* para HPV), LumiCheck Plate Software (software da placa LumiCheck) e manual do utilizador do software do sistema HC2 *digene* (*digene* HC2 System Software)

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) vórtexer 2 (Opcional)^B

Suporte de conversão e respetiva tampa (opcional)

Suporte de amostra e respetiva tampa *digene* (opcional)

EXPANSÃO para 4 pipetadores e suporte (opcional)^C

digene HC2 DNA Collection Device^D

Dispensador de seladores de tubos e dispositivo de corte (opcional, utilizado com o MST Vortexer 2)

Rapid Capture System (opcional para testes de elevados volumes de amostras)

Aparelho de lavagem

Microplacas de hibridização

Tampas para microplacas

Tiras de microplacas vazias (disponível junto da Costar, modelo n.º 2581); opcional para utilização com o Automated Plate Washer

Pontas de pipeta extralongas para colheita da amostra

Microtubos de colheita de amostras

Suporte de microtubos de colheita de amostras

Tampas de rosca para microtubos de colheita de amostras

Reservatórios de reagente descartáveis

DuraSeal™ Tube Sealer Film

Microtubos de hibridização.

Suporte de microtubos

Vedantes de placas

Equipamento e acessórios para utilização geral em laboratório

Banho-maria a 65 ± 2 °C de dimensão suficiente para conter 1 suporte de conversão (36 x 21 x 9 cm) ou suportes de amostra

Microcentrífuga (opcional, para centrifugar os frascos das sondas para obter um volume máximo da sonda)

Agitador tipo vórtex com ligação para copo

Micropipetador de canal único; com volumes variáveis entre 20 e 200 µl e 200 e 1000 µl

Pipetador de deslocamento positivo repetido, como a pipeta Eppendorf® Repeater® ou equivalente

Pipetador de 8 canais: com volumes variáveis entre 25-200 µl

Temporizador

Solução de hipoclorito de sódio, 5% v/v (ou lixívia doméstica) Parafilm® ou equivalente

Pontas de pipeta descartáveis com proteção contra aerossóis para pipetador de canal único (20 a 200 µl e 200 a 1000 µl)

Pontas descartáveis para pipetas Eppendorf Repeater (25 e 500 µl)

Pontas descartáveis para pipetador de 8 canais (25 a 200 µl)

Papel absorvente Kimtowels® ou toalhas de papel sem felpo equivalentes

Capa descartável para bancada

Luvas isentas de pó

Tubos de polipropileno de fundo redondo e tampa ajustável de 5 ml e/ou 15 ml (para diluição das sondas)

Tubos de polipropileno de 2,0 ml para microcentrífuga com tampa

Tubos de polipropileno de 2,0 ml para microcentrífuga com tampa

Tubos de polipropileno de 2,0 ml para microcentrífuga com tampa

Tubos de polipropileno de 2,0 ml para microcentrífuga com tampa

Equipamento e acessórios adicionais para processamento de amostras em solução PreservCyt

Centrífuga de cabeça oscilante capaz de atingir 2900 ± 150 x g e de comportar tubos de centrifuga cónicos em polipropileno de 10 ml ou 15 ml

Pipetas serológicas ou de transferência de 5 ml

Kit de conversão de amostra *digene* HC2^A

Pontas descartáveis para pipetas Eppendorf Repeater (50 e 100 µl)

Para procedimento de vórtex manual:

Tubos HC2 *digene* Sample Conversion (cónicos de 15 ml)^F, tubos cónicos Sarstedt de 10 ml com tampas ou VWR® ou tubos de centrifuga com fundo cónico em polipropileno com tampas da marca Corning® de 15 ml

Suporte de tubos com capacidade para tubos cónicos de 10 ml ou de 15 ml

Para procedimento de MST Vortexer 2

Tubos *digene* HC2 Sample Conversion (cónicos de 15 ml)^F

MST Vortexer 2

Suporte de conversão e tampa (específicos para tubos cónicos de 15 ml)

Distribuidor de vedantes para tubos e dispositivo de corte DuraSeal Tube Sealer Film (utilizada com o MST Vortexer 2)

^A Na QIAGEN apenas estão disponíveis equipamento e acessórios validados com os testes *digene* HC2 HPV DNA.

^B Igualmente necessário quando utilizar a aplicação RCS semiautomática.

- ^C Este é um artigo personalizado. Podem ser utilizadas outras pipetas multicanal expansíveis, desde que seja alcançado um intervalo entre pontas de 3,2 cm, quando expandidas. Alternativamente, poderá ser utilizada uma pipeta de canal único capaz de pipetar 75 µl.
- ^D As características de desempenho do teste *digene* HC2 HPV DNA foram estabelecidas apenas com os kits de colheita indicados.
- ^E Consultar o manual do utilizador do *Rapid Capture System* para obter instruções específicas à utilização desse sistema para testes de elevados volumes de amostras com este ensaio.
- ^F Os tubos *digene* HC2 Sample Conversion (marca VWR ou Corning®) disponíveis na QIAGEN devem ser utilizados para assegurar o desempenho adequado do ensaio quando é utilizado o procedimento com o MST Vortexer 2.

AVISOS E PRECAUÇÕES

LER CUIDADOSAMENTE TODAS AS INSTRUÇÕES ANTES DE UTILIZAR O TESTE.

PRECAUÇÕES DE SEGURANÇA

TODAS AS AMOSTRAS devem ser consideradas como potencialmente infecciosas. Nenhum método de teste conhecido poderá garantir em absoluto que as amostras não irão transmitir infecções. Recomenda-se que as amostras humanas sejam manuseadas de acordo com as práticas de biossegurança nacionais/locais adequadas. Utilizar estas práticas de biossegurança com materiais que contenham ou se suspeite que contêm agentes infecciosos. Estas precauções incluem, mas não se limitam aos seguintes:

1. Não pipetar com a boca.
2. Não fumar, comer ou beber nas áreas onde se manuseiam reagentes ou amostras.
3. Usar luvas descartáveis sem pó de talco durante o manuseamento de reagentes ou amostras. Lavar bem as mãos depois de realizar a análise.
4. Limpar e desinfetar todos os derrames de amostras com um desinfetante tuberculocida, tal como hipoclorito de sódio a 0,5% v/v ou outro desinfetante adequado.^{42,43}
5. Descontaminar e eliminar todas as amostras, reagentes ou outros materiais potencialmente contaminados, em conformidade com os regulamentos locais e nacionais.

Alguns reagentes contêm azida de sódio. Há relatos de a azida de sódio formar azida de chumbo ou cobre em canalizações de laboratório. Estas azidas podem explodir por percussão, como acontece ao martelar. Para evitar a formação de azida de chumbo ou de cobre, deixar correr bastante água no lavatório depois de eliminar soluções que contenham azida de sódio. Para remover contaminações em canalizações antigas, onde se suspeite da existência de acumulação de azida, a US Occupational Safety and Health Administration (entidade americana para a higiene e segurança no trabalho) recomenda o seguinte: (1) escoar o líquido através dos sifões, utilizando um tubo de borracha ou de plástico, (2) encher com uma solução de 10% v/v de hidróxido de sódio, (3) deixar repousar durante 16 horas e (4) deixar correr água abundantemente.

Testes automatizados no RCS

Consultar o manual do utilizador do *Rapid Capture System* para obter avisos e precauções adicionais específicos à utilização desse sistema para testes de elevados volumes de amostras.

DECLARAÇÕES DE SEGURANÇA E RISCO PARA COMPONENTES

As seguintes frases de risco e segurança aplicam-se aos componentes do kit *digene* HC2 HPV DNA Test:

Concentrado de tampão de lavagem



Contém: Azida de sódio. Aviso! Nocivo por ingestão. Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. Evitar a libertação para o ambiente. Eliminar o conteúdo/recipiente num local de eliminação de resíduos aprovados.

Reagente de desnaturação



Contém: hidróxido de sódio. Perigo! Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. Pode ser corrosivo para os metais. Eliminar o conteúdo/recipiente num local de eliminação de resíduos aprovado. SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar

lentes de contacto, retirá-las, se tal for possível. Continuar a enxaguar. SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): Despir/retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/tomar um duche. Contactar imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. Armazenar em local fechado à chave. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

Diluyente de sonda



Contém: ácido acético; ácido poliacrílico. Perigo! Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. Eliminar o conteúdo/recipiente num local de eliminação de resíduos aprovado. SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retirá-las, se tal for possível. Continuar a enxaguar. SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): Despir/retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água/tomar um duche. Contactar imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. Armazenar em local fechado à chave. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

Calibrador de HPV de alto risco

Aviso! Provoca uma ligeira irritação da pele. Se ocorrer irritação da pele: Obter assistência/aconselhamento médico.

Calibrador de HPV de baixo risco

Aviso! Provoca uma ligeira irritação da pele. Se ocorrer irritação da pele: Obter assistência/aconselhamento médico.

Controlo de qualidade do HPV de alto risco

Aviso! Provoca uma ligeira irritação da pele. Se ocorrer irritação da pele: Obter assistência/aconselhamento médico.

Controlo de qualidade do HPV de baixo risco

Aviso! Provoca uma ligeira irritação da pele. Se ocorrer irritação da pele: Obter assistência/aconselhamento médico.

Calibrador negativo

Aviso! Provoca uma ligeira irritação da pele. Se ocorrer irritação da pele: Obter assistência/aconselhamento médico.

Mais informações

Fichas de dados de segurança: www.qiagen.com/safety

PRECAUÇÕES DE MANUSEAMENTO

1. Para utilização em diagnóstico in vitro.
2. A escova cervical só deve ser utilizada em mulheres que não estejam grávidas.
3. Não utilizar os reagentes depois do prazo de validade indicado junto ao símbolo  no rótulo da embalagem exterior.
4. A realização do ensaio fora dos intervalos de tempo e de temperatura indicados pode dar origem a resultados inválidos. Os ensaios que não cumpram estes intervalos estabelecidos são considerados inválidos e têm de ser repetidos.
5. O procedimento, critérios de verificação da calibração do ensaio, controlo de qualidade e interpretação dos resultados da amostra com o teste *digene* HC2 HPV DNA devem ser rigorosamente seguidos para obter resultados fiáveis no teste.
6. É importante pipetar exatamente o volume de reagente indicado e misturar bem após a adição de cada reagente. Caso contrário, poderão obter-se resultados errados. Assegurar que as alterações de cor detetadas confirmam que estas condições foram satisfeitas.
7. Os componentes do kit foram testados como uma unidade. **Não** misturar componentes de outras origens ou de lotes diferentes.
8. Os ácidos nucleicos são muito sensíveis à degradação por nuclease no meio ambiente. As nucleases estão presentes na pele humana e nas superfícies ou materiais manuseados por humanos. Limpar e cobrir as superfícies de trabalho com uma capa descartável para bancada e **utilizar luvas sem pó durante a realização de todos os passos do ensaio.**
9. Garantir que se evita a contaminação da microplaca de captura e do reagente de deteção 2 com fosfatase alcalina exógena durante a realização do ensaio. As substâncias que podem conter fosfatase alcalina incluem o reagente de deteção 1, bactérias, saliva, cabelo e gordura da pele. **Cobrir a microplaca de captura após o passo de lavagem e durante a incubação do reagente de deteção 2 é particularmente importante porque a fosfatase alcalina exógena poderá reagir com o reagente de deteção 2, produzindo resultados falso-positivos.**
10. Proteger o reagente de deteção 2 contra a exposição prolongada a luz direta. Utilizar o reagente de deteção 2 imediatamente após a criação de alíquotas e evitar a luz direta do sol.
11. O pipetador de repetição deve ser preparado antes da distribuição do reagente e deve ser verificado, periodicamente, para que não contenha grandes bolhas de ar. Uma quantidade excessiva de grandes bolhas de ar na ponta do pipetador de repetição pode provocar uma distribuição imprecisa, podendo ser evitada ao encher o pipetador, esvaziar todo o líquido e voltar a encher. Consultar os manuais de instruções do fabricante do pipetador para obter indicações específicas de utilização.
12. A utilização da pipeta multicanal deve ser realizada recorrendo à técnica de pipetagem inversa (ver *Deteção Híbrida*) para distribuir os reagentes de deteção 1 e 2. Verificar se a ponta de cada pipeta no pipetador multicanal se encontra corretamente encaixada e cheia.
13. Certificar-se de que cada poço da microplaca é minuciosamente lavada, tal como indicado nas instruções do manual de lavagem. Uma lavagem inadequada irá resultar no aumento do fundo e poderá provocar resultados falso-positivos. A presença de tampão de lavagem residual nos poços pode provocar uma redução do sinal ou uma má reprodutibilidade.
14. Deixar passar, pelo menos, 60 minutos para a elevação da temperatura do Hybrid Capture System Microplate Heater I a $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ a partir de um início a frio. A não observância deste período de aquecimento pode dar origem a que a microplaca de hibridização derreta, Consultar o *Microplate Heater I Manual do Utilizador* para mais informações.

PREPARAÇÃO E ARMAZENAMENTO DOS REAGENTES

1. Após a entrega, armazenar a uma temperatura entre 2 e 8 °C. O concentrado de tampão de lavagem, o reagente de desnaturação e o corante indicador podem ser armazenados a uma temperatura entre 2 e 30 °C, conforme pretendido.
2. Não utilizar depois do prazo de validade indicado junto ao símbolo  no rótulo da embalagem exterior ou do prazo de validade dos reagentes preparados (ver em baixo).
3. Todos os reagentes estão prontos a ser utilizados, exceto o reagente de desnaturação, as sondas de HPV de baixo e de alto risco e o concentrado de tampão de lavagem.

Fornecemos um método com mistura de sondas combinadas (MSC) para analisar amostras quanto à presença de qualquer um dos 18 tipos de HPV. Para analisar com esta opção, será necessário preparar uma mistura de sondas combinadas, misturando Low-Risk HPV Probe Mix (mistura de sondas HPV de baixo risco) diluída e High-Risk HPV Probe Mix (mistura de sondas HPV de alto risco) diluída antes de realizar o teste *digene* HC2 HPV DNA. O método de duas sondas utiliza a mistura de sondas de HPV de alto e de baixo risco em separado. Consultar as instruções em baixo.

Para testes de elevados volumes de amostras, consultar o *Manual do Utilizador do Sistema Rapid Capture* para a preparação da(s) HPV Probe Mix, do tampão de lavagem, do reagente de detecção 1 e do reagente de detecção 2, uma vez que essas instruções são específicas à utilização desse sistema para testes de elevados volumes de amostras.

REAGENTE	MÉTODO DE PREPARAÇÃO
Reagente de desnaturação	<p>Preparar primeiro:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Adicionar 5 gotas de corante indicador ao frasco de reagente de desnaturação e misturar minuciosamente. O reagente de desnaturação deve apresentar uma cor púrpura escura uniforme. • Uma vez preparado, o reagente de desnaturação mantém-se estável durante três meses, quando armazenado a uma temperatura de 2-8 °C. Rotulá-lo com um novo prazo de validade. Se a cor ficar mais clara, adicionar 3 gotas de corante indicador e misturar minuciosamente antes de utilizar. <p>Aviso: O reagente de desnaturação é corrosivo. Usar vestuário de proteção, luvas e equipamento protetor para os olhos/face adequados. Ter cuidado durante o manuseamento.</p>
Low-Risk HPV Probe Mix (mistura de sondas HPV de baixo risco) (preparada a partir de sonda HPV de baixo risco e reagentes de diluente de sonda)	<p>Preparar durante a incubação para a desnaturação da amostra:</p> <p>Importante: Por vezes, a sonda fica presa na tampa do frasco.</p> <p>Nota: Evitar a contaminação de RNase da sonda e mistura de sonda. Utilizar pontas de pipetas com proteção contra aerossóis para pipetar a sonda. O diluente de sonda é viscoso.</p> <p>Misturar bem ao preparar as sondas HPV. Deverá formar-se um vórtice visível no líquido durante o passo de mistura. Uma mistura incompleta pode resultar num sinal reduzido.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Centrifugar brevemente o frasco de Low-Risk HPV Probe (sonda HPV de baixo risco) para fazer com que o líquido desça para o fundo do frasco. Bater levemente para misturar. • Determinar a quantidade de mistura de sondas necessária (25 µl/teste). Recomenda-se a preparação de uma porção extra de mistura de sondas para compensar o volume que se possa perder nas pontas das pipetas ou nas paredes do frasco. Consultar os volumes sugeridos, indicados em baixo. O número mínimo de poços recomendado para cada utilização é de 24. Se se pretender utilizar menos de 24 poços por ensaio, o número total de testes por kit pode ser reduzido devido a volumes limitados da sonda e de diluente de sonda. • Transferir a quantidade necessária de diluente de sonda para um novo recipiente descartável. Dependendo do número de testes, recomenda-se a utilização de um tubo de polipropileno com fundo redondo e tampa de encaixe de 5 ml ou 15 ml. Preparar uma diluição de 1:25 de sonda HPV de baixo risco em diluente de sonda para preparar a mistura de sondas.

		N.º de testes/tiras	Volume de diluente de sonda*	Volume da sonda*
		48/6	2,0 ml	80,0 µl
		24/3	1,0 ml	40,0 µl
		Por poço	0,045 ml	1,8 µl

*Estes valores incluem o volume extra recomendado.

- Pipetar Low-Risk HPV Probe para o diluente de sonda, colocando a ponta da piqueta encostada à parede interior do tubo, imediatamente acima do menisco e expelindo o conteúdo. **Não mergulhar a ponta no diluente de sonda.**
- Agitar no vórtex durante, pelo menos, 5 segundos à velocidade máxima para misturar minuciosamente. **Deve formar-se um vórtice visível.** Rotular como mistura de sondas HPV de baixo risco e conservar num recipiente limpo e fechado até utilizar. **A mistura de sondas não utilizada deve ser eliminada.**

Mistura de sondas HPV de alto risco	Preparar como acima indicado para a mistura de sondas HPV de baixo risco. Rotular como mistura de sondas HPV de alto risco. A mistura de sondas não utilizada deve ser eliminada.
Mistura de sondas combinadas	Preparar as misturas de sondas HPV de baixo risco e de sondas HPV de alto risco conforme acima indicado. Adicionar todo o conteúdo da mistura de sondas HPV de baixo risco diluída ao tubo da mistura de sondas HPV de alto risco diluída. Misturar bem, agitando durante pelo menos 5 segundos à velocidade máxima. Deve formar-se um vórtice visível. Rotular como mistura de sondas combinadas. A mistura de sondas não utilizada deve ser eliminada.

<p>Tampão lavagem</p>	<p>Preparar durante o processo de captura:</p> <p>Para o Hybrid Capture System Automated Plate Washer, o tampão de lavagem pode ser preparado, tal como descrito abaixo e conservado num recipiente coberto ou preparado 1 litro de cada vez e colocado nos reservatórios de lavagem do Automated Plate Washer. Ver na tabela abaixo os volumes de mistura:</p> <p>Consultar as instruções de cuidado e manutenção no Automated Plate Washer Manual do Utilizador.</p> <p>Aviso: O concentrado de tampão de lavagem é tóxico por ingestão. Usar vestuário de proteção, luvas e equipamento protetor para os olhos/face adequados. Para minimizar a exposição, adicionar água ao concentrado de tampão de lavagem durante a preparação.</p> <table border="1" data-bbox="483 520 1333 688"> <thead> <tr> <th>Quantidade de concentrado de tampão de lavagem</th> <th>Quantidade de água destilada ou desionizada</th> <th>Volume final de tampão de lavagem</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>1933,4 ml</td> <td>2 l</td> </tr> <tr> <td>100 ml</td> <td>2900 ml</td> <td>3 l</td> </tr> </tbody> </table> <p>Nota: É muito importante que a alimentação para o Automated Plate Washer seja mantida ligada. Isto permite que a lavagem de manutenção seja realizada após oito horas de não utilização.</p> <p>Antes de cada ensaio, assegurar que o reservatório de resíduos do Automated Plate Washer está vazio e que o reservatório de enxaguamento está cheio com água destilada ou desionizada.</p> <p>Para o método de lavagem manual de placas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Misturar bem o poço do concentrado de tampão de lavagem. • Diluir 100 ml de concentrado de tampão de lavagem com 2,9 l de água destilada ou desionizada no aparelho de lavagem e misturar bem (o volume final deve ser de 3 l). • Vedar o recipiente para evitar a contaminação ou a evaporação. <p>Uma vez preparado, o tampão de lavagem mantém-se estável durante três meses, quando armazenado a uma temperatura de 2-30 °C. Rotulá-lo com um novo prazo de validade. Se o tampão de lavagem tiver sido refrigerado, deixar estabilizar a uma temperatura de 20-25 °C antes de o utilizar.</p> <p>Recomenda-se que o aparelho de lavagem e a tubagem sejam limpos com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5% e bem enxaguados com água destilada ou desionizada de três em três meses para evitar uma eventual contaminação por fosfatase alcalina, existente nas bactérias e nos bolores.</p>	Quantidade de concentrado de tampão de lavagem	Quantidade de água destilada ou desionizada	Volume final de tampão de lavagem	33,3 ml	966,7 ml	1 l	66,6 ml	1933,4 ml	2 l	100 ml	2900 ml	3 l
Quantidade de concentrado de tampão de lavagem	Quantidade de água destilada ou desionizada	Volume final de tampão de lavagem											
33,3 ml	966,7 ml	1 l											
66,6 ml	1933,4 ml	2 l											
100 ml	2900 ml	3 l											

VOLUMES DOS REAGENTES PRONTOS A USAR**Reagente de
deteção 1 e
reagente de
deteção 2****Imediatamente antes de utilizar:**

Misturar bem o reagente, depois medir cuidadosamente o volume adequado de reagente de deteção 1 ou de reagente de deteção 2 para um reservatório de reagente limpo, observando as orientações abaixo indicadas. Para evitar contaminação, estes reagentes **NÃO DEVEM** ser recolocados nos frascos originais: **Descartar todo o material que não tenha sido utilizado**. Se não estiver a ser utilizado um pipetador de 8 canais, pode ser utilizado um pipetador de repetição. Neste caso, as alíquotas do reagente devem ser recolhidas num tubo de polipropileno com dimensões adequadas para conter o volume necessário, conforme indicado em baixo.

N.º de testes/tiras	Volume do reagente de deteção 1 ou 2
96/12	conteúdo do frasco
72/9	7,0 ml
48/6	5,0 ml
24/3	3,0 ml
1 teste	0,125 ml

COLHEITA E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS

As amostras cervicais colhidas e transportadas com o *digene* HC2 DNA Collection Device (composto por uma escova cervical e *digene* Specimen Transport Medium) ou as amostras colhidas utilizando um dispositivo de colheita tipo vassoura ou uma combinação de escova/espátula e colocadas em solução PreservCyt ou as amostras cervicais colhidas em fluido conservante SurePath são as únicas amostras recomendadas para utilização com o teste *digene* HC2 HPV DNA. As amostras colhidas com outros dispositivos de amostragem ou transportados noutros meios de transporte não foram consideradas para serem utilizadas com este ensaio. As características de desempenho deste kit foram estabelecidas unicamente com os kits de colheita indicados. As amostras cervicais devem ser colhidas antes da aplicação de ácido acético ou iodo caso seja realizada uma colposcopia. Consultar as instruções de utilização do *digene* HC2 DNA Collection Device para procedimentos adicionais de colheita e manuseamento de amostras.

AMOSTRAS CERVICAIS EM STM

As amostras STM podem ser mantidas até duas semanas à temperatura ambiente e enviadas sem refrigeração para o laboratório de análises. As amostras devem ser enviadas num recipiente isolado, quando o transporte se realiza de um dia para o outro ou quando a entrega é efetuada no prazo de 2 dias. No laboratório de análises, as amostras devem ser armazenadas a uma temperatura de 2-8 °C, se o ensaio for realizado no prazo de uma semana. Se o ensaio for realizado após uma semana, armazenar as amostras a uma temperatura de -20 °C até 3 meses (antes de congelar, consultar *Notas* em *Biópsias cervicais*). Foi adicionado um conservante ao meio de transporte de amostras para retardar o desenvolvimento de bactérias e para manter a integridade do ADN. Este conservante **não se destina** a preservar a viabilidade de organismos ou de células. O *digene* HC2 DNA Collection Device não deve ser utilizado para a colheita de amostras de mulheres grávidas.

BIÓPSIAS CERVICAIS

As biópsias cervicais acabadas de colher com 2-5 mm em corte transversal podem ser analisadas com o teste *digene* HC2 HPV DNA. A amostra de biópsia deve ser imediatamente colocada em 1,0 ml de STM e armazenada congelada a -20 °C. As amostras de biópsia devem ser enviadas a 2-30 °C para uma entrega de um dia para o outro no laboratório onde será realizada a análise e armazenadas a -20 °C até serem processadas. Não devem ser utilizadas biópsias com um diâmetro inferior a 2 mm.

Notas: Para evitar que as tampas dos tubos de amostras que são transportados ou armazenados congelados saltem:

- Cobrir as tampas com Parafilm antes de enviar os tubos de amostras previamente congelados. As amostras podem ser enviadas congeladas ou a 20-25 °C.
- Ao retirar as amostras do congelador para realizar os testes, substituir imediatamente as tampas com tampas roscadas para tubos de colheita de amostras.

AMOSTRAS CERVICAIS EM SOLUÇÃO PRESERVCYT

Amostras colhidas utilizando um dispositivo de colheita tipo vassoura ou uma combinação de escova/espátula e colocadas em solução PreservCyt para utilização em lâminas de teste de Papanicolaou ThinPrep® Pap podem ser utilizadas com o teste *digene* HC2 HPV DNA. As amostras devem ser colhidas normalmente e as lâminas de teste de Papanicolaou ThinPrep Pap devem ser preparadas segundo as instruções Hologic.

Nota: Deve restar, pelo menos, 4 ml de solução PreservCyt para o teste *digene* HC2 HPV DNA. As amostras com menos de 4 ml depois do teste de Papanicolaou ter sido preparado contêm material insuficiente e poderão originar um resultado falso-negativo no teste *digene* HC2 HPV DNA.

As amostras em solução PreservCyt podem ser guardadas durante até 3 meses a temperaturas entre 2 e 30 °C, após a colheita e antes de serem processadas para o teste *digene* HC2 High-Risk HPV DNA. As amostras em solução PreservCyt não podem ser congeladas. Para processar estas amostras, consultar o *Procedimento de preparação de amostras PreservCyt*.

AMOSTRAS CERVICAIS EM FLUIDO CONSERVANTE SUREPATH

(APENAS para testes de ADN do HPV de alto risco)

A preparação manual de amostras em SurePath é realizada com o pellet de células após gradiente resultante da preparação das lâminas SurePath Pap Test. Preparar as lâminas SurePath Pap Test de acordo com as instruções aplicáveis para o processador de lâminas BD PrepStain®.

Importante: Imediatamente após a preparação da lâmina SurePath Pap, tem de ser pipetado 2,0 ml de fluido conservante SurePath para dentro do tubo da centrífuga com o pellet de células residual. Isto conserva a integridade do pellet de células após gradiente para o desempenho do teste *digene* HC2 HPV DNA.

O pellet de células após gradiente com fluido conservante SurePath pode ser armazenado durante até 4 semanas a 2–30 °C, antes da preparação das amostras para o teste *digene* HC2 HPV DNA.

As amostras SurePath com pellet de células após gradiente são preparadas como indicado nestas instruções de utilização. O resultado da preparação manual de amostras é uma amostra desnaturada pronta a avançar para o passo de hibridização do teste.

PROCEDIMENTO DE TESTE

As amostras poderão conter agentes infecciosos e deverão ser manuseadas em conformidade. O teste *digene* HC2 HPV DNA pode ser realizado manualmente, tal como indicado nestas instruções de utilização ou utilizando o instrumento Rapid Capture System para testes de elevados volumes de amostras.

TESTES DE ELEVADOS VOLUMES DE AMOSTRAS UTILIZANDO O RAPID CAPTURE SYSTEM

O Rapid Capture System é um sistema de diluição e pipetagem automatizado de utilização geral que pode ser utilizado com o teste *digene* HC2 HPV DNA para testes de elevados volumes de amostras. Este sistema analisa até 352 amostras em oito horas, incluindo um período de 3,5 horas durante o qual não é necessária qualquer intervenção do utilizador; podem obter-se até 704 resultados de amostras em 13 horas. A desnaturação das amostras em fase de preparação para o teste realiza-se independentemente do RCS, antes da colocação das amostras na plataforma RCS. Além disso, a deteção quimioluminescente do sinal e a apresentação de resultados são efetuadas utilizando um instrumento DML offline comum aos métodos manual e no RCS. Os passos processuais do teste *digene* HC2 HPV DNA são levados a cabo exatamente como na sequência do procedimento de teste manual. O aplicação do RCS permite o processamento escalonado de até 4 microplacas, sendo que cada microplaca contém amostras, os calibradores de ensaio e controlos de qualidade necessários.

Durante a utilização do Rapid Capture System, consultar o manual do utilizador do *Rapid Capture System* fornecido com o instrumento, para além destas instruções de utilização, a fim de obter as informações descritivas e processuais necessárias.

MÉTODO MANUAL

Preparação

1. Se se utilizar o aquecedor de microplacas I, **aguardar, pelo menos, 60 minutos até estabilizar a uma temperatura de 65 ± 2 °C a partir de uma temperatura inicial fria.** Consultar o *Microplate Heater I Manual do Utilizador* para mais informações.
2. Confirmar que a temperatura do banho-maria está a 65 °C e que existe água suficiente para cobrir todo o volume dos tubos de amostras.
3. Retirar as amostras e **todos** os reagentes necessários do frigorífico **antes de iniciar o ensaio.** Deixar estabilizar durante 15 a 30 minutos até atingirem uma temperatura de 20-25 °C.

Nota: Preparar a solução PreservCyt e as amostras SurePath antes de estabilizar quaisquer amostras previamente desnaturadas e o reagente do kit à temperatura ambiente.

4. Utilizar o software de análise do ensaio *digene* para criar o esquema de placas do ensaio. Consultar no respetivo manual do utilizador como criar um esquema de placas.
5. Colocar os calibradores, controlos de qualidade e as amostras a serem testadas num suporte de tubos de ensaio, pela mesma ordem por que serão testados. **O calibrador negativo, o calibrador de HPV de baixo risco e o calibrador de HPV de alto risco têm de ser testados PRIMEIRO.** O calibrador negativo (NC), o calibrador de HPV de baixo risco (LRC) ou o calibrador de HPV de alto risco (HRC), o controlo de qualidade de baixo risco (QC1-LR), o controlo de qualidade de alto risco (QC2-LR) e as amostras devem ser executados numa configuração em colunas de 8 poços da microplaca. Ver o *Exemplo de Esquema* em baixo.

Exemplo de um esquema para uma execução de 24 poços da microplaca:			
Linha	Coluna		
	1	2	3
A	NC	Amostra 1	Amostra 9
B	NC	Amostra 2	Amostra 10
C	NC	Amostra 3	Amostra 11

D	LRC ou HRC	Amostra 4	Amostra 12
E	LRC ou HRC	Amostra 5	Amostra 13
F	LRC ou HRC	Amostra 6	Amostra 14
G	QC1-LR	Amostra 7	Amostra 15
H	QC2-HR	Amostra 8	Amostra 16

- Se se utilizar o método da mistura de sondas combinadas (MSC), o NC, o LRC e o HRC são analisados na mesma microplaca em triplicado com a mistura de sondas combinadas. Usar os poços A1, B1 e C1 para o NC e os poços D1, E1, F1, G1, H1 e A2 para o LRC e o HRC, respetivamente. Usar os poços B2 e C2 para os controlos de qualidade QC1-LR e QC2-HR, respetivamente, e as amostras a começar em D2. **O procedimento MSC não foi validado para ser utilizado com o Rapid Capture System.**
- Para o método de duas sondas, realizar os testes da mistura de sondas de HPV de baixo risco no lado esquerdo da microplaca e realizar os testes da mistura de sondas de HPV de alto risco no lado direito da microplaca.

PRIMEIRO, testar o calibrador negativo (NC) e o calibrador de baixo risco (LRC) em triplicado com a mistura de sondas de HPV de baixo risco. Depois, testar os controlos de qualidade (QC1-LR e QC2-LR) e as amostras individualmente, também com a mistura de sondas de HPV de baixo risco. Colocar as réplicas NC em A1, B1, C1; as réplicas LRC em D1, E1, F1; o QC1-LR em G1; o QC2-LR em H1; e as amostras a começar em A2.

SEGUIDAMENTE, testar o NC e o calibrador de alto risco (HRC) em triplicado com a mistura de sondas de HPV de alto risco. Depois testar as amostras de QC1-LR e QC2-HR individualmente, também com a mistura de sondas de HPV de alto risco. Colocar as réplicas NC em A7, B7, C7; as réplicas HCR em D7, E7, F7; o QC1-LR em G7; o QC2-HR em H7; e as amostras a começar em A8. Consultar o exemplo de esquema em cima.

Consultar o manual do utilizador aplicável para a preparação do calibrador/controlo de qualidade/amostra corretos.

- Alternativamente, poderão utilizar-se duas microplacas diferentes para os calibradores, controlos de qualidade e as amostras analisadas com as sondas de HPV de baixo e de alto risco. O NC e o LRC são analisados em triplicado, o QC1-LR e o QC2-HR são analisados uma única vez com uma mistura de sondas de HPV de baixo risco numa microplaca, o NC e o HRC são analisados em triplicado e o QC1-LR e o QC2-HR são analisados uma única vez com uma mistura de sondas de HPV de alto risco numa segunda microplaca. Usar os poços A1, B1 e C1 para o NC e os poços D1, E1 e F1 para o LRC e o HRC, respetivamente. Usar os poços G1 e H1 para os controlos de qualidade QC1-LR e QC2-HR, respetivamente.
- As amostras podem ser analisadas uma vez com a mistura de sondas combinadas se utilizar o método MSC ou uma única vez com a mistura de sondas de HPV de baixo risco e uma única vez com a mistura de sondas de HPV de alto risco se estiver a usar o método das duas sondas.

DESNATURAÇÃO

Notas:

- Aviso:** O reagente de desnaturação é corrosivo. Ter cuidado e usar luvas sem pó durante o seu manuseamento.
- Importante:** Algumas amostras cervicais podem conter sangue ou outros materiais biológicos, que podem dissimular as alterações de cor após a adição de reagente de desnaturação. As amostras que apresentam uma cor escura antes da adição do reagente de desnaturação podem não produzir as alterações de cor adequadas nesta fase. Nestes casos, a não apresentação da alteração de cor apropriada não afeta os resultados do ensaio. A mistura correta pode ser verificada, observando a alteração de cor dos calibradores e controlos de qualidade.
- Durante as fases de desnaturação e de hibridização, assegurar que o nível de água no banho-maria é adequado para mergulhar todo o volume de amostra no tubo.

- Os calibradores, controlos de qualidade e as amostras podem ser preparados durante a fase de desnaturação e armazenados a uma temperatura de 2-8 °C de um dia para o outro, ou a uma temperatura de -20 °C durante até 3 meses. Poderá ser realizado até um máximo de 3 ciclos de congelação/descongelação durante um período máximo de 2 horas à temperatura ambiente durante cada ciclo de descongelação. Misturar bem antes de utilizar.
- Após a desnaturação e a incubação, as amostras deixam de ser consideradas infecciosas.²⁶ No entanto, o pessoal do laboratório deve continuar a observar as precauções nacionais/locais.
- Não retirar o dispositivo de recolha das amostras antes da desnaturação.
- Para evitar resultados falso-positivos, é fundamental que todos os calibradores, controlos de qualidade e material de amostras STM entrem em contacto com o reagente de desnaturação. A mistura após a adição de reagente de desnaturação é um passo muito importante: **Assegurar que o MST Vortexer 2 está configurado para 100 (velocidade máxima) e é possível ver um vórtex de líquido durante a mistura, de tal forma que o líquido lave toda a superfície interna do tubo. Ao realizar uma mistura manual, assegurar cada calibrador, controlo de qualidade e amostra é misturado individualmente, agitando no vórtex durante, pelo menos, 5 segundos à velocidade máxima, de modo a que o vórtex de líquido cubra toda a superfície interna do tubo, devendo depois inverter o tubo uma vez.**

Calibradores, controlos de qualidade e procedimento de preparação de amostras STM

1. Retirar e descartar as tampas dos calibradores, dos controlos de qualidade e dos tubos de amostras STM.

Nota: As tampas retiradas dos tubos das amostras são consideradas como potencialmente infecciosas. Descartar de acordo com os regulamentos locais/nacionais aplicáveis.

2. Pipetar o reagente de desnaturação com o corante indicador em cada calibrador, controlo de qualidade ou amostra de STM, utilizando um pipetador de repetição ou ajustável. Ter cuidado para não tocar nas partes laterais do tubo, pois pode ocorrer contaminação cruzada das amostras. O volume de reagente de desnaturação necessário é equivalente a metade do volume da amostra. O volume exato para cada tipo de calibrador, controlo de qualidade e amostra está indicado na tabela que se segue.

Diluir o restante reagente de desnaturação num frasco antes de descartar de acordo com os procedimentos laboratoriais nacionais/locais.

Calibrador, controlo de qualidade ou amostra	Volumes de reagente de desnaturação necessários
Calibrador negativo	1000 µl
Calibrador de HPV de baixo ou de alto risco	500 µl
Controlos de qualidade de baixo ou de alto risco	500 µl
Amostra cervical	500 µl

3. Misturar as amostras utilizando um dos dois métodos que se seguem.

Método do MST Vortexer 2

Nota: As amostras *digene* HC2 DNA Collection Device misturadas com o MST Vortexer 2 têm de ser hibridizadas utilizando uma microplaca de hibridização e o método Microplate Heater I.

- a) Cobrir o calibrador, os controlos de qualidade e os tubos de amostras STM com DuraSeal Tube Sealer Film, passando a película sobre os tubos no suporte.
- b) Colocar a tampa do suporte sobre os tubos cobertos com a película e fechar com os 2 grampos laterais. Cortar a película com o dispositivo de corte.
- c) Colocar o suporte no MST Vortexer 2 e fixar o suporte com o grampo. Assegurar que a configuração da velocidade é 100 (velocidade máxima) e ligar o Vortexer. Agitar os tubos no vórtex durante 10 segundos.

Método de vórtex manual de tubos individuais

- a) Voltar a tapar o calibrador, os controlos de qualidade e os tubos de amostras de STM com tampas de rosca para microtubos de colheita de amostras limpas.
- b) Misturar bem cada tubo, agitando-o individualmente à velocidade máxima durante 5 segundos.
- c) Inverter cada tubo de amostra uma vez para cobrir todo o interior do tubo, a tampa e o rebordo.
- d) Voltar a colocar o tubo no suporte.

Independentemente do método de agitador tipo vórtex utilizado, **deve ser visível um vórtice de líquido dentro de cada tubo durante a mistura, de forma a que o líquido cubra toda a superfície interna do tubo.** Os calibradores, os controlos de qualidade e as amostras devem adquirir uma cor púrpura.

4. Incubar os tubos no suporte num banho-maria a 65 ± 2 °C durante 45 ± 5 minutos (os calibradores, controlos de qualidade e as amostras desnaturados podem ser analisados imediatamente ou armazenados de acordo com o descrito nas Notas, em cima). Preparar a(s) mistura(s) de sondas de HPV durante esta incubação. Consultar a secção de *Preparação e armazenamento dos reagentes*.

Procedimento de preparação das amostras em solução PreservCyt

Notas:

- Consultar as instruções de utilização do kit *digene* HC2 Sample Conversion.
- O processamento de uma alíquota de 4 ml de solução PreservCyt produz material suficiente para 2 testes, quando realizados manualmente. O volume mínimo que pode ser processado é 4 ml.
- Preparar as amostras em solução PreservCyt em lotes de 36 ou menos; caso contrário, os pellets poderão desalojar-se durante a decantação do sobrenadante. Isto é importante para manter a integridade do pellet de células durante o passo de decantação. Ao preparar frascos adicionais de solução PreservCyt, não iniciar a sua preparação até ter terminado a preparação do primeiro lote.

Preparação de reagentes

Usar o Denaturation Reagent (DNR) fornecido com o teste *digene* HC2 HPV DNA (consultar *Preparação e armazenamento dos reagentes*) ou o DNR fornecido com o Kit *digene* HC2 Sample Conversion. Para preparar o DNR fornecido com o kit *digene* HC2 Sample Conversion, adicionar 3 gotas de corante indicador ao frasco de DNR e misturar minuciosamente. A solução deve apresentar uma cor púrpura escura uniforme. Para determinar os requisitos do volume, utilizar a Tabela 1.

Tabela 1

Requisitos de volume: Preparação de reagentes

Número de testes	Volume de solução PreservCyt	Volume de tampão de conversão
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. Rotular um tubo de *digene* HC2 Sample Conversion, um tubo cónico Sarstedt de 10 ml ou um tubo cónico de 15 ml VWR ou Corning com o número de identificação da amostra adequado.

2. Manusear uma amostra de cada vez:
 - a. Agitar o frasco de solução PreservCyt energicamente com a mão até as células parecerem estar homogeneamente dispersas.
 - b. Uma vez que as células se depositam muito rapidamente, pipetar imediatamente o volume adequado de amostra em solução PreservCyt no tubo rotulado. Verter a solução PreservCyt no fundo do tubo cônico para minimizar a aderência do material celular na parte interior do tubo.
3. Adicionar o volume adequado de tampão de conversão da amostra a cada tubo (ver a Tabela 1).
4. Voltar a tapar e agitar o conteúdo de cada tubo cuidadosamente usando um agitador tipo vórtex com ligação para copo.

Nota: O procedimento com o MST Vortexer 2 não foi validado para agitar amostras em solução PreservCyt com o tampão de conversão de amostras antes da centrifugação e não deve, por conseguinte, ser utilizado neste passo.

5. Centrifugar os tubos num rotor de cabeça oscilante a $2900 \pm 150 \times g$ durante 15 ± 2 minutos.
6. Durante a centrifugação, preparar a mistura de meio de transporte de amostras/reagente de desnaturação (STM/DNR) numa proporção de 2:1, de acordo com a Tabela 2.

Nota: A mistura de STM/DNR tem de ser preparada de fresco todos os dias em que o teste é realizado.

- a. Para determinar o volume total da mistura de STM/DNR necessário, utilizar o volume inicial da amostra em solução PreservCyt como orientação e depois multiplicar os volumes do STM e do DNR “por tubo” pelo número de amostras a processar (ver a Tabela 2).

Tabela 2
Requisitos de volume: STM/DNR

Número de testes	Volume de solução PreservCyt	Volume STM por tubo para a mistura STM/DNR final*	Volume DNR por tubo para a mistura STM/DNR final*	Mistura STM/DNR adicionada por tubo
1-2	4 ml	120 μ l	60 μ l	150 μ l
3	6 ml	170 μ l	85 μ l	225 μ l
4	8 ml	220 μ l	110 μ l	300 μ l
5	10 ml	270 μ l	135 μ l	375 μ l
6	12 ml	320 μ l	160 μ l	450 μ l

* Os volumes indicados nestas colunas não devem ser diretamente adicionados ao tubo da amostra.

- b. Misturar bem a solução no vórtex.
7. Retirar os tubos da centrífuga, um tubo de cada vez, e colocá-los num suporte ou no suporte de conversão. Deve haver um pellet rosa/laranja no fundo de cada tubo.

Nota: As amostras que não tenham um pellet visível depois da centrifugação não são aceitáveis para testar e devem ser descartadas.
 8. Manuseamento individual de cada tubo:
 - a. Retirar a tampa e colocá-la de lado sobre uma toalha de papel sem felpe limpa.
 - b. Decantar cuidadosamente o sobrenadante.
 - c. Manter a posição invertida do tubo e secar suavemente (aproximadamente 6 vezes) sobre toalhas absorventes de papel sem felpe até que deixe de sair líquido pelo tubo. Usar uma área limpa da toalha de cada uma das vezes. **Não** permitir que o pellet de células deslize para baixo no tubo durante a secagem.

Notas:

- Não secar na mesma área da toalha absorvente de papel sem felpe mais do que uma vez.

- É importante retirar a quantidade máxima de solução PreservCyt durante a secagem. No entanto, é normal observar solução PreservCyt residual depois da secagem.
- d. Colocar o tubo num suporte ou no suporte de conversão.

AGITAÇÃO E DESNATURAÇÃO

Procedimento do agitador tipo vórtex manual

1. Adicionar o volume adequado de STM/DNR a cada tubo (ver a Tabela 2). Voltar a tapar cada um dos tubos e ressuspender os pellets colocando cada tubo no vórtex individualmente durante, pelo menos, 30 segundos na velocidade máxima. Se um pellet for difícil de ressuspender, agitar no vórtex durante mais 10–30 segundos ou até que o pellet flutue depois de se soltar do fundo do tubo. Se um pellet não se dissolver até 2 minutos depois de ter sido novamente colocado no vórtex (um total de 2 minutos no máximo), anotar a identificação da amostra e passar ao passo seguinte.
2. Colocar os tubos num suporte.
3. Colocar o suporte num banho-maria a 65 ± 2 °C durante 15 ± 2 minutos. Verificar se o nível da água é suficiente para cobrir todo o líquido nos tubos.
4. Retirar o suporte com as amostras do banho-maria e agitar as amostras, individualmente, durante 15-30 segundos.
Nota: Verificar se todos os pellets estão completamente ressuspensos nesta altura. As amostras que ainda tenham pellets visíveis não são aceitáveis para testar e devem ser descartadas.
5. Colocar novamente o suporte no banho-maria a 65 ± 2 °C e prosseguir a desnaturação durante mais 30 ± 3 minutos.
6. Avançar para o passo *Hibridização* ou consultar em *Ponto de paragem opcional* o processo de conservação e tratamento de amostras desnaturadas.

Procedimento do tubo multi-amostra (MST) Vortexer 2

Notas:

- O procedimento do MST Vortexer 2 está validado para o processamento de amostras em solução PreservCyt depois da centrifugação e decantação do sobrenadante.
 - O MST Vortexer 2 foi o único concebido para o processamento de amostras em solução PreservCyt.
 - O suporte e tampa de conversão foram especificamente concebidos para acomodar os tubos *digene* HC2 Sample Conversion (tubos cónicos de 15 ml VWR ou Corning). O utilizador só deve utilizar um tipo de tubo de cada vez no suporte de conversão. Outras marcas não estão validadas para utilização.
 - É necessário cumprir rigorosamente os tempos especificados de agitação do suporte e da tampa de conversão.
 - O suporte e tampa de conversão não podem ser usados para agitar os calibradores de teste ou controlos da qualidade do kit *digene* HC2 DNA. A altura dos tubos de STM impede a agitação adequada utilizando o suporte e a tampa de conversão.
1. Depois de secar cada tubo cónico de 15 ml rotulado, colocar cada um na sua posição correta no suporte de conversão.
 2. Adicionar o volume adequado de mistura STM/DNR a cada pellet (ver a Tabela 2).
 3. Cobrir os tubos cónicos de 15 ml com DuraSeal Tube Sealer Film colocando a película sobre os tubos do suporte.
 4. Colocar a tampa do suporte sobre os tubos cobertos com película e bloquear através dos dois grampos laterais. Cortar a película com o dispositivo de corte depois de a tampa estar bem fixa.
 5. Deslocar a alavanca de punho vermelho para cima de forma a ficar numa posição horizontal.

6. Posicionar o suporte e a tampa de conversão no MST Vortexer 2 de forma a que o maior canto dentado do suporte de conversão fique localizado no canto direito da frente. Posicionar o suporte e a tampa na plataforma do MST Vortexer 2 de forma a ficar firmemente encaixado nas guias. Prender o suporte posicionado deslocando a alavanca de punho vermelho para baixo para a posição vertical. Isto bloqueará o suporte na posição correta.
7. Verificar se a velocidade configurada no MST Vortexer 2 é 100 (velocidade máxima) e se o interruptor de báscula do gerador de impulsos está na posição de desligado.
8. Rodar o interruptor de alimentação do Vortexer para a posição ON (ligado). **Agitar os tubos no vórtex durante 30 segundos.**
9. Rodar o interruptor de alimentação do Vortexer para a posição OFF (desligado).
10. Retirar o suporte e a tampa do conversor do MST Vortexer 2 levantando a alavanca de punho vermelho.
11. Colocar o suporte num banho-maria a 65 ± 2 °C durante 15 ± 2 minutos. Assegurar que o nível de água cobre completamente todo o líquido em todos os tubos.
12. Passados 15 minutos de incubação, retirar o suporte com as amostras do banho-maria.
13. Para evitar salpicos, secar o excesso de água do suporte antes de o colocar no MST Vortexer 2.
14. Fixar o suporte e a tampa de conversão no MST Vortexer 2 conforme descrito no *Passo 6*.
15. Assegurar que a configuração da velocidade é 100 e rodar o interruptor de alimentação do Vortexer para a posição ON (ligado). **Agitar os tubos durante 1 minuto.**
16. Rodar o interruptor de alimentação do Vortexer para a posição OFF (desligado).
Nota: Este procedimento do MST Vortexer 2 normaliza a velocidade de mistura, os tempos e o processo, eliminando a necessidade de verificar visualmente os pellets de células, tal como é necessário ao utilizar o procedimento de ao ressuspender com um Procedimento do agitador tipo vórtex manual.
17. Colocar novamente o suporte num banho-maria a 65 ± 2 °C e prosseguir a desnaturação durante 30 ± 3 minutos.
18. Retirar o suporte do banho-maria, secá-lo e fixá-lo no Vortexer.
19. Rodar o interruptor de alimentação do Vortexer para a posição ON (ligado). **Agitar durante 10 segundos à velocidade máxima.**
20. Rodar o interruptor de alimentação do Vortexer para a posição OFF (desligado). Retirar o suporte.
21. Retirar imediatamente a tampa do suporte e o DuraSeal Tube Sealer Film das amostras.
22. Avançar para o passo *Hibridização* ou consultar em *Ponto de paragem opcional* o processo de conservação e tratamento de amostras desnaturadas.

Procedimento de preparação de amostras em SurePath (APENAS para testes do ADN de HPV de Alto Risco)

Após o processamento citológico, proceder da seguinte forma:

1. Assegurar que o volume de líquido observado equivale a 2,8 ml.

ATENÇÃO: Se o pellet de células residual parecer conter menos de 1 ml de fluido, é possível que o fluido conservante SurePath não tenha sido adicionado após a citologia e que a amostra NÃO seja adequada para testes de ADN do HPV de alto risco.

2. Garantir que as amostras estão equilibradas à temperatura ambiente.
3. Centrifugar a amostra num rotor de cabeça oscilante a 800 ± 15 x g durante 10 ± 1 minuto.
4. Retirar os tubos da centrífuga.
5. Com cuidado, decantar imediatamente o sobrenadante após a centrifugação e secar suavemente cada tubo (~3 vezes) sobre toalhas absorventes de papel para remover o líquido em excesso.

Observar o pellet em cada tubo. Não permitir que os pellets de células deslizem para baixo no tubo durante a secagem.

6. Colocar os tubos no suporte.
7. Adicionar 200 µl de STM a cada pellet utilizando uma pipeta de repetição ou ajustável.

Nota: Os tubos podem ser misturados sem tampa.

8. Ressuspender cada pellet através da agitação em vórtex de cada tubo individualmente durante 15 segundos a alta velocidade. Se o pellet for difícil de ressuspender, agitar no vórtex durante mais 5 a 30 segundos ou até que o pellet flutue depois de se soltar do fundo do tubo e parecer dissolver-se.
9. Pipetar 100 µl de reagente de desnaturação (com corante indicador) preparado a cada amostra utilizando um pipetador de repetição ou ajustável.

ATENÇÃO: Ter cuidado para não tocar nas partes laterais do tubo, pois pode ocorrer contaminação cruzada das amostras.

Aquando da eliminação do reagente de desnaturação restante, seguir os regulamentos locais, estaduais e federais aplicáveis relativamente à eliminação de substâncias corrosivas.

10. Misturar cada tubo minuciosamente por agitação individual no vórtex, a alta velocidade, durante 5 segundos.

Nota: Os tubos podem ser misturados sem tampa.

Rotular o tubo cônico de 15 ml com a identificação e tipo de amostra apropriado (por exemplo, "SP" para tipo de amostra SurePath) e colocá-lo num suporte.

Nota: Em caso de utilização do Rapid Capture System para processamento semiautomático do ensaio, os tubos cônicos de 15 ml VWR ou Corning devem ser utilizados para correta colocação no *digene* Conversion Rack (suporte prateado).

11. Transferir todo o volume do tubo para um tubo cônico de 15 ml com tampa de rosca, utilizando uma pipeta de ponta padrão de 7-ml ou equivalente¹.
12. Tapar os tubos cônicos de 15 ml.
13. Incubar num banho-maria a 65 ± 2 °C durante 90 ± 5 minutos.

ATENÇÃO: Este tempo de incubação é superior ao necessário para outros tipos de amostras aprovadas.

14. Se o teste ao HPV for realizado no mesmo dia, desnaturar os calibradores do teste *digene* HC2 DNA de acordo com estas instruções de utilização.
15. Retirar o suporte de amostra do banho-maria.

Ponto de paragem opcional

Depois da desnaturação, as amostras STM e as amostras em solução PreservCyt e SurePath convertidas podem ser armazenadas a uma temperatura de 2-8 °C de um dia para o outro ou a uma temperatura de -20°C durante até 3 meses. No caso de refrigeração de um dia para o outro, as amostras podem ser deixadas no suporte de conversão, substituindo a película DuraSeal e a tampa do suporte por novos. Antes do armazenamento a -20 °C, retirar a tampa do suporte e a película DuraSeal e colocar tampas adequadas nos tubos. Em qualquer caso, equilibrar as amostras à temperatura ambiente (20 - 25 °C) e agitar bem antes de avançar para o passo de hibridização.

Nota: Não armazenar nem enviar amostras desnaturadas em gelo seco.

Poderá ser realizado até um máximo de 3 ciclos de congelação/descongelação durante um período máximo de 2 horas à temperatura ambiente durante cada ciclo de descongelação.

¹ Nos testes de verificação da QIAGEN foram utilizados tubos cônicos da marca VWR de 15 ml

HIBRIDIZAÇÃO: MÉTODOS DE MISTURA DE SONDAS COMBINADAS (MSC) E DE DUAS SONDAS

Notas:

- As misturas de sondas de HPV são viscosas. Assegurar que a mistura de sondas é minuciosamente misturada e que é colocada a quantidade necessária em cada poço da microplaca. Consultar a secção de *Preparação e armazenamento dos reagentes*.
- Se a amostra desnaturada tiver sido armazenada a uma temperatura de -20°C , deixar a amostra descongelar a $20-25^{\circ}\text{C}$ e agitar bem antes de realizar a hibridização.
- Aquecer previamente o Microplate Heater I a $65 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante, pelo menos, 60 minutos, antes de utilizar. Consultar mais instruções no *Microplate Heater I Manual do Utilizador*, conforme necessário.

Método de hibridização utilizando placas de hibridização e Microplate Heater I

Nota: As amostras colhidas com o digene HC2 DNA Collection Device em STM e processadas utilizando o método do MST Vortexer 2 podem ser hibridizadas utilizando **apenas** o método Microplate Heater I.

1. Obter e rotular a microplaca de hibridização.
2. Retirar os calibradores, controlos de qualidade e as amostras do banho-maria após a incubação. Se o MST Vortexer 2 estiver a ser utilizado, agitar a totalidade do suporte de amostras STM durante, no mínimo, 5 segundos à velocidade máxima. No caso de amostras em solução PreservCyt ou SurePath, agitar todo o suporte de conversão durante um mínimo de 10 segundos à velocidade máxima. Alternativamente, agitar cada tubo individualmente durante, pelo menos, 5 segundos.
3. Pipetar $75\ \mu\text{l}$ de cada calibrador ou controlo ou amostra para o fundo de um poço de microplaca de hibridização de acordo com o esquema de placa em *Preparação*. Evitar tocar nas paredes dos poços e limitar a formação de bolhas de ar. Utilizar uma ponta de pipeta extra longa limpa para cada transferência, de forma a evitar a contaminação cruzada dos calibradores, controlos de qualidade ou das amostras. Não remover o dispositivo de recolha de amostras do tubo de transporte da amostra. As amostras desnaturadas podem ser tapadas com tampas de rosca para microtubos de colheita de amostras e armazenadas com os dispositivos de recolha de amostras que permanecem nos tubos. As amostras PreservCyt desnaturadas podem ser tapadas novamente com as suas tampas originais.

Nota: Podem verificar-se resultados falso-positivos se as alíquotas das amostras não forem cuidadosamente transferidas. Durante a transferência da amostra, não tocar com a ponta da pipeta na parte interior do tubo ao remover $75\ \mu\text{l}$ de alíquota.

4. Depois de transferir a última amostra, cobrir a placa com uma tampa e **incubar a microplaca de hibridização durante 10 minutos a uma temperatura de $20-25^{\circ}\text{C}$** .
5. Deitar as alíquotas da mistura de sondas preparada e cuidadosamente agitada num reservatório de reagente descartável. Com cuidado, pipetar $25\ \mu\text{l}$ da mistura de sondas para cada poço contendo calibradores, controlos de qualidade e amostras, utilizando um pipetador de 8 canais e pontas novas para cada linha. Adicionar o volume da sonda a cada poço de hibridização, evitando que salpique. Evitar tocar nas paredes dos poços. Colocar a tampa da placa sobre a microplaca durante o período de incubação para desnaturação.
6. Cobrir a microplaca de hibridização com uma tampa de placa e agitar durante 3 ± 2 minutos no conjunto Hybrid Capture System Rotary Shaker I a 1100 ± 100 rpm. *Os calibradores, controlos de qualidade e as amostras devem adquirir uma cor amarela depois de agitados*. Os poços que permanecem púrpura podem não ter recebido a quantidade adequada de mistura de sondas. Adicionar mais $25\ \mu\text{l}$ de mistura de sondas às amostras que permaneceram púrpura e voltar a agitar. Se os poços se mantiverem púrpura depois deste procedimento, testar novamente as amostras.

Notas:

- Depois de agitar, as amostras em solução PreservCyt devem apresentar uma cor rosa em vez de amarela.
 - Ao colocar a microplaca de hibridização no Microplate Heater I, assegurar que não salpica.
7. Incubar num Microplate Heater I previamente aquecido e estabilizado a uma temperatura de 65 ± 2 °C durante 60 ± 5 minutos.

Método de hibridização utilizando microtubos e banho-maria**Notas:**

- O processamento de amostras colhidas com o digene HC2 DNA Collection Device em STM e utilizando o método do MST Vortexer 2 para a mistura e o método de banho-maria para a hibridização **não foi validado**. As amostras colhidas com o *digene* HC2 DNA Collection Device em STM e processadas utilizando o método do MST Vortexer 2 podem ser hibridizadas utilizando **apenas** o método Microplate Heater I.
 - Se a amostra desnaturada tiver sido armazenada a uma temperatura de -20 °C, deixar a amostra descongelar a $20-25$ °C e agitar bem antes de realizar a hibridização.
1. Rotular e colocar o número necessário de microtubos de hibridização limpos no suporte de microtubos.
 2. Retirar os calibradores, controlos de qualidade e as amostras do banho-maria após a incubação. Agitar cada um dos tubos individualmente durante, pelo menos, 5 segundos, imediatamente antes de remover as alíquotas.
 3. Pipetar 75 µl de cada calibrador ou controlo ou amostra para o **fundo** de um microtubo de hibridização vazio de acordo com o esquema de placa em Preparação. Evitar tocar nas paredes dos microtubos e limitar a formação de bolhas de ar. Utilizar uma ponta de pipeta extra longa limpa para cada transferência, de forma a evitar a contaminação cruzada dos calibradores, controlos de qualidade ou das amostras. Não é necessário remover o dispositivo de recolha de amostras do tubo de transporte da amostra. As amostras desnaturadas podem ser tapadas com tampas de rosca para microtubos de colheita de amostras e armazenadas com os dispositivos de recolha de amostras que permanecem nos tubos.
- Nota:** Podem verificar-se resultados falso-positivos se as alíquotas das amostras não forem cuidadosamente transferidas. Durante a transferência da amostra, não tocar com a ponta da pipeta na parte interior do tubo ao remover 75 µl de alíquota.
4. Depois de transferir a última amostra, **incubar os microtubos de hibridização durante 10 minutos a uma temperatura de $20-25$ °C**.
 5. Deitar as alíquotas da mistura de sondas preparada e cuidadosamente agitada num reservatório de reagente descartável. Com cuidado, pipetar 25 µl da mistura de sondas para cada microtubo contendo calibradores, controlos de qualidade e amostras, utilizando um pipetador de 8 canais e pontas novas para cada linha. Adicionar o volume da sonda a cada microtubo de hibridização, evitando que salpique. Evitar tocar nas paredes dos tubos. Inspeccionar a parte inferior do suporte para assegurar que todos os tubos receberam a quantidade adequada de mistura de sondas.
 6. Cobrir os microtubos com um vedante de placas. Tapar o suporte com a respetiva tampa. Agitar o suporte de microtubos no conjunto Rotary Shaker I 1100 ± 100 rpm durante 3 ± 2 minutos. *Os calibradores, controlos de qualidade e as amostras devem adquirir uma cor amarela depois de agitados*. Os tubos que permanecem púrpura podem não ter recebido a quantidade adequada de mistura de sondas. Adicionar mais 25 µl de mistura de sondas às amostras que permaneceram púrpura e voltar a agitar. Se os tubos se mantiverem púrpura depois deste procedimento, testar novamente as amostras.

Nota: Depois de agitar, as amostras em solução PreservCyt devem apresentar uma cor rosa em vez de amarela.

7. Incubar num banho-maria a 65 ± 2 °C durante 60 ± 5 minutos. Assegurar que o nível de água no banho-maria é suficiente para cobrir todo o volume da mistura de hibridização. O suporte de microtubos flutuará no banho-maria.

Nota: Criar um ficheiro com o esquema de placas utilizando o software de análise do ensaio *digene*, caso ainda não tenha sido feito.

CAPTURA HÍBRIDA

1. Retirar todos os poços da microplaca de captura à exceção dos necessários da estrutura da placa. Voltar a colocar os poços da microplaca não utilizados na embalagem original e voltar a selar. Com um marcador, numerar cada coluna 1, 2, 3. . . . Rotular a microplaca com um identificador adequado. As amostras serão adicionadas aos poços de acordo com o esquema de exemplo preparado na secção Preparação.
2. Cuidadosamente, retirar a microplaca de hibridização que contém os calibradores, os controlos e as amostras do Microplate Heater I. Remover imediatamente a tampa da placa e colocá-la sobre uma superfície limpa. Alternativamente, retirar o suporte de microtubos do banho-maria. Retirar imediatamente a tampa do suporte e, lentamente, puxar o vedante de placas para cima e ao longo de toda a extensão do suporte.
3. Transferir todo o conteúdo (aproximadamente 100 µl) dos calibradores, dos controlos de qualidade e das amostras dos poços ou dos microtubos da microplaca de hibridização para o fundo do poço correspondente da microplaca de captura, utilizando um pipetador de 8 canais. Utilizar novas pontas de pipeta no pipetador de 8 canais para cada transferência e permitir que cada ponta de pipeta drene para garantir de que ocorre uma transferência completa da amostra. Se desejado, o pipetador pode ser apoiado, colocando o **centro** das pontas das pipetas no rebordo superior dos poços da microplaca de captura (ver a *figura 1*).

FIGURA 1: PIPETAGEM CORRETA



4. Cobrir a microplaca de captura com a tampa ou o vedante de placas e agitar no Rotary Shaker I a 1100 ± 100 rpm, a uma temperatura de 20-25 °C durante 60 ± 5 minutos.
5. Preparar tampão de lavagem e verificar os reservatórios de enxaguamento e de resíduos do Automated Plate Washer durante esta incubação. Consultar a secção de Preparação e armazenamento dos reagentes.
6. Quando o procedimento de captura estiver concluído, retirar a microplaca de captura do Rotary Shaker I e, cuidadosamente, remover a tampa ou o vedante de placas. Retirar o líquido dos poços, deitando-o para um lavatório; inverter completamente a placa sobre o lavatório e agitar com força para baixo, tendo cuidado para não salpicar, o que acontece quando esta operação é realizada demasiado perto do fundo do lavatório. Não inverter placa: secar batendo firmemente 2-3 vezes sobre papel absorvente Kimtowels ou toalhas de papel sem felpe equivalentes. Assegurar que todo o líquido é removido dos poços e que o topo da placa está seco.

DETEÇÃO HÍBRIDA

Notas:

- Adicionar ao longo da placa e da esquerda para a direita utilizando o pipetador de 8 canais. Recomenda-se a utilização da técnica de pipetagem inversa para melhorar a uniformidade da distribuição de reagente. Com esta técnica, as pontas das pipetas são inicialmente cheias ao máximo, usando a segunda paragem no controlo (êmbolo) de aspiração/esvaziamento do pipetador. Consultar o procedimento em baixo. Limpar as pontas no reservatório de reagente descartável para remover o excesso de reagente antes de o transferir para a placa.
 - Se pretendido, o pipetador pode ser apoiado, colocando o centro das pontas das pipetas no rebordo superior dos poços da microplaca. Ter cuidado para não tocar nas partes dos poços da microplaca, pois pode ocorrer contaminação cruzada das amostras. Consultar a figura 1 em cima.
1. Transferir uma alíquota com o volume adequado de reagente de deteção 1 para um reservatório de reagente descartável (consultar a secção *Preparação e armazenamento dos reagentes* para mais instruções). Cuidadosamente, pipetar 75 µl de reagente de deteção 1 para cada poço da microplaca de captura, utilizando um pipetador de 8 canais e a técnica de pipetagem inversa.

Procedimento de pipetagem inversa:

- a) Fixar pontas num pipetador de 8 canais; assegurar que todas as pontas estão firmemente encaixadas.
 - b) Empurrar o êmbolo do pipetador além do primeiro ponto de paragem até ao segundo ponto de paragem.
 - c) Mergulhar as pontas na solução reagente de deteção 1.
 - d) Libertar o êmbolo lentamente e permitir que a solução encha as pontas.
 - e) Colocar o reagente nos poços da microplaca (75 µl) premindo o êmbolo até ao primeiro ponto de paragem. Não soltar o êmbolo até que as pontas das pipetas tenham voltado a ser introduzidas na solução de reagente de deteção 1.
 - f) Voltar a encher as pontas e repetir até todos os poços estarem cheios. Encher os poços da microplaca da esquerda para a direita. Assegurar que todos os poços foram cheios observando a intensidade da cor rosa. Todos os poços devem apresentar uma intensidade idêntica.
2. Cobrir as placas com a respetiva tampa ou Parafilm limpo (ou equivalente) e incubar a uma temperatura de 20-25 °C durante 30-45 minutos.

LAVAGEM

Lavar a placa de captura utilizando um dos dois métodos que se seguem.

Método do Automated Plate Washer

Nota: Manter sempre o Automated Plate Washer em **ON** (Ligado). Assegurar que o reservatório de enxaguamento está cheio e que o reservatório de resíduos está vazio. O Automated Plate Washer irá enxaguar regularmente o sistema para limpeza. Consultar mais instruções no Automated Plate Washer Manual do Utilizador, conforme necessário.

ANTES DE CADA UTILIZAÇÃO:

- Assegurar que o reservatório de lavagem está cheio, pelo menos, até à marca de 1 litro com solução de tampão de lavagem. Caso contrário, preparar a solução de tampão de lavagem. Consultar a secção de Preparação e armazenamento dos reagentes.
- Assegurar que o reservatório de enxaguamento está cheio de água desionizada ou destilada.
- Assegurar que o reservatório de resíduos está vazio e que a tampa está firmemente apertada. O Automated Plate Washer irá preparar-se automaticamente antes de cada lavagem e enxaguar após cada lavagem.

1. Remover a tampa da placa e colocar a placa na plataforma do Automated Plate Washer.
2. Assegurar que a alimentação está ligada e que o visor apresenta a indicação “Digene Wash Ready” (lavagem Digene pronta) ou “P1”.
Nota: Se apenas for utilizada uma tira parcial dos poços de captura, os poços vazios das microplacas terão de ser colocados na placa de captura para completar a coluna antes da lavagem.
3. Selecionar o número de tiras a lavar, premindo a tecla “Rows” e depois “+” ou “-” para regular. Premir a tecla “Rows” para regressar a “Digene Wash Ready” ou “P1”.
4. Premir “Start/Stop” (iniciar/parar) para começar.
5. O lavador necessita de realizar seis ciclos de enchimento e aspiração, o que demora aproximadamente 10 minutos. Durante o programa, verifica-se uma breve pausa, pelo que é necessário assegurar que a placa não é retirada prematuramente. Quando o Automated Plate Washer terminar a lavagem, surgirá a indicação “Digene Wash Ready” ou “P1”.
6. Retirar a microplaca do lavador quando o programa terminar. A placa deve estar branca, não devendo existir qualquer líquido residual cor de rosa nos poços da microplaca.

Método de lavagem manual

1. Retirar o reagente de deteção 1 dos poços, colocando papel absorvente Kimtowels ou toalhas de papel sem felpe equivalentes sobre a placa e invertendo cuidadosamente. Antes de inverter, certificar-se de que o papel fica em contacto com toda a área da superfície da placa. Deixar a placa escorrer durante 1-2 minutos. Secar bem com papel absorvente Kimtowels ou toalhas de papel sem felpe equivalentes. Cuidadosamente, descartar as toalhas de papel usadas para evitar a contaminação dos últimos procedimentos por fosfatase alcalina.
2. Utilizando o aparelho de lavagem, lavar a placa manualmente 6 vezes. Cada poço é lavado até transbordar para remover o reagente de deteção 1 da parte superior dos poços. A lavagem é iniciada no poço A1 e continua em ziguezague para a direita e para baixo. Depois do enchimento de todos os poços, decantar o líquido para o lavatório com um forte movimento descendente. A segunda lavagem inicia-se no poço H12 com um movimento de ziguezague para a esquerda e para cima. Esta sequência de 2 lavagens repete-se mais 2 vezes, num total de 6 lavagens por poço.
3. Depois da lavagem, secar a placa invertendo-a sobre papel absorvente Kimtowels ou toalhas de papel sem felpe equivalentes e batendo com a mesma firmemente 3-4 vezes. Substituir as toalhas de papel e secar novamente. Deixar a placa invertida a escorrer durante 5 minutos. Secar a placa mais uma vez.
4. A placa deve estar branca, não devendo existir qualquer líquido residual cor de rosa nos poços da microplaca.

AMPLIFICAÇÃO DO SINAL

NOTAS:

- Usar um par de luvas novo para manusear o reagente de deteção 2.
- Transferir uma alíquota de **apenas** a quantidade de reagente necessária para realizar o ensaio no reservatório de reagente descartável, de modo a evitar a contaminação do reagente de deteção 2. Consultar a secção de Preparação dos reagentes. Não voltar a colocar o reagente de deteção 2 no frasco original. **Descartar todo o material que não tenha sido utilizado.**
- A adição do reagente de deteção 2 deve ser feita sem interrupção. O tempo de incubação de todos os poços deve ser o mais próximo possível.
- Assegurar que não se toca nas partes laterais dos poços da microplaca e que o reagente não salpica para as pontas pois poderá ocorrer contaminação cruzada das amostras (consultar a *Figura 1*).

1. Cuidadosamente, pipetar 75 µl de reagente de detecção 2 para cada poço da microplaca de captura, utilizando um pipetador de 8 canais conforme anteriormente descrito. *Todos os poços da microplaca devem adquirir uma cor amarela.* Assegurar que todos os poços foram cheios observando a intensidade da cor. Todos os poços devem apresentar uma intensidade idêntica.
2. Cobrir as microplacas com a respectiva tampa ou Parafilm limpo (ou equivalente) e incubar a uma temperatura de 20-25 °C durante 15 minutos. Evitar a luz direta do sol.
3. Ler a microplaca no instrumento DML após 15 minutos de incubação (e não mais do que 30 minutos de incubação).
4. O protocolo do software específico do ensaio irá permitir a introdução de informações pertinentes ao ensaio diretamente no software.
5. Se não tiver sido utilizada uma microplaca completa, remover os poços da microplaca usados do suporte da microplaca, enxaguar bem o suporte com água destilada ou desionizada, secar e reservar para o ensaio seguinte.

CRITÉRIOS DE VERIFICAÇÃO DA CALIBRAÇÃO DO ENSAIO

A verificação da calibração do ensaio é realizada para assegurar que os reagentes e materiais do calibrador e de controlo de qualidade fornecidos estão a funcionar corretamente, permitindo determinar com precisão o valor de corte do ensaio. O teste *digene* HC2 HPV DNA requer a calibração com cada ensaio; por isso, é necessário verificar cada ensaio utilizando os critérios a seguir apresentados. Este procedimento de verificação não serve como um substituto para a realização de testes de controlo interno da qualidade. Os protocolos de ensaio do software de análise do ensaio *digene* verificam automaticamente os critérios abaixo.

1. Calibrador negativo

O calibrador negativo tem de ser testado em triplicado com cada ensaio. Para que se possa prosseguir, a média do calibrador negativo tem de ser entre ≥ 10 e ≤ 250 URL. Os resultados do calibrador negativo devem apresentar um coeficiente de variação (%CV) de $\leq 25\%$. Se %CV for $> 25\%$, eliminar o valor com o valor de URL mais afastado da média, como valor atípico, e voltar a calcular a média utilizando os dois valores restantes. Se a diferença entre a média e cada um dos dois valores for $\leq 25\%$, avançar para o passo 2. Caso contrário, a calibração do ensaio é inválida e o ensaio tem de ser repetido para todas as amostras de doentes. Da mesma forma, os resultados das amostras de doentes não devem ser registados.

2. Calibradores

O(s) calibrador(es) tem(têm) de ser testado(s) em triplicado para cada ensaio. Para o MSC, os dois calibradores têm de ser testados em triplicado. Os resultados do calibrador devem apresentar um coeficiente de variação (%CV) de $\leq 15\%$. Para o MSC, o %CV do LRC, HRC e do LRC-HRC combinado tem de apresentar um %CV $\leq 15\%$. Se o %CV for > 15 , eliminar o valor do calibrador com o valor de URL mais afastado da média, como valor atípico, e voltar a calcular a média utilizando os valores restantes do calibrador. Somente 1 réplica LRC e 1 HRC podem ser apagadas. Se o %CV dos calibradores for $\leq 15\%$, avançar para o passo 3. Caso contrário, a calibração do ensaio é inválida e o ensaio tem de ser repetido para todas as amostras de doentes. Da mesma forma, os resultados das amostras de doentes não devem ser registados.

A verificação da calibração do ensaio descrita acima para os calibradores é automaticamente efetuada pelo software de análise do ensaio *digene* e impressa no relatório de análise de dados. **Os protocolos de análise do ensaio *digene* para o HPV verificam automaticamente que o %CV dos calibradores de HPV de alto e baixo risco é $\leq 15\%$.** No entanto, as versões v1.0.2 e v1.0.3 do software de análise do ensaio *digene* NÃO irá invalidar o ensaio a menos que o %CV seja $>25\%$ para os calibradores. Por consequência, o utilizador tem de verificar manualmente que o %CV calculado pelo software de análise do ensaio *digene* é $\leq 15\%$ e avançar, tal como indicado, para a Situação 1 na tabela abaixo. Se o %CV das réplicas do calibrador se situar entre 15 e 25, consultar as instruções para as Situações 2 ou 3 na tabela em baixo e avançar conforme indicado em “Ação do utilizador”.

Situação	%CV registado para as réplicas LRC e/ou HRC	Ação desempenhada pelo software de análise do ensaio <i>digene</i>	Ação do utilizador
1	≤ 15%	Ensaio considerado "Válido"	Os resultados podem ser registados; não é necessária qualquer outra ação.
2	Entre 15% e 25%	Não se removem valores atípicos e o ensaio é considerado "Válido"	Retirar o valor de URL do calibrador mais afastado da média. Voltar a calcular o %CV do calibrador com os dois valores restantes. Se o %CV dos valores restantes de URL for > 15%, o ensaio é inválido. Os resultados não podem ser registados. Se o %CV dos restantes valores URL for ≤ 15%, voltar a calcular o valor de corte do ensaio e depois calcular novamente o quociente de URL/corte para cada amostra, utilizando o valor de corte calculado. Estes valores calculados de novo podem ser registados.
3	Entre 15% e 25%	Foi removido um valor atípico e o ensaio é considerado "Válido"	O ensaio é inválido. Os resultados não podem ser registados. O ensaio tem de ser repetido.
4	> 25%	Foi removido um valor atípico e o ensaio é considerado "Inválido"	O ensaio é inválido. Os resultados não podem ser registados. O ensaio tem de ser repetido.

Para calcular manualmente o %CV, como é necessário na Situação 2 acima, o utilizador deve dividir o desvio padrão (STDEV) (n-1) dos restantes valores de URL das réplicas pela média dos restantes valores de URL das réplicas (LRC ou HRC ou ambos) e multiplicar esse resultado por 100.

Para calcular o %CV utilizando o Microsoft[®] Excel[®] (fornecido com a versão anterior do software de análise do ensaio *digene*), o utilizador pode calcular o desvio padrão das réplicas do calibrador utilizando a fórmula STDEV e determinar a URL média do calibrador utilizando a fórmula AVERAGE. Uma vez obtidos estes dois valores, dividir o STDEV pela AVERAGE e multiplicar o resultado por 100 para obter o %CV.

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

Em caso de dúvidas relacionadas com o cálculo dos %CV, recálculo do valor de corte do ensaio ou do valor de URL/de corte das amostras, contactar o representante local da QIAGEN.

Para determinar a reprodutibilidade do calibrador e estimar a frequência com que os recálculos manuais são necessários, foram compilados os resultados de três avaliações clínicas envolvendo 152 execuções de ensaio realizados com o teste *digene* HC2 HPV DNA. Os resultados demonstraram que o %CV médio para estas 152 execuções foi de 8,1. Tendo em conta todas as três réplicas do calibrador por execução do teste, foi observada uma reprodutibilidade do calibrador > 15% CV em apenas 17 das 152 execuções (11,2%), apresentando 10 destas 17 execuções de teste um %CV entre 15-25 (Situação 2). Nas 17 execuções de teste que apresentaram um %CV > 15, foi removido um valor atípico e o %CV novamente calculado. De acordo com a ação do utilizador para a situação 2, somente um dos %CV das execuções de teste se manteve > 15, invalidando a execução do teste. Os %CV das restantes 151 execuções de teste apresentaram um %CV médio de 6,0.

- Os resultados da média do calibrador (LRC ou HRC) e a média do calibrador negativo (NC) são utilizados no cálculo do quociente LRC/NC ou HRC/NC para cada sonda. As versões anteriores (V1.0.2 e V1.0.3) dos protocolos do software de análise do ensaio *digene* não calculam corretamente os intervalos aceitáveis. Estes quocientes têm de cumprir os seguintes critérios para verificar a calibração dos ensaios antes de se poder interpretar os resultados das amostras:

MÉTODOS MSC	MÉTODOS DE DUAS SONDAS
Verificação da calibração do ensaio Intervalos aceitáveis	Verificação da calibração do ensaio Intervalos aceitáveis
$2,0 \leq LRC\bar{x} / NC\bar{x} \leq 15$	$2,0 \leq LRC\bar{x} / NCLR\bar{x} \leq 15$ (lado LR)
$2,0 \leq HRC\bar{x} / NC\bar{x} \leq 15$	$2,0 \leq HRC\bar{x} / NCHR\bar{x} \leq 15$ (lado HR)
$2,0 \leq (LRC \text{ e } HRC) \bar{x} / NC\bar{x} \leq 15$	

4. Calcular os quocientes $LRC\bar{x}/NC\bar{x}$ ou $HRC\bar{x}/NC\bar{x}$ adequados a cada um dos conjuntos de sondas. Se os quocientes forem $\geq 2,0$ e ≤ 15 , avançar para o passo seguinte. Se algum dos quocientes for $<2,0$ ou > 15 , **o ensaio é inválido para essa sonda específica e tem de ser repetido**. Repetir todas as amostras de doentes dessa execução.

Nota: Os intervalos aceitáveis para o calibrador negativo e calibrador positivo foram estabelecidos apenas para instrumentos DML.

CÁLCULO DE CORTE

Depois de o ensaio ter sido validado de acordo com os critérios acima referidos, os valores de corte para a determinação das amostras positivas são calculados da seguinte forma:

1) Método da mistura de sondas combinadas: $\frac{(\text{réplicas LRC} + \text{réplicas HRC})}{\text{n.º de réplicas}}$

2) Método de duas sondas: Valor de corte da sonda de HPV de baixo risco = $\text{LRC}\bar{x}$
 Valor de corte da sonda de HPV de alto risco = $\text{HRC}\bar{x}$

Exemplo do cálculo dos valores de corte					
Para:		Sonda de HPV de baixo risco ou de alto risco Método de duas sondas	Método MSC com sonda de HPV de baixo risco	Sonda de HPV de alto risco Método MSC	Sonda combinada de HPV Método MSC
	Valores de URL de NC	Valores de URL para LRC ou HRC	Valores de URL para LRC	Valores de URL para HRC	Valores de URL para LRC e HRC
	97	312	330	235*	330
	101	335	305	295	305
	91	307	385	279	385
					295
					235*
					279
Valor médio de URL	96	318	340	287*	318,8*
%CV	4,9	4,7	12,0	3,9*	13,0
$\text{LRC}\bar{x}/\text{NC}\bar{x}$	N/A	3,31	3,54	3,00	3,32

O valor médio de URL para o calibrador positivo determina o valor de corte do ensaio. Por conseguinte, o valor de corte positivo é $(\text{LRC}\bar{x}) = 318$.

* A média de %CV das 6 réplicas foi 16,8. A réplica com um valor de 235 foi eliminada como valor atípico. O %CV das restantes réplicas foi de 13,0 com uma média de 318,8. O %CV inicial de HRC foi de 11,5.

Os valores de URL para todas as amostras devem ser convertidos num quociente para o valor de corte adequado. Por exemplo, todos os ensaios testados com a sonda de HPV de baixo risco devem ser representados sob a forma de URL amostra/valor de corte de baixo risco. O mesmo pode ser efetuado com amostras testadas com a sonda de HPV de alto risco ou com a sonda MSC.

Notas: Os valores URL/VC e os resultados positivos/negativos para todas as amostras são registados no *relatório de análise de dados* do instrumento DML.

Para a aplicação do instrumento Rapid Capture System, o protocolo do software RCS HPV foi programado para aplicar um fator de ajuste da calibração (*Calibration Adjustment Factor, CAF*) de 0,8 ao valor URL médio das réplicas válidas do calibrador positivo. Este CAF é necessário para que as características de desempenho do ensaio se mantenham equivalentes ao procedimento manual de teste. Esta alteração apenas se aplica a ensaios realizados utilizando a aplicação do instrumento do Rapid Capture System. Por conseguinte, é fundamental selecionar o protocolo de software correto para utilizar com cada método específico de teste, de modo a obter resultados de teste precisos. Os valores de URL para todas as amostras devem ser convertidos num quociente para o valor de corte (VC) adequado. Por exemplo, todos os ensaios devem ser representados sob a forma de amostra URL/VC.

CONTROLO DE QUALIDADE

As amostras de controlo de qualidade são fornecidas com o teste *digene* HC2 HPV DNA. Consultar o manual do utilizador adequado para obter instruções sobre a introdução dos números de lote e das datas de validade dos controlos de qualidade. Estes controlos de qualidade têm de ser incluídos em cada execução do teste e os valores de URL/VC de cada controlo têm de cumprir os seguintes intervalos aceitáveis para que uma execução possa ser considerada válida. **Se os controlos de qualidade não estiverem dentro destes intervalos, o ensaio é inválido e o teste deve ser repetido.** Da mesma forma, nenhum resultado de doente deve ser registado no caso de execuções inválidas.

Controlo Controlo	Tipo de HPV	Resultado esperado (URL/Valor de corte) Sonda de HPV de baixo risco			
		Mínimo	Máximo	Média	%CV
QC1-LR	Baixo risco (HPV 6)	2	8	5,0	25
QC2-HR	Alto risco (HPV 16)	0,001	0,999	0,5	25

Controlo Controlo	Tipo de HPV	Resultado esperado (URL/Valor de corte) Sonda de HPV de alto risco			
		Mínimo	Máximo	Média	%CV
QC1-LR	Baixo risco (HPV 6)	0,001	0,999	0,5	25
QC2-HR	Alto risco (HPV 16)	2	8	5,0	25

Controlo Controlo	Tipo de HPV	Resultado esperado (URL/Valor de corte) Sonda de MSC do HPV			
		Mínimo	Máximo	Média	%CV
QC1-LR	Baixo risco (HPV 6)	2	8	5,0	25
QC2-HR	Alto risco (HPV 16)	2	8	5,0	25

1. Os materiais de controlo de qualidade fornecidos no kit são alvos de ADN do HPV clonado e não são derivados de um tipo de HPV atípico. Trata-se do mesmo tipo de material utilizado para os calibradores fornecidos com o teste *digene* HC2 HPV DNA.
2. Este material de controlo de qualidade não funcionará como um controlo adequado para o processamento de solução PreservCyt ou fluido conservante SurePath.
3. Os controlos de qualidade fornecidos com este kit de teste têm de ser utilizados para controlo de qualidade interno. Controlos de qualidade adicionais podem ser testados em conformidade com as orientações ou regulamentos locais e/ou nacionais ou de organizações reconhecidas.

INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS DE AMOSTRAS

Nota: O valor de corte do teste *digene* HC2 HPV DNA de 1 pg/ml é equivalente a 100 000 cópias de HPV/ml ou 5000 cópias de HPV por ensaio.

1. As amostras em STM com quocientes URL/valor de corte $\geq 1,0$ **apenas com a sonda de HPV de baixo risco** são consideradas “Positivas” para 1 ou mais dos tipos de HPV 6, 11, 42, 43 ou 44.
2. As amostras em STM com quocientes URL/valor de corte $\geq 1,0$ **apenas com a sonda de HPV de alto risco** são consideradas “Positivas” para 1 ou mais dos tipos de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ou 68.
3. Ao testar amostras PreservCyt, se o quociente URL/VC de uma amostra for $\geq 1,0$ e $< 2,5$ URL/VC, a amostra terá de ser novamente testada. Se o novo teste inicial for positivo ($\geq 1,0$ URL/VC), a amostra pode ser registada como positiva, não sendo necessário realizar quaisquer testes adicionais. No entanto, se o primeiro resultado obtido ao realizar novo teste for negativo ($< 1,0$), terá de ser realizado um segundo novo teste (terceiro resultado) para gerar um resultado final. O resultado do segundo novo teste é considerado como o resultado final e deve ser registado.
4. Se o quociente URL/corte de uma amostra estiver próximo mas for inferior a 1,0 e se suspeitar de infeção por HPV de alto risco, considerar métodos de teste alternativos e/ou repetir a amostra.
5. As amostras em STM com quocientes URL/valor de corte $\geq 1,0$ com a sonda de HPV de baixo risco e a sonda de HPV de alto risco são consideradas “Positivas” para 1 ou mais tipos de HPV de cada grupo de sondas.
6. As amostras em STM com quocientes de URL/valor de corte $\geq 1,0$ com a mistura de sondas combinadas são consideradas “Positivas” para 1 ou mais dos tipos de HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68.
7. As amostras com quocientes URL/valor de corte $< 1,0$ com a mistura de sondas combinadas ou com a sonda de HPV de baixo risco e a sonda de HPV de alto risco são consideradas “negativas” ou “sem deteção de ADN do HPV” para os 18 tipos de HPV testados. As sequências de ADN do HPV estão ausentes ou os níveis de ADN do HPV são inferiores ao limite de deteção do ensaio.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

DADOS QUE APOIAM A INDICAÇÃO DE HPV DE BAIXO RISCO E DE ALTO RISCO

Rastreo clínico de doentes com resultados ASC-US na amostra citológica para determinar a necessidade de encaminhamento para colposcopia

Em 1996, foi realizado um estudo intitulado "Utility of HPV DNA Testing for Triage of Women with Borderline Pap Smears" (utilidade do teste de ADN do HPV para triagem de mulheres com amostras citológicas no limite") nos EUA sob a direção do Kaiser Foundation Research Institute (instituto de pesquisa da função Kaiser) e do Kaiser Permanente Medical Group (grupo médico Kaiser Permanente). As amostras cervicais para citologia de rotina e para a realização do teste *digene* HC2 HPV DNA foram obtidas de mulheres que frequentavam diversas instalações da clínica Kaiser. As amostras citológicas iniciais foram avaliadas de acordo com a classificação Bethesda. Para mais informações sobre a terminologia equivalente de rastreo do cancro do colo do útero na Comunidade Europeia, consultar as orientações europeias relativas à garantia de qualidade do rastreo do cancro do colo do útero⁴⁰. As mulheres (com idade igual ou superior a 15 anos) com resultados ASC-US (células atípicas de significado indeterminado) nas amostras citológicas foram novamente consultadas para a realização de colposcopia e biopsia. As amostras histológicas encaminhadas para colposcopia foram examinadas por patologias que efetuaram um diagnóstico inicial. Cada amostra histológica foi também observada por um patologista independente, tendo as discrepâncias entre o relatório inicial e o independente sido solucionadas por um terceiro patologista.

Os testes ao ADN do HPV foram realizados na amostra inicial, tendo apenas sido utilizada a sonda de HPV de alto risco. A amostra inicial foi testada com um protótipo do teste *digene* HC2 HPV DNA que continha sondas para 11 dos 13 tipos de HPV incluídos na sonda de HPV de alto risco, mas exclui os tipos de HPV 59 e 68. Não se esperava que esta diferença resultasse em perfis de desempenho consideravelmente diferentes para os dois ensaios.

Estavam disponíveis resultados do teste ao HPV e diagnósticos histológicos de 885 mulheres com amostras citológicas ASC-US. Os testes, para a maioria das doentes, foram realizados com amostras colhidas em STM e solução PreservCyt. Devido às semelhanças entre as características de desempenho do teste *digene* HC2 HPV DNA para meio de transporte de amostras e para a solução PreservCyt, o desempenho do ensaio é apresentado apenas para solução PreservCyt.

A tabela 3 mostra que entre as que apresentaram indicação de citologia ASC-US, o valor preditivo negativo do teste *digene* HC2 HPV DNA para uma HSIL ou doença mais grave na colposcopia é 99%.

Tabela 3
Comparação do teste *digene* HC2 HPV DNA versus histologia de consenso
População encaminhada devido a amostra citológica ASC-US
Estudo Kaiser, amostras em solução PreservCyt

	HSIL ou mais grave no momento da colposcopia			Total
		+	-	
HPV de alto risco	+	66	317	383
	-	5	497	502
	Total	71	814	885

Sensibilidade [TP/(TP+FN)] = 93,0% (66/71)
IC de 95% = 84,3 a 97,7
Especificidade [TN/(TN+FP)] = 61,1% (497/814)
IC de 95% = 57,7 a 64,4
Prevalência da doença = 8,0% (71/885)
Valor preditivo positivo do ensaio = 17,2% (66/383)
Valor preditivo negativo do ensaio = 99,0% (497/502)

A tabela 4 mostra os valores preditivos positivo e negativo com base nas diversas prevalências para um ASC-US inicial que venha a confirmar-se ser uma HSIL ou mais grave, baseado nos resultados da sonda de HPV de alto risco.

Tabela 4
Valor teórico preditivo positivo e negativo
Sonda de HPV de alto risco
Resultados ASC-US da amostra citológica

Prevalência teórica de HSIL	Resultado inicial ASC-US da amostra citológica	
	Valor preditivo positivo do ensaio	Valor preditivo negativo do ensaio
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

A tabela 5 ilustra a variação entre os diferentes grupos etários envolvidos neste estudo:

Tabela 5
Dados do estudo Kaiser
Desempenho do teste *digene* HC2 High-Risk HPV DNA versus histologia de consenso
Resultados (HSIL)
Características específicas da idade

	Idade <30	Idade 30–39	Idade >39
n	287	233	365
Prevalência da doença (%)	12,2	11,2	2,7
Sensibilidade (%)	100,00 (35/35)	88,46 (23/26)	80,00 (8/10)
Intervalo de confiança de 95%	90,0-100	69,9-97,6	44,4-97,5
Especificidade (%)	31,4 (79/252)	66,2 (137/207)	79,15 (281/355)
Intervalo de confiança de 95%	25,7-37,5	59,3-72,6	74,6-83,3
Valor preditivo negativo (%)	100 (79/79)	97,86 (137/140)	99,29 (281/283)
Valor preditivo positivo (%)	16,83 (35/208)	24,73 (23/93)	9,76 (8/82)

Sensibilidade e especificidade clínicas para a determinação do risco de doença de alto grau em mulheres com amostras citológicas que demonstram LSIL ou HSIL

Foi realizado um estudo multicêntrico utilizando o teste *digene* HC2 HPV DNA e amostras recolhidas em diversos hospitais e centros médicos (3 locais) que realizam colposcopias e que apresentam uma elevada prevalência de doenças cervicais e de HPV no Oeste e Sul dos EUA. Os testes ao HPV foram realizados em 3 centros de investigação não associados às clínicas de colposcopia onde as amostras foram colhidas. A população deste estudo clínico incluiu mulheres com um diagnóstico de LSIL ou de HSIL, com base numa amostra citológica recente e encaminhadas para seguimento por colposcopia. Das 702 doentes envolvidas, 327 apresentavam resultados citológicos superiores a ASC-US e possuíam informação adequada disponível; 96 destas apresentavam HSIL em último grau ou mais grave. As amostras de células cervicais esfoliadas foram obtidas com o *digene* HC2 DNA Collection Device e depois colocadas em STM ou através de um dispositivo tipo vassoura e enxaguadas com solução PreservCyt. As amostras foram colhidas no momento da colposcopia. Foram testadas amostras com o teste *digene* HC2 HPV DNA e os resultados foram comparados com o estado da doença determinado

para cada doente. O grau da doença baseou-se nos resultados da avaliação histológica, no entanto, nos casos em que a histologia foi negativa ou na ausência de um resultado histológico, o grau da doença foi determinado pela amostra citológica realizada no momento da colposcopia (consultar a *tabela 6*). O teste *digene* HC2 HPV DNA foi realizado em 3 grandes hospitais metropolitanos não associados aos locais onde foi feita a recolha das amostras durante a colposcopia. A amostra citológica foi realizada num laboratório de patologia de referência e a histologia foi efetuada nas instituições que realizaram a colposcopia. Os resultados do teste foram comparados com o grau da doença, de forma a poder avaliar a sensibilidade, a especificidade do teste e o valor preditivo negativo e positivo para a deteção de neoplasia cervical de alto grau. Devido às semelhanças entre as características de desempenho do teste *digene* HC2 HPV DNA para meio de transporte de amostras e para a solução PreservCyt, o desempenho do ensaio é apresentado apenas para PreservCyt.

Não foi observada qualquer diferença nos resultados da sonda de HPV de alto risco para as amostras transportadas em STM e solução PreservCyt. A tabela que se segue apresenta os resultados da sonda de HPV de alto risco nesta população:

Tabela 6
Algoritmo do grau de doença da doente

Resultado citológico	Resultado histológico	Grau de doença
NEG	NEG ou não realizado*	NEG
LSIL	NEG	LSIL
HSIL	NEG	HSIL
Cancro	NEG	HSIL+
NEG	LSIL	LSIL
LSIL	Não realizado*	LSIL
LSIL	LSIL	LSIL
HSIL	LSIL	LSIL
Cancro	LSIL	LSIL
NEG	HSIL	HSIL
LSIL	HSIL	HSIL
HSIL	HSIL	HSIL
HSIL	Não realizado*	HSIL
Cancro	HSIL	HSIL
NEG	Cancro	HSIL+
LSIL	Cancro	HSIL+
HSIL	Cancro	HSIL+
Cancro	Não realizado*	HSIL+
Cancro	Cancro	HSIL+

* Biopsia e/ou Curetagem Endocervical (ECC) não realizadas pois não foram observadas quaisquer anomalias sob colposcopia ou o resultado histológico não estava disponível.

As tabelas 7 e 8 representam o desempenho do teste *digene* HC2 HPV DNA determinado usando 327 amostras em PreservCyt, 96 das quais foram colhidas de mulheres diagnosticadas com doença cervical de grau elevado. As comparações foram realizadas utilizando todas as doentes envolvidas no estudo com resultados citológicos anormais. São apresentadas comparações para as amostras PreservCyt testadas com a sonda de HPV de alto risco.

Tabela 7
Resultados da sonda de HPV de alto risco

Resultado da amostra citológica de encaminhamento	Estado da doença final						Total
	HSIL		LSIL		Negativo		
	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	
Resultados de HPV de alto risco							
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		

A tabela 8 mostra que o teste *digene* HC2 HPV DNA utilizando a sonda de HPV de alto risco demonstrou uma sensibilidade geral de aproximadamente 93% para a identificação de mulheres com neoplasia de grau elevado numa população enviada para colposcopia com base num diagnóstico por citologia de LSIL, HSIL ou equivalente. O teste também demonstrou um valor preditivo negativo de cerca de 93% nesta população.

Tabela 8
Características de desempenho
Teste *digene* HC2 High-Risk HPV DNA entre doentes
com amostra citológica de referência LSIL ou mais grave e um grau de doença final de HSIL

Resultado de sonda de HPV de alto risco	Papanicolaou de referência LSIL ou HSIL → Doença HSIL			
		+	-	Total
	+		89	140
-		7	91	98
Total		96	231	327

Sensibilidade $[TP/(TP+FN)] = 92,7\%$ (89/96)

IC de 95% = 85,6 a 97,0

Especificidade $[TN/(TN+FP)] = 39,4\%$ (91/231)

IC de 95% = 33,1 a 46,0

Prevalência da doença LSIL no encaminhamento relativa a HSIL final = 21,4%

Prevalência da doença HSIL no encaminhamento relativa a HSIL final = 46,6%

Valor preditivo positivo global = 38,9% (89/229)

Valor preditivo negativo global = 92,8% (91/98)

Embora a especificidade do teste *digene* HC2 HPV DNA pareça ser um pouco baixa, não se espera uma correlação estrita entre a ausência de neoplasia e um resultado negativo para HPV. O ADN do HPV pode estar presente em mulheres sem progredir para uma doença de grau superior. De facto, quando foi realizado o teste da reação em cadeia da polimerase (PCR) do HPV (um ensaio apenas utilizado para fins de investigação) em amostras com resultados positivos para o HPV e cujo grau da doença correspondente foi inferior a neoplasia de grau reduzido, quase 75% foram positivos.

A tabela 9 indica os valores preditivos positivos e negativos teóricos para a sonda de HPV de alto risco para uma LSIL ou uma HSIL inicial que, durante a colposcopia, se verificou corresponder a HSIL ou a uma doença ainda mais grave.

Tabela 9
Valor teórico preditivo positivo e negativo
Sonda de HPV de alto risco
Resultados iniciais de LSIL ou de HSIL da amostra citológica

Prevalência teórica de HSIL	Resultado inicial de LSIL ou de HSIL da amostra citológica	
	Ensaio positivo	Ensaio negativo
	Valor preditivo	Valor preditivo
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

DADOS QUE APOIAM A INDICAÇÃO DE RASTREIO PRIMÁRIO DO HPV DE ALTO RISCO

Desempenho clínico no rastreio de doentes com resultados normais de amostra citológica, como auxiliar na avaliação do risco para o acompanhamento da doente

Seguidamente apresentam-se os resultados de oito estudos clínicos independentes realizados por instituições médicas, académicas e governamentais reconhecidas em centros nos Estados Unidos e noutros países. Os estudos utilizaram os métodos estabelecidos de citologia, usados nos países onde o estudo foi realizado. Em todos os casos, à exceção de dois, o sistema de classificação Bethesda foi utilizado para interpretar os resultados citológicos. Além disso, a presença de doença cervical de grau elevado foi diagnosticada através de biopsia direcionada por colposcopia para cada estudo. Estes estudos avaliaram a utilidade clínica do teste *digene* HC2 High-Risk HPV DNA em comparação com a amostra citológica para mulheres mais velhas (normalmente acima dos 30 anos de idade). Todos os estudos à exceção de um também levaram a cabo testes prospetivos ao HPV com o teste *digene* HC2 High-Risk HPV DNA.

Os estudos foram estudos transversais de rastreio à população geral utilizando o teste *digene* HC2 High-Risk HPV DNA, salvo indicação em contrário abaixo. Conforme indicado, 2 dos 8 estudos de rastreio foram realizados nos Estados Unidos; 2 na Europa, 2 na América Latina, 1 em África e 1 na Ásia.

O desempenho do teste *digene* HC2 High-Risk HPV DNA observado a partir de seis estudos transversais é resumido, nas tabelas 10 e 11, para mulheres com idade igual ou superior a 30 anos às quais foi diagnosticada e histologicamente confirmada neoplasia cervical de grau elevado (definida como NIC grau 3 ou mais grave).

Tabela 10
Estimativas de desempenho do teste *digene* HC2 High-Risk HPV DNA
Sensibilidade e especificidade

População	n		Sensibilidade (%)			Especificidade (%)		
			Apenas amostra citológica	Apenas HPV	HPV + amostra citológica	Apenas amostra citológica	Apenas HPV	HPV + amostra citológica
Europa Ocidental 1	7592		51,6 (14/27)	96,3 (26/27)	100 (27/27)	98,5 (7453/7565)	96,2 (275/7565)	95,1 (7193/7565)
		IC 95%	32,0-71,3	81,0-99,9	87,2-100	98,2- 98,8	95,7-96,6	94,6-95,6

América Latina 1	6115		58,4 (45/77)	94,8 (73/77)	97,4 (75/77)	98,7 (5962/6038)	93,9 (5669/6038)	93,4 (5637/6038)
		IC 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
América Latina 2 [†]	6176		77,9 (53/68)	89,7 (61/68)	94,1 (64/68)	94,1 (5745/6108)	94,0 (5742/6108)	89,9 (5490/6108)
		IC 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
África	2925		84,1 (90/107)	89,7 (96/107)	92,5 (99/107)	86,4 (2436/2818)	80,0 (2253/2818)	76,4 (2152/2818)
		IC 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
Ásia	1936		97,6 (41/42)	100 (42/42)	100 (42/42)	76,3 (1445/1894)	83,0 (1572/1894)	68,0 (1287/1894)
		IC 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
EUA 1	1040		50,0 (1/2)	100 (2/2)	100 (2/2)	97,6 (1013/1038)	96,2 (999/1038)	95,5 (991/1038)
		IC 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

[†]Dados HC2 disponíveis, caso contrário, utilizados dados HCS; dados combinados.

Tabela 11
Estimativas de desempenho do teste *digene* HC2 High-Risk HPV DNA
Valor preditivo positivo e negativo

População	n		Prevalência (%)	Valor preditivo positivo (%)			Valor preditivo negativo (%)		
				NIC grau 3	Apenas amostra citológica	Apenas HPV	HPV + amostra citológica	Apenas amostra citológica	Apenas HPV
Europa Ocidental 1	7592		0,36 (27/7592)	11,1 (14/126)	8,23 (26/316)	6,77 (27/399)	99,83 (7453/7466)	99,99 (7275/7276)	100,0 (7193/7193)
		IC 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
América Latina 1	6115		1,26 (77/6115)	37,2 (45/121)	16,5 (73/442)	15,8 (75/476)	99,47 (5962/5994)	99,93 (5669/5673)	99,96 (5637/5639)
		IC 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
América Latina 2 [†]	6176		1,10 (68/6176)	12,7 (53/416)	14,3 (61/427)	9,4 (64/682)	99,74 (5745/5760)	99,88 (5742/5749)	99,93 (5490/5494)
		IC 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
África	2925		3,66 (107/2925)	19,1 (90/472)	14,5 (96/661)	12,9 (99/765)	99,31 (2436/2453)	99,51 (2253/2264)	99,63 (2152/2160)
		IC 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
Ásia	1936		2,17 (42/1936)	8,37 (41/490)	11,5 (42/364)	6,47 (42/649)	99,93 (1445/1446)	100,0 (1572/1572)	100,0 (1287/1287)
		IC 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
EUA 1	1040		0,19 (2/1040)	3,85 (1/26)	4,88 (2/41)	4,08 (2/49)	99,90 (1013/1014)	100,0 (999/999)	100,0 (991/991)
		IC 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

[†]Dados HC2 disponíveis, caso contrário, utilizados dados HCS; dados combinados.

Em todos os estudos, existe uma melhoria uniforme e frequentemente muito significativa na sensibilidade do teste *digene* HC2 High-Risk HPV DNA em comparação com o da amostra citológica apenas. No que se refere à sensibilidade, o valor preditivo negativo (*Negative Predictive Value*, NPV) do HPV ultrapassa o da amostra citológica apenas, em todos os casos, alcançando quase os 100%. Este NPV demonstra a elevada probabilidade de ausência de doença cervical de alto grau ou de cancro em mulheres citologicamente normais sem infecção pelo HPV.

Embora a especificidade do teste *digene* HC2 High-Risk HPV DNA seja inferior à da amostra citológica apenas, a análise do quociente de verosimilhança demonstrou que a redução na especificidade observada não é suficientemente significativa para afetar a utilidade clínica da utilização do teste para identificar mulheres que apresentam um risco reduzido ou nenhum de ter ou desenvolver doença cervical. No entanto, é importante que a decisão de enviar uma doente para realizar colposcopia se baseie em todas as informações clínicas e de risco, assim como no histórico da doente disponível para o médico. As variáveis importantes incluem o historial de infecção por HPV e/ou amostras citológicas

anormais, a idade da primeira relação sexual, o número de parceiros sexuais e doenças sexualmente transmissíveis.^{27,28}

Embora a prevalência de doença de alto grau não apresente variações significativas entre os estudos a partir dos quais o desempenho foi determinado, a prevalência de infecção por HPV numa população pode afetar o desempenho e varia, tipicamente, com a população de doentes. Além disso, a prevalência de infecção por HPV demonstrou diminuir drasticamente com a idade.^{28, 30-37, 41} Os valores preditivos positivos diminuem ao testar populações com uma prevalência baixa ou indivíduos com baixo risco de infecção.

Foi efetuada análise longitudinal utilizando os resultados de 2 estudos; um realizado nos Estados Unidos pelo National Cancer Institute (NCI, instituto nacional do cancro) em Portland, Oregon, e o outro realizado em França no Laboratoire Pol Bouin C.H.U. (laboratório Pol Bouin C.H.U.) de Reims. Estas análises longitudinais foram efetuadas para demonstrar que as doentes com amostra citológica negativa/HPV negativo apresentam um baixo risco de desenvolverem doença cervical, comparativamente a mulheres tradicionalmente definidas como apresentando um baixo risco, mas cujo estado de HPV não é conhecido e comparativamente a doentes com amostra citológica negativa/HPV positivo.

Os resultados destas análises longitudinais são apresentados nas tabelas 12 e 13 que se seguem.

Tabela 12
Resumo dos resultados: Estudos do NCI e em França
Risco relativo de doença de alto grau

Grupo de estudo	Idade	Classificação de baixo risco	n	Casos de NIC grau 3+	Taxa (por 100 anos de doente)	Risco relativo (IC de 95%)
NCI	30 e mais	Amostra citológica normal, HPV negativo	12.054	28	0,043	0,897 (0,596, 1,348)
		Amostras citológicas consecutivas normais*	9.429	19	0,048	1,000
	Todas	Amostra citológica normal, HPV negativo	17.594	48	0,056	0,678 (0,514, 0,894)
		Amostras citológicas consecutivas normais*	13.392	44	0,082	1,000
França	30 e mais	Amostra citológica normal, HPV negativo	1.690	3	0,084	0,849 (0,307, 2,35)
		Amostras citológicas consecutivas normais*	2.026	4	0,099	1,000
	Todas	Amostra citológica normal, HPV negativo	2.180	3	0,066	0,491 (0,221, 1,09)
		Amostras citológicas consecutivas normais*	2.650	7	0,136	1,000

*Três amostras citológicas anuais normais ao longo de aproximadamente 2 anos

Tabela 13
Resumo dos resultados: Estudos do NCI e em França
Taxas da doença classificadas por estado de HPV na referência

Grupo de estudo	Idade	Estado de referência	n	Casos de NIC grau 3+	Taxa (por 100 anos de doente)	Risco relativo (IC de 95%)
NCI	30 e mais	Amostra citológica normal, HPV positivo	1.078	24	0,451	10,50 (6,13, 18,0)
		Amostra citológica normal, HPV negativo	12.054	28	0,043	1,00
	Todas	Amostra citológica normal, HPV positivo	2.561	63	0,096	10,64 (7,33 – 15,5)
		Amostra citológica normal, HPV negativo	17.594	48	0,056	1,00
França	30 e mais	Amostra citológica normal, HPV positivo	419	14	2,346	27,3 (8,41, 88,3)
		Amostra citológica normal, HPV negativo	1696	3	0,084	1,00
	Todas	Amostra citológica normal, HPV positivo	619	22	2,520	37,0 (11,8, 116)
		Amostra citológica normal, HPV negativo	2180	3	0,066	1,00

A utilidade clínica do resultado do teste de HPV foi ainda reforçada pelo risco acrescido de doença cervical em mulheres com HPV positivo, comparativamente a mulheres com HPV negativo.

SENSIBILIDADE ANALÍTICA

Um painel não clínico de ADN plasmídico de HPV clonado foi testado para determinar se cada um dos 18 tipos de HPV são detetados pelo teste *digene* HC2 HPV DNA e para determinar a sensibilidade analítica do ensaio para cada um dos tipos de HPV. Cada concentração de HPV alvo (100 pg/ml, 10 pg/ml, 2,5 pg/ml, 1 pg/ml, 0,5 pg/ml e 0,2 pg/ml) de cada um dos 18 tipos de ADN do HPV (6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) foi executada em triplicado com a sonda de HPV de baixo risco ou com a sonda de HPV de alto risco, conforme adequado. Calculou-se o sinal médio em URL (unidades relativas de luz) para cada concentração de cada tipo de HPV e comparou-se com o calibrador positivo para a parte adequada do ensaio.

O limite de deteção de cada tipo de HPV em STM é apresentado na tabela 14. Os limites de deteção variaram entre 0,62 pg/ml e 1,39 pg/ml, dependendo do tipo de HPV testado. Todos os tipos de HPV foram detetados a um nível estimado de 1,09 pg de ADN do HPV alvo por 1 ml de amostra em STM. O limite de deteção médio para os 18 tipos de ADN do HPV foi de 1,09 pg/ml com um desvio padrão de 0,05.

Tabela 14
Resumo dos limites detetáveis de sensibilidade do teste *digene* HC2 HPV DNA
para cada tipo de ADN do HPV em STM

Tipo de ADN do HPV	Concentração de ADN de HPV detetável (pg/ml)	Desvio padrão	Intervalo de confiança 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
Média (todos os tipos)	1,09	0,05	0,97-1,27

DESEMPENHO DA MISTURA DE SONDAS COMBINADAS (MSC)

O mesmo painel não clínico de ADN plasmídico de HPV descrito acima foi testado para determinar a sensibilidade analítica de cada um dos 18 tipos de HPV no teste *digene* HC2 HPV DNA no seguimento do protocolo da mistura de sondas combinadas (MSC), tal como descrito neste folheto. A sensibilidade analítica do protocolo MSC variou de 0,58 pg/ml a 1,39 pg/ml e todos os tipos de HPV foram detetados a um nível estimado de 0,95 pg/ml de ADN do HPV alvo por 1 ml de amostra. O limite de deteção médio para os 18 tipos de HPV foi de 0,95 pg/ml com um desvio padrão de 0,07. Esta sensibilidade é equivalente à sensibilidade analítica encontrada para o método de duas sondas do teste *digene* HC2 HPV DNA.

EQUIVALÊNCIA ENTRE AS AMOSTRAS EM MEIO DE TRANSPORTE DE AMOSTRAS (STM) E EM SOLUÇÃO PRESERVACYT

A equivalência entre as amostras em STM e em solução PreservCyt foi analisada para igual recuperação do ADN dos 18 tipos de HPV de aproximadamente 10^6 células HeLa positivas contendo genomas integrados dos 18 tipos de HPV inseridos em STM e num grupo de células negativas em solução PreservCyt. Cada tipo de amostra foi processado de acordo com o respetivo procedimento de processamento/desnaturação, descrito nestas instruções de utilização e testado com o teste *digene* HC2 HPV DNA utilizando a sonda HPV de alto risco. Os resultados demonstraram que a recuperação do ADN dos 18 tipos de HPV das células de carcinoma humano é equivalente nos dois meios e que o

procedimento de preparação da solução PreservCyt não afeta a sensibilidade analítica do teste *digene* HC2 HPV DNA.

CORRELAÇÃO DOS RESULTADOS DAS AMOSTRAS EM SUREPATH COM AS AMOSTRAS EM MEIO DE TRANSPORTE DE AMOSTRAS (STM) NUMA POPULAÇÃO CLÍNICA

Foi realizada uma avaliação clínica de duas fases utilizando 6 centros de recolha e 3 locais de teste nos Estados Unidos. As doentes que se deslocaram a uma clínica de DST, uma clínica de obstetrícia/ginecologia, uma clínica de colposcopia, um hospital ou um centro de planeamento familiar eram elegíveis para inscrição de acordo com os critérios de inclusão e exclusão predeterminados. A fase de viabilidade, destinada a determinar um valor de corte de ensaio adequado do teste *digene* HC2 High-Risk HPV DNA para utilização com amostras SurePath, incluiu aproximadamente 400 doentes. A fase de validação clínica, incluindo aproximadamente 1500 doentes para validar o valor de corte do ensaio escolhido, iniciou após uma análise interina da fase de viabilidade demonstrar que um valor de corte de ensaio de 1,0 URL/VC utilizando amostras SurePath produziu uma concordância aceitável com os resultados das amostras em STM.

Em ambas as fases de avaliação, as amostras cervicais emparelhadas SurePath e STM foram obtidas de cada mulher participante que deu o seu consentimento. A amostra SurePath foi então enviada para um laboratório de citologia para preparação das lâminas. Após preparação citológica, a restante amostra SurePath e a amostra em STM correspondente foram testadas com o teste *digene* HC2 High-Risk HPV DNA utilizando um valor de corte de ensaio de 1,0 URL/VC.

A Tabela 15 apresenta a correlação dos resultados das amostras SurePath com as amostras STM emparelhadas observadas nos resultados finais elegíveis para a análise de dados obtida de toda a população inscrita.

Tabela 15
Concordância dos resultados SurePath com STM
(todas as idades e classificação citológica)
(n = 1490)

% de concordância positiva IC 95% (n/N)		% de concordância negativa IC 95% (n/N)	
Todas positivas	Subconjunto alto positivo (URL/VC ≥ 2,5)	Todas negativas	Subconjunto baixo negativo URL/VC (< 0,80)
93,5 90,7, 95,6 (401/429)	96,4 94,1, 98,0 (378/392)	95,3 93,8, 96,5 (1011/1061)	96,0 94,6, 97,1 (1002/1044)

Estes resultados preveem que a sensibilidade e especificidade relativas do ensaio utilizando as amostras SurePath irão correlacionar-se fortemente com os resultados obtidos utilizando o tipo de amostra STM como indicado pelo limite inferior do intervalo de confiança de 95% tanto para a concordância positiva como para a negativa.

REPRODUTIBILIDADE

Foi levado a cabo um estudo de reprodutibilidade multicêntrico para determinar a reprodutibilidade entre dias, entre locais e geral do teste *digene* HC2 HPV DNA utilizando um painel de ADN de HPV alvos e amostras em STM clínicas HPV-positivas e HPV-negativas.

Três laboratórios externos levaram a cabo os testes com o mesmo lote de kits de teste *digene* HC2 HPV DNA em 3 diferentes dias com um painel de reprodutibilidade idêntico. O painel de reprodutibilidade incluiu as seguintes amostras: 12 conjuntos de amostras clínicas desnaturadas em STM; 3 conjuntos de amostras clínicas não desnaturadas em solução PreservCyt; calibrador negativo; e calibradores positivos de baixo risco e de alto risco em concentrações de 0,5 pg/ml, 1 pg/ml, 2,5 pg/ml, 5 pg/ml e 10 pg/ml.

Todos os membros do painel foram testados diariamente em triplicado, utilizando os métodos de sonda de HPV de alto risco e MSC. Os resultados são apresentados na tabela 16.

Tabela 16
Resumo das estatísticas gerais do estudo de reprodutibilidade multicêntrico do teste *digene* HC2 HPV DNA

Medida estatística	SONDA DE HPV DE ALTO RISCO	Mistura de sondas combinadas (MSC)	Resultados combinados de sonda de HPV de alto risco e MSC^a
Proporção de positivos esperados com um resultado positivo observado	100% (99,0/-100,0)	99,8% (98,92/-100,0)	99,9% (99,38/-100,0)
Proporção de negativos esperados com um resultado negativo observado	99,0% (97,49/-99,73)	98,9% (96,79/-99,77)	99,0% (97,88/-99,58)
Concordância	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

^aOs números entre parêntesis indicam intervalos de confiança de 95%. Os dados globais constituem uma combinação de todos os ensaios em todos os locais.

Os resultados indicaram que a reprodutibilidade do teste *digene* HC2 HPV DNA com amostras clínicas colhidas em STM é muito boa.

REATIVIDADE CRUZADA

PAINEL DE REATIVIDADE CRUZADA

Um conjunto de bactérias, vírus e plasmídeos, normalmente encontrados no trato anogenital feminino, bem como uma série de tipos de HPV cutaneotrópicos para os quais estavam disponíveis clones, foi analisado para determinar a possível ocorrência de reatividade cruzada com as sondas HPV utilizadas no teste *digene* HC2 HPV DNA. Todos os microrganismos foram analisados a concentrações de 1×10^5 e de 1×10^7 organismos por ml. Foram analisados ADNs purificados de vírus e de plasmídeos a uma concentração de 4 ng/ml.

Segue-se uma listagem das bactérias analisadas. Todas as bactérias apresentaram resultados negativos no teste *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 ou 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> (estirpe de Cowan)
<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> (ATCC 27762)
<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>	

* Analisou-se tanto a estirpe de *E. coli* utilizada para cultivar os plasmídeos (HB101) como um isolado clínico de *E. coli*.

Segue-se uma listagem do ADN viral ou plasmídeo ou do soro humano testado:

Adenovírus 2	Papilomavírus humano de tipo 1
Citomegalovírus	Papilomavírus humano de tipo 2
Vírus de Epstein-Barr	Papilomavírus humano de tipo 3
Soro positivo para o antígeno de superfície da hepatite B	Papilomavírus humano de tipo 4
Herpes Simplex I	Papilomavírus humano de tipo 5
Herpes Simplex II	Papilomavírus humano de tipo 8
Vírus da imunodeficiência humana (VIH, RT ADN)	Papilomavírus humano de tipo 13
Vírus simiano de tipo 40 (SV40)	Papilomavírus humano de tipo 30

pBR322

Os únicos vírus ou plasmídeos que apresentaram reatividade cruzada no teste *digene* HC2 HPV DNA foi o HPV tipo 13 e o plasmídeo pBR322. O ADN do HPV 13 apenas reagiu com a sonda de HPV de baixo risco. O HPV 13 é normalmente detetado em lesões do lábio de determinados grupos étnicos, mas não foi detetado no trato anogenital.²⁹ Por consequência, não se prevê que a reatividade cruzada entre o HPV 13 e a sonda de HPV de baixo risco do teste *digene* HC2 HPV DNA cause resultados clinicamente confusos para as amostras anogenitais. A reatividade cruzada entre o pBR322 e as sondas HPV de baixo risco e HPV de alto risco do teste *digene* HC2 HPV DNA não é inesperada, uma vez que é difícil remover a totalidade do vetor pBR322 do ADN quando se isola o conteúdo do HPV. Registou-se a presença de sequências homólogas de pBR322 em amostras genitais humanas, podendo ocorrer

resultados falso-positivos na presença de elevados níveis de plasmídeo bacteriano. No entanto, 298 amostras clínicas com resultados positivos com as sondas HPV de baixo risco e alto risco do teste *digene* HC2 HPV DNA mostraram que nenhum dos resultados positivos se devia ao pBR322 quando testados com uma sonda de pBR322. Assim, a probabilidade de ocorrência de um resultado falso-positivo com o teste *digene* HC2 HPV DNA devido a sequências homólogas de pBR322 em amostras clínicas parece ser baixa.

HIBRIDIZAÇÃO CRUZADA

Cada um dos 18 tipos de HPV foi testado com as sondas de HPV de baixo e de alto risco a concentrações de 4 ng/ml de ADN do HPV. Esperava-se que todos os alvos de HPV apresentassem resultados positivos com o grupo de sondas apropriado, não se esperando que nenhuma das amostras fosse positiva com o grupo de sondas oposto. Este estudo demonstrou que existe uma pequena percentagem de hibridização cruzada entre os tipos de HPV 6 e 42 (tipos de HPV de baixo risco) e o grupo de sondas de alto risco (sonda de HPV de alto risco). As amostras com níveis elevados (4 ng/ml ou superior) de ADN do HPV 6 ou do HPV 42 podem ser positivas para os dois grupos de sondas. A importância clínica deste facto é que as doentes com uma concentração de 4 ng/ml ou superior de ADN do HPV 6 ou do HPV 42 podem ser encaminhadas para colposcopia.

Além disso, a sonda de HPV de alto risco tem demonstrado reatividade cruzada com os tipos de HPV 40, 53 e 66. Estes tipos são raros e não existem provas suficientes para estabelecer uma correlação exata entre a infeção por estes tipos e o desenvolvimento de doença de alto grau³⁸. As doentes cujas amostras apresentam níveis elevados destes tipos de ADN do HPV podem ser incorretamente encaminhadas para colposcopia. Tem sido igualmente registado na literatura que sondas complexas semelhantes às utilizadas neste teste podem provocar resultados falso-positivos devido à hibridização cruzada com tipos de HPV 11, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 ou MM9.³⁹ Embora vários destes tipos de HPV sejam raros ou novos e encontrados com pouca frequência em doenças de alto grau, as doentes cujas amostras contenham elevados níveis destes tipos de ADN do HPV podem ser, incorretamente, encaminhadas para colposcopia.

EFEITO DO SANGUE E OUTRAS SUBSTÂNCIAS NAS AMOSTRAS STM

O efeito do sangue e de outras substâncias, definidas ou indefinidas, que possam potencialmente interferir, foi avaliado com o teste *digene* HC2 HPV DNA. Adicionou-se sangue total, água do duche, creme antifúngico e gel contraceptivo (agentes que podem ser, normalmente, encontrados nas amostras cervicais) a amostras negativas e positivas STM (conjuntos de amostras clínicas e não clínicas) a concentrações que podem ser encontradas nas amostras cervicais. Não se observaram resultados falso-positivos com qualquer um dos quatro agentes a qualquer concentração. No entanto, pode verificar-se um resultado falso-negativo em amostras clínicas com níveis de ADN do HPV próximos do valor de corte positivo para o ensaio (1 pg/ml), se existirem elevados níveis de creme antifúngico ou de gel contraceptivo. Todavia, é altamente improvável que uma amostra clínica seja constituída quase exclusivamente por uma dessas substâncias, uma vez que o colo do útero é normalmente limpo antes da recolha de amostras citológicas para testes de HPV.

EFEITO DO SANGUE E OUTRAS SUBSTÂNCIAS NAS AMOSTRAS EM SOLUÇÃO PRESERVACYT

O efeito do sangue e de outras substâncias, definidas ou indefinidas, que possam potencialmente interferir, presentes em amostras clínicas em solução PreservCyt, foi avaliado no teste *digene* HC2 HPV DNA. Adicionou-se sangue total, água do duche, creme antifúngico e gel contraceptivo (agentes que podem ser, normalmente, encontrados nas amostras cervicais) a conjuntos de amostras negativas e positivas em solução PreservCyt a concentrações que podem ser encontradas nas amostras cervicais. Não se observaram resultados falso-positivos ou falso-negativos com qualquer um dos quatro agentes a qualquer concentração. Além disso, as substâncias contidas em algumas amostras clínicas não inibem a detecção do ADN do HPV através do teste *digene* HC2 HPV DNA.

REPRODUTIBILIDADE DO TESTE *digene* HC2 HPV DNA COM AMOSTRAS CLÍNICAS COLHIDAS EM STM

A reprodutibilidade do teste *digene* HC2 HPV DNA com amostras clínicas colhidas em STM foi determinada num estudo utilizando 20 conjuntos clínicos (10 positivos e 10 negativos) preparados, combinando amostras cervicais anteriormente desnaturadas e testadas colhidas em STM. As amostras foram testadas em réplicas de 4 em cada um dos 5 dias para um total de 20 réplicas por amostra. O teste foi realizado pelo método da mistura de sondas combinadas. Calcularam-se as médias, o desvio padrão e os intervalos de confiança de 95% próximos da média (IC) para cada amostra todos os dias e ao longo de 5 dias, conforme apresentado na tabela 17.

Tabela 17
URL/VC médios com intervalo de confiança e percentagem positiva
(ordem decendente por URL/VC médios)

N.º	ID da amostra	URL/VC MÉDIOS	IC	% positivos
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)

Para as 5 amostras com URL/VC médios 20% ou mais acima do valor de corte (N.º 1-5), 100 das 100 réplicas (100,0%) foram positivas. Para as 5 amostras com URL/VC médios 20% acima ou abaixo do valor de corte do ensaio (N.º 6-10), 60 de 100 (60%) das réplicas foram positivas e 40 de 100 (40%) foram negativas. Para as 10 amostras com URL/VC médios mais de 20% abaixo do valor de corte do ensaio, 200 de 200 réplicas (100%) foram negativas.

Assim, as amostras com URL/VC médios 20% ou mais acima do valor de corte foram positivas 100% do tempo, enquanto que as amostras com URL/VC médios 20% ou mais abaixo do valor de corte foram negativas 100% do tempo, o que indica que se pode esperar que as amostras com um desvio de 20% ou superior relativamente ao valor de corte apresentem resultados consistentes. As amostras situadas próximo do valor de corte apresentam, aproximadamente, números de resultados positivos e negativos iguais. Estes dados demonstram que as amostras em STM produzem resultados reproduzíveis utilizando o teste *digene* HC2 HPV DNA.

REPRODUTIBILIDADE DO TESTE *digene* HC2 HPV DNA COM AMOSTRAS CLÍNICAS COLHIDAS EM SOLUÇÃO PRESERVACYT

A reprodutibilidade do teste *digene* HC2 HPV DNA com amostras clínicas colhidas em solução PreservCyt foi determinada num estudo utilizando 24 reproduções de amostras a uma concentração que

abrange as concentrações de ADN do HPV. As amostras eram compostas por solução PreservCyt e glóbulos brancos, com e sem bactérias com plasmídeo de HPV 16.

Analisaram-se 4 réplicas por amostra em cada um dos 5 dias, num total de 20 réplicas por amostra. Em cada um dos 5 dias do estudo, foi preparada uma alíquota de 8 ml para cada amostra de acordo com as instruções de utilização do kit *digene* HC2 Sample Conversion utilizando apenas a sonda de HPV de alto risco. Calcularam-se as médias, os desvios padrão e os intervalos de confiança de 95% (IC) para cada amostra, todos os dias e ao longo dos 5 dias, e para as réplicas. O URL/VC médios, o intervalo de confiança próximo da média e a percentagem de réplicas positivas são apresentados na tabela 18 para cada amostra, por ordem descendente e com base nos URL/VC médios.

Tabela 18
URL/VC médios com intervalo de confiança e percentagem positiva
(ordem descendente por URL/VC médios)

N.º	N.º amostra	URL/VC MÉDIOS	IC	% positivos
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)

Para as 6 amostras com URL/VC médios 20% ou mais acima do valor de corte (N.º 1-6), 114 das 120 réplicas (95,0%) foram positivas. Para as 7 amostras com URL/VC médios 20% acima ou abaixo do valor de corte do ensaio (N.º 7-13), 88 de 139 (63,3%) das réplicas foram positivas e 51 de 139 (36,7%) foram negativas. Para as 4 amostras 10% acima ou abaixo do valor de corte (N.º 10-13), 41 das 79 (51,9%) réplicas foram positivas e 38 (48,1%) foram negativas. Para as 11 amostras com URL/VC médios mais de 20% abaixo do valor de corte do ensaio, 220 de 220 réplicas (100%) foram negativas.

Assim, as amostras com URL/VC médios 20% ou mais acima do valor de corte foram positivas em mais de 95% do tempo, enquanto que as amostras com URL/VC médios 20% ou mais abaixo do valor de corte foram negativas 100% do tempo, o que indica que se pode esperar que as amostras com um desvio de 20% ou superior relativamente ao valor de corte apresentem resultados consistentes. As amostras situadas próximo do valor de corte apresentam, aproximadamente, números de resultados

positivos e negativos iguais. Estes dados demonstram que as amostras em solução PreservCyt produzem resultados reproduzíveis utilizando o teste *digene* HC2 HPV DNA.

REPRODUTIBILIDADE DO TESTE *digene* HC2 HPV DNA COM AMOSTRAS CLÍNICAS COLHIDAS EM FLUIDO CONSERVANTE SUREPATH

Foram realizadas avaliações de reprodutibilidade para caracterizar a capacidade de 3 laboratórios diferentes na obtenção de um resultado de diagnóstico semelhante em dias diferentes e com diferentes execuções a partir de um conjunto idêntico de amostras com um estado de HPV positivo/negativo conhecido, aquando da utilização de um valor de corte do ensaio de 1,0 URL/VC. O painel de amostras de reprodutibilidade consistia em 5 amostras de HPV positivo, 2 amostras com concentrações de ADN do HPV próximo do valor de corte do ensaio e 5 amostras de HPV negativo.

Os membros do painel foram preparados através da combinação única de amostras de doentes em SurePath com um estado de HPV negativo e positivo para se obter os valores alvo de URL/VC pretendidos. Todos os membros do painel foram testados em duplicado, duas vezes ao dia durante um período de cinco dias em cada um dos três laboratórios participantes.

Tabela 19
Estudo de reprodutibilidade de amostras SurePath
Resultados qualitativos por membro do painel

Membro do painel	URL/VC médios	Resultado esperado	HPV Positivo n (%)	HPV Negativo n (%)
1	0,20	negativo	0 (0)	60 (100)
2	0,21	negativo	0 (0)	60 (100)
3	0,22	negativo	0 (0)	60 (100)
4	0,28	negativo	2 (3,3)	58 (96,7)
5	0,36	negativo	2 (3,3)	58 (96,7)
6	0,83	negativo	13 (21,7)	47 (78,3)
7	1,17	positivo	26 (43,3)	34 (56,7)
8	19,47	positivo	60 (100)	0 (0)
9	25,65	positivo	60 (100)	0 (0)
10	81,52	positivo	60 (100)	0 (0)
11	154,18	positivo	60 (100)	0 (0)
12	765,29	positivo	60 (100)	0 (0)

REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS SUREPATH AO UTILIZAR O RAPID CAPTURE SYSTEM PARA PROCESSAMENTO DO ENSAIO

A reprodutibilidade dos resultados das amostras SurePath aquando da utilização do Rapid Capture System para o processamento de ensaios foi comparada com os resultados obtidos aquando da utilização do processamento de ensaios manual. Foram realizados dois testes comparativos em alíquotas separadas da mesma amostra processada.

Tabela 20
Concordância dos resultados entre amostras SurePath com RCS
(ensaio RCS vs. manual)

% de concordância positiva IC 95% (n/N)		% de concordância negativa IC 95% (n/N)	
Todas positivas	Subconjunto alto positivo (URL/VC ≥ 2,5)	Todas negativas	Subconjunto baixo negativo URL/VC (< 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

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Para utilização em diagnóstico *in vitro*

Consultar o manual do utilizador do *Rapid Capture System* para conhecer as limitações adicionais do procedimento específicas à utilização desse sistema para testes de elevados volumes de amostras.

- O teste *digene* HC2 HPV DNA para o papilomavírus humano dos tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 não é recomendado para a avaliação de suspeita de abuso sexual.
- A prevalência de infeção por HPV numa população pode afetar o desempenho. Os valores preditivos positivos diminuem quando se testam populações com baixa prevalência ou indivíduos que não apresentam risco de infeção.
- Um resultado negativo não exclui a possibilidade de infeção por HPV, uma vez que níveis muito baixos de infeção ou um erro na amostragem podem dar origem a um resultado falso-negativo.
- O teste *digene* HC2 HPV DNA distingue entre 2 grupos de tipos HPV: HPV 6/11/42/43/44 e 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68. Todavia, não distingue entre os diferentes tipos virais dentro desses grupos.
- O teste *digene* HC2 HPV DNA só pode ser utilizado com amostras cervicais colhidas com o *digene* HC2 DNA Collection Device ou com biópsias colhidas em STM ou amostras cervicais colhidas utilizando um dispositivo de colheita tipo vassoura ou uma combinação de escova/espátula e colocadas em solução PreservCyt ou amostras cervicais colhidas em fluido conservante SurePath. As amostras de biópsia só podem ser avaliadas se forem imediatamente colocadas em STM e armazenadas a -20 °C até serem analisadas.
- O *digene* HC2 DNA Collection Device não deve ser utilizado para a colheita de amostras de mulheres grávidas.
- A infeção por HPV não constitui um indicador definitivo da presença de doença cervical de alto grau, nem implica em todos os casos que se venha a desenvolver doença de alto grau ou cancro.
- Existe uma pequena percentagem de hibridização cruzada entre os tipos de HPV 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 e MM9 e a sonda de HPV de alto risco. As doentes cujas amostras apresentam níveis elevados destes tipos de HPV podem ser incorretamente encaminhadas para colposcopia.³⁸
- O teste *digene* HC2 HPV DNA destina-se a detetar tipos de HPV de baixo e de alto risco, incluindo 39, 58, 59 e 68. Estudos analíticos levados a cabo pela QIAGEN, utilizando ADN plasmídico de HPV clonado, demonstraram que o teste deteta estes tipos em níveis que variam de 0,62 pg/ml a 1,39 pg/ml. Isto equivale às características de deteção de outros tipos de HPV visados pelo teste *digene* HC2 HPV DNA. A QIAGEN conseguiu validar a deteção destes tipos de HPV apenas num número limitado de amostras clínicas. Devido à reduzida prevalência destes tipos na população geral (tal como demonstrado por Bosch et. Al³⁶), as características de desempenho do teste *digene* HC2 HPV DNA para a deteção dos tipos de HPV 39, 58, 59 e 68 não foram estatisticamente confirmadas.
- Se se verificar a presença de elevadas concentrações de creme antifúngico, gel contraceptivo ou água do duche no momento da recolha de uma amostra para o teste ao HPV, há uma probabilidade de obter um resultado falso-negativo no caso de estas amostras apresentarem níveis de ADN do HPV com valores de URL/VC próximos do valor de corte do ensaio.
- É possível a ocorrência de reatividade cruzada entre a sonda do teste *digene* HC2 HPV DNA e o plasmídeo pBR322. A presença de sequências homólogas de pBR322 foi relatada em amostras genitais humanas e poderão ocorrer resultados falso-positivos na presença de elevados níveis de plasmídeos bacterianos.

REFERÊNCIAS

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

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

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

GUIA DE RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

Observação	Causas prováveis	Soluções
<p>Alteração de cor incorreta ou não observada durante a desnaturação.</p>	<p>Reagente de desnaturação incorretamente preparado ou</p> <p>Reagente de desnaturação não adicionado</p> <p>A amostra contém sangue ou outros materiais que dissimulam alterações de cor.</p> <p>O pH da amostra pode ser invulgarmente ácido.</p>	<p>Verificar se o reagente de desnaturação contém o corante indicador e apresenta uma cor púrpura escura.</p> <p>Verificar se o reagente de desnaturação foi adicionado à amostra, medindo o volume da amostra (em princípio, 1,5 ml). Se o volume indicar que o reagente de desnaturação não foi adicionado, proceder à sua adição, misturar e prosseguir com o ensaio se se observar a alteração correta de cor.</p> <p>Não é de esperar que ocorra exatamente a alteração de cor descrita com estes tipos de amostras; os resultados do teste <i>digene</i> HC2 HPV DNA não deverão ser negativamente afetados.</p> <p>Se nenhuma das outras causas se aplicar, a amostra pode ser invulgarmente ácida, não se verificando a alteração de cor prevista. Recolher uma nova amostra antes da aplicação de ácido acético no colo do útero, uma vez que um pH da amostra incorreto irá afetar negativamente os resultados do teste.</p>
<p>Os controlos de qualidade fornecem resultados incorretos</p>	<p>Protocolo de software incorreto escolhido para o teste (ou seja, protocolo MSC utilizado para método de duas sondas)</p> <p>Posicionamento invertido do QC1-LR e do QC2-HR</p> <p>Posicionamento invertido do LRC e QC1-LR e/ou HRC e QC1-HR</p>	<p>Se o protocolo de software for incorreto para o teste a realizar, deverá proceder-se a uma nova leitura da placa no prazo de 30 minutos depois da adição do reagente de deteção 2 com o protocolo correto.</p> <p>Voltar a testar as amostras.</p> <p>Voltar a testar as amostras.</p>
<p>Alteração de cor incorreta observada durante a hibridização.</p>	<p>Mistura inadequada da mistura de sondas com os calibradores, controlos e/ou as amostras desnaturados; ou mistura de sondas não adicionada; ou volume incorreto de reagente adicionado.</p> <p>A amostra contém sangue ou outros materiais que dissimulam alterações de cor.</p> <p>A amostra possuía <1000 µl STM.</p>	<p>Agitar a microplaca de hibridização ou o suporte de microtubos durante mais 2 minutos. Se ainda existirem poços que apresentam uma cor púrpura, adicionar mais 25 µl da mistura de sondas adequada e agitar bem. Se depois da adição da sonda e de voltar a agitar não ocorrer a alteração de cor prevista e a amostra não contiver sangue ou outros materiais, voltar a testar a amostra.</p> <p>Não é de esperar que ocorra exatamente a alteração de cor descrita com estes tipos de amostras; os resultados do teste <i>digene</i> HC2 HPV DNA não deverão ser negativamente afetados.</p> <p>Verificar o volume da amostra original. O volume deverá ser de 1350 µl ±20 µl (depois de retirar 75 µl para as sondas de HPV de baixo e de alto risco). Se o volume for <1350 µl, a amostra original continha <1000 µl STM. Obter uma nova amostra.</p>

Observação	Causas prováveis	Soluções
<p>O ensaio falha nos critérios de validação. Não se observa qualquer sinal no calibrador, nos controlos de qualidade ou nas amostras</p>	<p>Nenhuma sonda adicionada ao diluente da sonda.</p> <p>Sonda contaminada com RNase durante a preparação.</p> <p>Mistura inadequada da sonda com o diluente da sonda.</p> <p>Mistura inadequada da sonda diluída com a amostra desnaturada.</p> <p>Tempo ou temperatura incorretos durante a fase de hibridização.</p> <p>Mistura inadequada durante a fase de captura.</p> <p>Troca das sondas/misturas de sondas/tubos de hibridização.</p> <p>Não adicionada a quantidade correta de reagente de deteção 1 ou não incubou durante o tempo especificado.</p> <p>Não adicionada a quantidade correta de reagente de deteção 2 ou não incubou durante o tempo especificado.</p> <p>Falha ou programação incorreta do luminómetro.</p>	<p>Preparar a mistura de sondas conforme descrito nestas instruções de utilização. Rotular cuidadosamente os tubos.</p> <p>Utilizar pontas de pipetas com proteção contra aerossóis para pipetar a amostra e usar luvas. Utilizar apenas reservatórios de reagente descartáveis novos e limpos.</p> <p>Depois de adicionar a sonda ao diluente da sonda, misturar bem com o vórtex à velocidade máxima durante, pelo menos, 5 segundos. Deve formar-se um vórtice visível.</p> <p>Depois de adicionar a mistura de sondas e a amostra a cada poço da microplaca ou microtubo de hibridização, agitar no conjunto do Rotary Shaker I regulado em 1100 ±100 rpm durante 3 ±2 minutos. Verificar se ocorreu alteração da cor púrpura para amarelo em todos os tubos/poços da microplaca.</p> <p>Hibridizar durante 60 ±5 minutos a 65 ±2 °C. Verificar a temperatura do Microplate Heater I ou do banho-maria. Assegurar que o Microplate Heater I ou banho-maria está configurado para aquecer as amostras à temperatura correta e foi pré-aquecido durante 60 minutos antes da utilização. Assegurar que o nível de água é adequado para aquecer amostras à temperatura correta. Os banhos-maria devem ser periodicamente calibrados.</p> <p>Agitar num Rotary Shaker I durante 60 ±5 minutos a 20-25 °C conforme descrito nestas instruções de utilização. Verificar a velocidade do Rotary Shaker I através de calibração, tal como indicado na secção relativa à calibração da velocidade do shaker do <i>Rotary Shaker I Manual do Utilizador</i>.</p> <p>Preparar cuidadosamente as misturas de sondas e rotular adequadamente os respetivos tubos de mistura de sondas. Ter o cuidado de adicionar a sonda correta ao conjunto correto de tubos de hibridização. Rotular os tubos de mistura de sondas, os tubos de hibridização e/ou os suportes para minimizar o potencial de alterações.</p> <p>Pipetar 75 µl de reagente de deteção 1 em cada poço, utilizando um pipetador de 8 canais. Incubar a uma temperatura de 20-25 °C durante 30 a 45 minutos.</p> <p>Pipetar 75 µl de reagente de deteção 2 em cada poço, utilizando um pipetador de 8 canais. Incubar a uma temperatura de 20-25 °C durante 15 a 30 minutos.</p> <p>Consultar no respetivo manual do utilizador mais instruções ou contactar o representante QIAGEN local.</p>

Observação	Causas prováveis	Soluções
<p>Valores elevados de URL nos calibradores, controlos de qualidade e/ou nas amostras (≥ 200 URL em muitos ou todos os poços). O ensaio pode não cumprir os critérios de validação.</p>	<p>Reagente de desnaturação não adicionado; ou volume incorreto de reagente adicionado; ou mistura inadequada do reagente de desnaturação com as amostras ou com os calibradores.</p> <p>Ligeira fuga no luminómetro. Porta não selada. O vedante em volta da porta está partido.</p> <p>Contaminação do reagente de deteção 2 ou dos poços da microplaca de captura pelo reagente de deteção 1 ou por fosfatase alcalina exógena.</p> <p>Tampão de lavagem contaminado.</p> <p>Automated Plate Washer contaminado.</p> <p>Lavagem inadequada dos poços da microplaca de captura depois da incubação com o reagente de deteção 1.</p> <p>Contaminação dos poços da microplaca com o reagente de deteção 1.</p> <p>Manchas de solução de hibridização na mesma área do papel absorvente Kimtowels ou das toalhas de papel sem felpo equivalentes.</p> <p>Utilização de toalhetes de secagem incorretos.</p>	<p>Assegurar que o pipetador de repetição está a distribuir de modo preciso antes de adicionar reagente de desnaturação. É essencial utilizar pipetadores calibrados. Adicionar metade do volume de reagente de desnaturação a cada tubo e agitar bem. Para evitar resultados falso-positivos, assegurar que o líquido lava toda a superfície interna do tubo. Os calibradores, os controlos de qualidade e as amostras devem adquirir uma cor púrpura após a adição do reagente de desnaturação.</p> <p>Verificar a leitura de fundo do luminómetro, lendo uma microplaca vazia. Uma leitura superior a 50 URL indica a existência de uma ligeira fuga de luz. Consultar no respetivo manual do utilizador mais instruções ou contactar o representante QIAGEN local.</p> <p>Consultar Verificação da contaminação nesta secção de Resolução de problemas.</p> <p>Consultar Verificação da contaminação nesta secção de Resolução de problemas.</p> <p>Consultar Verificação da contaminação nesta secção de Resolução de problemas.</p> <p>Lavar os poços das microplacas devidamente com tampão de lavagem 6 vezes, enchendo sempre os poços até transbordarem ou utilizando o Automated Plate Washer. Não deverá existir qualquer líquido residual cor de rosa nos poços após a lavagem. Consultar o manual do utilizador do <i>Automated Plate Washer</i> para obter instruções sobre como testar quanto à presença de contaminação ou avaria.</p> <p>Assegurar que todas as superfícies de trabalho estão limpas e secas. Ter cuidado durante a utilização do reagente de deteção 1. Evitar aerossóis.</p> <p>Não voltar a secar nada sobre a área do papel absorvente Kimtowels ou das toalhas de papel sem felpo equivalentes anteriormente utilizados.</p> <p>Para a secagem, utilizar papel absorvente Kimtowels ou toalhas de papel sem felpo equivalentes.</p>

Observação	Causas prováveis	Soluções
<p>Quocientes baixos de PC/NC ou elevado número de amostras com positivos baixos com quocientes <2,0 (>20%). O ensaio pode não cumprir os critérios de validação.</p>	<p>Preparação inadequada das amostras.</p> <p>Sonda inadequadamente misturada ou quantidade insuficiente de sonda adicionada aos ensaios.</p> <p>Volume inadequado de sonda diluída adicionado a cada microtubo de hibridização.</p> <p>Perda de atividade do reagente de detecção 1.</p> <p>Captura insuficiente.</p> <p>Lavagem inadequada.</p> <p>Tampão de lavagem contaminado.</p>	<p>Adicionar o volume adequado de reagente de desnaturação e agitar bem com o vórtex. Para evitar resultados falso-positivos, assegurar que o líquido lava toda a superfície interna do tubo. Para amostras em PreservCyt, assegurar que é concluída a mistura e ressuspensão adequadas do pellet de células antes da incubação para desnaturação. Consultar detalhes do protocolo nas instruções de utilização do kit <i>digene</i> HC2 Sample Conversion. Deverá ser observada uma alteração de cor distinta de púrpura claro para escuro. Incubar durante 45 ± 5 minutos a 65 ± 2 °C.</p> <p>Preparar as misturas de sondas conforme descrito. Misturar minuciosamente por agitação em vórtex, garantindo que é produzido um vórtice visível. É necessário adicionar misturas de sondas aos tubos com um pipetador de deslocamento positivo ou um pipetador multicanal para garantir uma distribuição adequada.</p> <p>Assegurar que o pipetador de 8 canais está a distribuir de modo preciso antes de adicionar uma mistura de sondas a microplacas ou microtubos de hibridização. Adicionar 25 µl de mistura de sondas a cada poço da microplaca ou microtubo que contém os calibradores, os controlos de qualidade e as amostras clínicas desnaturados. Assegurar que o pipetador de 8 canais está a distribuir de modo preciso antes de adicionar uma mistura de sondas aos poços das microplacas de hibridização. Deve verificar-se uma alteração da cor púrpura escuro para amarelo depois da adição e da agitação da mistura de sondas. As amostras em solução PreservCyt devem apresentar uma cor rosa em vez de amarela.</p> <p>Armazenar o reagente de detecção 1 a uma temperatura de 2-8 °C. Utilizar antes do final do prazo de validade indicado no rótulo da embalagem externa.</p> <p>O procedimento de captura deve ser realizado utilizando o Rotary Shaker I regulado para 1100 ± 100 rpm. Validar a velocidade do agitador através de calibração.</p> <p>Lavar os poços das microplacas devidamente com tampão de lavagem 6 vezes, enchendo sempre os poços até transbordarem ou utilizando o Automated Plate Washer.</p> <p>Consultar Verificação da contaminação nesta secção de Resolução de problemas.</p>
<p>Séries de amostras positivas com valores de URL aproximadamente iguais.</p>	<p>Contaminação dos poços da microplaca de captura durante a manipulação do ensaio.</p> <p>Contaminação do reagente de detecção 2.</p> <p>Avaria do Automated Plate Washer.</p>	<p>Cobrir a microplaca de captura durante todas as incubações. Evitar expor os tubos a contaminação por aerossóis durante o ensaio. Utilizar luvas descartáveis isentas de pó durante manipulações.</p> <p>Ter cuidado para não contaminar o lote durante a pipetagem de reagente de detecção 2 para os poços da microplaca de captura. Evitar a contaminação do reagente de detecção 2 por aerossóis do reagente de detecção 1 ou por poeiras do laboratório, etc.</p> <p>Consultar Verificação da contaminação nesta secção de Resolução de problemas ou o manual do utilizador do <i>Automated Plate Washer</i> para obter instruções sobre como testar quanto à presença de contaminação ou avaria.</p>
<p>Amplas %CV entre as réplicas.</p>	<p>Pipetagem pouco rigorosa.</p> <p>Agitação insuficiente.</p> <p>Transferência incompleta do líquido dos microtubos de hibridização para os poços da microplaca de captura.</p> <p>Condições de lavagem inadequadas.</p> <p>Contaminação dos poços da microplaca com o reagente de detecção 1.</p>	<p>Verificar o pipetador para garantir que estão a ser distribuídos volumes reprodutíveis. Calibrar os pipetadores periodicamente.</p> <p>Misturar minuciosamente em todos os passos. Misturar no vórtex antes da incubação para a desnaturação e depois da adição da mistura de sondas. Assegurar que é produzido um vórtice visível.</p> <p>Assegurar que são transferidos volumes reprodutíveis durante a fase de transferência dos poços da microplaca ou microtubos de hibridização para os poços da microplaca de captura.</p> <p>Lavar os poços da microplaca devidamente com tampão de lavagem 6 vezes, enchendo sempre os poços até transbordarem ou utilizando o Automated Plate Washer e os devidos protocolos do Automated Plate Washer.</p> <p>Assegurar que todas as superfícies de trabalho estão limpas e secas. Ter cuidado durante a utilização do reagente de detecção 1. Evitar aerossóis.</p>

Observação	Causas prováveis	Soluções
Resultados falso-positivos obtidos a partir de amostras reconhecidamente negativas.	<p>Reagente de deteção 2 contaminado.</p> <p>Contaminação dos poços da microplaca com o reagente de deteção 1.</p> <p>Manchas na mesma área do papel absorvente Kimtowels ou toalhas de papel sem felpo equivalentes em várias linhas.</p> <p>Preparação inadequada das amostras.</p> <p>Condições de lavagem inadequadas.</p> <p>Contaminação da ponta da pipeta com material não desnaturado durante a transferência de amostras desnaturadas para o microtubo ou o poço da microplaca utilizado para a hibridização da sonda HPV.</p>	<p>Ter cuidado para não se verificar contaminação cruzada das amostras quando distribui a alíquota do reagente de deteção 2 entre amostras. Se se utilizar apenas uma parte de um kit, retirar uma alíquota com o volume necessário para esse ensaio para um reservatório de reagente descartável limpo antes de encher o pipetador.</p> <p>Lavar os poços das microplacas devidamente com tampão de lavagem 6 vezes, enchendo sempre os poços até transbordarem ou utilizando o Automated Plate Washer. Não deverá existir qualquer líquido residual cor de rosa nos poços da microplaca após a lavagem.</p> <p>Não secar numa área que já tenha sido anteriormente usada, uma vez que pode ocorrer contaminação.</p> <p>Adicionar o volume adequado de reagente de desnaturação e agitar bem com o vórtex. Para evitar resultados falso-positivos, assegurar que o líquido lava toda a superfície interna do tubo com o método manual ou MST Vortexer 2 (para o método de vórtex manual, inverter o tubo uma vez). Para amostras em PreservCyt, assegurar que é concluída a mistura e ressuspensão adequadas do pellet de células antes da incubação para desnaturação. Consultar detalhes do protocolo nas instruções de utilização do kit <i>digene</i> HC2 Sample Conversion. Para todas as amostras, deve observar-se uma alteração distinta da cor para púrpura escuro. Incubar durante 45 ± 5 minutos a 65 ± 2 °C. Para amostras em SurePath, assegurar que as amostras são incubadas durante 90 ± 5 minutos a 65 ± 2 °C.</p> <p>Lavar os poços da microplaca devidamente com tampão de lavagem 6 vezes, enchendo sempre os poços até transbordarem ou utilizando o Automated Plate Washer e os devidos protocolos do Automated Plate Washer.</p> <p>O passo de desnaturação do procedimento de processamento de amostras deverá ser levado a cabo como indicado nestas instruções de utilização. Uma mistura incorreta da amostra, a inversão do tubo e agitação podem fazer com que a desnaturação fique incompleta de híbridos endógenos de RNA:ADN não específicos das amostras cervicais. Ao usar amostras em solução PreservCyt ou fluido conservante SurePath, em particular, é provável que estes híbridos existam nas paredes internas do tubo de desnaturação da amostra. Para evitar uma possível transferência deste material celular não desnaturado, a ponta da micropipeta não pode tocar nos lados do tubo de desnaturação da amostra durante a transferência da amostra desnaturada para o microtubo ou o poço da microplaca utilizado para a hibridização da sonda HPV.</p>
Valores URL para o calibrador negativo elevados (>200 URL). O resto do ensaio apresenta o desempenho esperado.	<p>O reagente de deteção 2 foi incubado a uma temperatura superior a 20-25 °C.</p> <p>O reagente de deteção 2 foi incubado durante mais de 30 minutos.</p> <p>O reagente de deteção 2 ou o tampão de lavagem foi contaminado com fosfatase alcalina ou reagente de deteção 1.</p>	<p>Repetir o teste e assegurar que os passos de captura e deteção são incubados a 20-25 °C.</p> <p>Ler a placa aos 15 minutos de incubação (e nunca passados mais de 30 minutos de incubação) a uma temperatura de 20-25 °C.</p> <p>Consultar Verificação da contaminação nesta secção de Resolução de problemas.</p>
O ensaio falha nos critério de validação. Quociente PC/NC elevado	<p>Posicionamento invertido do HRC e QC2-HR e/ou do LRC e QC1-LR</p>	<p>Voltar a testar as amostras. Fazer uma leitura cuidadosa dos rótulos nos frascos de calibrador e controlo de qualidade para evitar o posicionamento invertido destes reagentes.</p>

VERIFICAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO

Reagente avaliado	Procedimento de verificação da contaminação	Interpretação de resultados
Nota: Ter cuidado ao pipetar o reagente de deteção 2 para evitar a contaminação. Usar luvas e evitar tocar com as pontas da pipeta nas superfícies de trabalho.		
Reagente de deteção 2	<ul style="list-style-type: none"> Pipetar 75 µl de alíquotas, volume residual ou frasco original de reagente de deteção 2 para um poço de microplaca de captura vazio. Incubar a 20-25 °C durante 15 minutos. Evitar a luz 	<ul style="list-style-type: none"> O controlo de reagente de deteção 2 deverá ser < 50 URL. Se os valores do reagente de deteção forem < 50 URL, o reagente de

	<p>direta do sol.</p> <ul style="list-style-type: none"> Fazer a leitura nos poços da microplaca no luminómetro. <p>Nota: A análise do reagente de deteção 2 em réplicas de 3 faculta uma avaliação ideal do desempenho.</p>	<p>deteção pode ser utilizado para repetir o ensaio.</p> <ul style="list-style-type: none"> Em caso de contaminação (>50 URL), obter um novo kit e repetir o ensaio.
Aparelho do tampão de lavagem e/ou fonte de água	<ul style="list-style-type: none"> Pipetar 75 µl de reagente de deteção 2 para 4 poços separados da microplaca de captura. Rotular os poços 1–4. O poço 1 serve como controlo do reagente de deteção 2. Pipetar 10 µl de tampão de lavagem do frasco de lavagem para o poço 2. Deixar o tampão de lavagem correr através da tubagem do dispositivo de lavagem. Pipetar 10 µl de tampão de lavagem da tubagem para o poço 3. Obter uma alíquota da água utilizada para preparar o tampão de lavagem. Pipetar 10 µl de água no poço 4. Incubar a 20-25 °C durante 15 minutos. Evitar a luz direta do sol. Fazer a leitura nos poços da microplaca no luminómetro. 	<ul style="list-style-type: none"> O controlo de reagente de deteção 2 (poço 1) deverá ser < 50 URL. Comparar o valor de URL do poço 2, 3 e 4 com o valor URL de controlo do reagente de deteção 2 (poço 1). Os valores URL individuais dos poços 2, 3 e 4 não devem exceder 50 URL do valor de URL de controlo do reagente de deteção 2 (poço 1). Os valores que excedam 50 URL do controlo de reagente de deteção 2 indicam a existência de contaminação. Consultar a secção Preparação e armazenamento dos reagentes para obter instruções sobre a limpeza e manutenção do aparelho de lavagem.
Automated Plate Washer	<ul style="list-style-type: none"> Pipetar 75 µl de reagente de deteção 2 para 5 poços separados da microplaca de captura. Rotular os poços 1-5. O poço 1 serve como controlo do reagente de deteção 2. Pipetar 10 µl de tampão de lavagem do frasco do dispositivo de lavagem de placas rotulado <i>lavagem</i> para o poço 2. Pipetar 10 µl do líquido de enxaguamento do frasco do dispositivo de lavagem placas rotulado <i>enxaguamento</i> para o poço 3. Premir a tecla Prime no teclado do Plate Washer, permitindo o fluxo de tampão de lavagem pelos tubos. Pipetar 10 µl de tampão de lavagem da cavidade para o poço 4. Premir a tecla Rinse no teclado do Plate Washer, permitindo o fluxo do líquido de enxaguamento pelos tubos. Pipetar 10 µl de tampão de lavagem da cavidade para o poço 5. Cobrir e incubar 15 minutos a 20-25 °C. Evitar a luz direta do sol. Fazer a leitura nos poços da microplaca no luminómetro. 	<ul style="list-style-type: none"> O controlo de reagente de deteção 2 (poço 1) deverá ser < 50 URL. Comparar o valor de URL do poço 2, 3 e 5 com o valor URL de controlo do reagente de deteção 2 (poço 1). Os valores URL individuais dos poços 2, 3 e 5 não devem exceder 50 URL do valor de URL de controlo do reagente de deteção 2 (poço 1). Os valores que excedam 50 URL do controlo de reagente de deteção 2 indicam a existência de contaminação do Plate Washer. Consultar o procedimento de descontaminação no <i>Automated Plate Washer Manual do Utilizador</i>.

INFORMAÇÕES DE CONTACTO DA QIAGEN

Consultar a lista de contactos fornecida com este produto para contactar o representante local da QIAGEN.

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

Os nomes registados, as marcas comerciais, etc. utilizados neste documento, quando não assinalados como tal, não devem ser considerados como não protegidos por lei.

Este produto e o respetivo método de utilização estão abrangidos por uma ou mais das seguintes patentes:

Patentes nos E.U.A para HPV

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

Patente nos E.U.A. para Hybrid Capture

6,228,578B1

