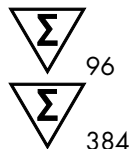


Agosto 2015

Instruções de utilização do *digene*[®] HC2 High-Risk HPV DNA Test



IVD

Ensaio de hibridização de ácidos nucleicos in vitro com amplificação do sinal, que utiliza a quimioluminescência de microplacas para a detecção qualitativa de 13 tipos de ADN do Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco em amostras cervicais e vaginais.

Utilizar em conjunto com:

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



REF

5197-1330 (kit de 1 placa)
618111 (kit de 4 placas)



QIAGEN
19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874
EUA

EC REP

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden
ALEMANHA

1058538PT Rev. 02

Principais alterações à revisão anterior das instruções de utilização

- Foi acrescentado o procedimento de preparação das amostras de pellet de células após gradiente em SurePath com o kit QIAasymphony® DSP HPV Media juntamente com os dados de desempenho relacionados.
- Atualizado para fins de conformidade com o Sistema Mundial Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS).

Índice

Utilização prevista.....	8
Summary and Explanation.....	9
Informação sobre o agente patogénico.....	10
Princípio do procedimento.....	10
Preparação da amostra utilizando o QIAAsymphony SP.....	12
Preparação de amostras com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media.....	12
Preparação de amostras com o kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA.....	13
Realização de testes utilizando o Rapid Capture System.....	13
Materiais fornecidos.....	16
Kit de 1 placa.....	16
Kit de 4 placas.....	16
Conteúdo do kit.....	17
Materiais necessários, mas não fornecidos.....	19
Equipamento e materiais para diagnóstico in vitro.....	19
Materiais e equipamento de uso geral em laboratório.....	20
Materiais e equipamentos adicionais para a preparação de amostras em PreservCyt.....	22
Materiais e equipamentos adicionais para a preparação de amostras em SurePath.....	22
Avisos e precauções.....	23
Advertências.....	23
Amostras.....	23
Azida de sódio.....	24
Tampão N2.....	24
Testes automatizados no RCS.....	25
Declarações de segurança e risco para componentes.....	25
Precauções.....	27
Armazenamento e manuseamento de reagentes.....	28
Componentes do kit.....	28

Reagentes preparados	28
Colheita e preparação de amostras.....	28
Amostras cervicais e vaginais em STM	29
Biopsias cervicais.....	30
Amostras cervicais em solução PreservCyt.....	30
Amostras cervicais em SurePath Preservative Fluid.....	31
Preparação automatizada de amostras em SurePath	32
Preparação automatizada de amostras do pellet de células após gradiente em SurePath	32
Preparação manual de amostras do pellet de células após gradiente em SurePath ...	33
Procedimento	34
Preparação de reagentes	34
Reagente de desnaturação.....	37
Reagente de desnaturação 2.....	38
Mistura para sonda.....	39
Tampão de lavagem	40
Criar a disposição da placa	41
Preparação da amostra	43
Preparação de amostras em PreservCyt com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media	43
Preparação de amostras em SurePath e pellets de células após gradiente em SurePath com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media.....	44
Preparação de amostras em PreservCyt com o kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA.....	44
Preparação manual de amostras em PreservCyt.....	44
Preparação manual de amostras de pellets de células após gradiente em SurePath ..	45
Desnaturação e hibridização de amostras preparadas com o QIAAsymphony SP.....	47
Desnaturação de calibradores, controlos de qualidade e ADN eluído para os testes manuais.....	47
Ponto de paragem opcional de ADN eluído.....	49
Hibridização de ADN eluído.....	49
Desnaturação e hibridização de amostras em STM, amostras em PreservCyt e amostras de pellets de células após gradiente em SurePath preparadas manualmente.....	49
Desnaturação de calibradores, controlos de qualidade e amostras em STM	50

Ponto de paragem opcional de amostras preparadas em STM e amostras em PreservCyt e amostras de pellets de células após gradiente em SurePath preparadas manualmente.....	52
Hibridização de amostras preparadas em STM e amostras em PreservCyt e amostras de pellets de células após gradiente em SurePath preparadas manualmente.....	52
Hibridização utilizando uma microplaca e o Microplate Heater I	53
Hybridization using microtubes and waterbath	55
Captura híbrida	57
Deteção híbrida	58
Lavagem	60
Método do Automated Plate Washer.....	60
Método de lavagem manual.....	61
Amplificação do sinal.....	62
Medir a microplaca de captura e gerar resultados.....	62
Interpretação de resultados.....	64
Resultados do teste de amostras em STM	64
Resultados do teste de amostras SurePath	64
Resultados do teste de amostras em PreservCyt.....	64
Quociente URL/valor de corte próximo de 1,0	65
Outros tipos de HPV	65
Verificação da calibração do ensaio	65
Calibrador negativo	66
Calibrador positivo	66
Média do calibrador positivo /média do calibrador negativo	66
Cálculo de corte	67
Controlo de qualidade.....	67
Limitações.....	68
Características de desempenho.....	70
Desempenho clínico durante o rastreio de doentes com resultados normais no esfregaço de Papanicolau como auxiliar na avaliação de risco para a gestão de doentes	70
Desempenho clínico durante o rastreio de doentes com resultados ASC-US no esfregaço de Papanicolau para determinar a necessidade de envio para colposcopia	75

Sensibilidade e especificidade clínicas para a determinação do risco de doença de alto grau em mulheres com amostras citológicas que demonstram LSIL ou HSIL.....	78
Desempenho de colheita vaginal ou auto-colheita	81
Sensibilidade analítica.....	82
Equivalência entre tipos de amostras	83
Equivalência entre as amostras em meio de transporte de amostras (STM) e em solução PreservCyt (PC)	83
Equivalência entre a preparação manual de amostras em PreservCyt e a preparação de amostras em PreservCyt com o kit QIAasymphony DSP HPV Media.....	83
Equivalência entre a preparação manual de amostras em PreservCyt e a preparação de amostras em PreservCyt com o kit QIAasymphony DSP AXpH DNA	84
Equivalência entre STM e preparação manual de amostras de pellet de células após gradiente em SurePath.....	85
Equivalência entre a preparação manual de amostras de pellet de células após gradiente em SurePath e a preparação de amostras em SurePath com o kit QIAasymphony DSP HPV Media.....	86
Equivalência entre a preparação manual de amostras de pellet de células após gradiente em SurePath e a preparação de amostras de pellet de células após gradiente em SurePath com o kit QIAasymphony DSP HPV Media.....	87
Concordância entre métodos de teste	88
Reprodutibilidade.....	92
Reprodutibilidade geral do teste manual	92
Reprodutibilidade com amostras clínicas em STM.....	93
Reprodutibilidade de amostras clínicas em PreservCyt.....	96
Reprodutibilidade de amostras clínicas em SurePath	108
Reatividade cruzada	113
Hibridização cruzada	115
Efeito do sangue e outras substâncias nas amostras STM.....	116
Efeito do sangue e outras substâncias nas amostras em solução PreservCyt	116
Preparação manual de amostras.....	116
Preparação de amostras com o kit QIAasymphony DSP HPV Media	117
Preparação de amostras com o kit QIAasymphony DSP AXpH DNA.....	117
Efeito do sangue e outras substâncias nas amostras em SurePath.....	118

Preparação de amostras em SurePath com o kit QIAasymphony DSP HPV Media....	118
Carry-over (contaminação cruzada)	120
Estabilidade do reagente no sistema	122
Referências	124
Símbolos	129
Guia para a resolução de problemas	130
Verificação de contaminação do DR2	139
Verificação da contaminação do aparelho de lavagem e/ou origem da água.....	139
Verificação da contaminação do Automated Plate Washer	140
Informações de contacto	141

Utilização prevista

Para utilização em diagnósticos *in vitro* (IVD).

O *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test 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 detecção qualitativa de 13 tipos de ADN do Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco em amostras cervicais e vaginais.

As amostras cervicais e vaginais que podem ser testadas com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test incluem:

- Amostras cervicais colhidas por um médico com o *digene* HC2 DNA Collection Device
- Amostras vaginais colhidas pela própria paciente com o *digene* HC2 DNA Collection Device
- Biopsias colhidas no *digene* Specimen Transport Medium (STM, meio de transporte de amostras)
- Amostras colhidas utilizando um dispositivo de recolha tipo vassoura ou uma combinação de escova/espátula e colocadas em solução PreservCyt ou SurePath Preservative Fluid (fluido conservante SurePath)

A utilização do teste está indicada:

- Para a detecção 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, 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 *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test irá ajudar o médico no diagnóstico, ao constituir um complemento na avaliação dos riscos para as mulheres para determinar a ausência de doença de alto grau.

Summary and Explanation

A presença de determinados tipos de HPV no trato genital feminino está associada a diversas doenças, incluindo condiloma, doença de Bowen, neoplasia e carcinoma intraepitelial do colo do útero, 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 reconhecido para o desenvolvimento do cancro do colo do útero (4–8).

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 do ADN do HPV.

Historicamente, o HPV 16 e o HPV 18 têm sido considerados como HPV de alto risco associados ao cancro (8–10). Ficou demonstrado que os tipos de HPV 31, 33 e 35 têm uma associação intermédia com o cancro (2,11–14). Esta associação intermédia deve-se ao facto de que estes tipos serem detetados com maior frequência em lesões intraepiteliais escamosas de alto grau do que em cancros. Por conseguinte, a indução de cancros devido à presença destes tipos é menos provável do que quando se verifica a presença de tipos de ADN do HPV de alto risco (15). Estes cinco tipos de HPV em conjunto são responsáveis por cerca de 73% das infeções por HPV (16, 17). Outros tipos de HPV, incluindo os tipos 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 foram identificados como os principais identificadores do HPV nas restantes lesões (17–27). Estes tipos de HPV também podem ser classificados em grupos de risco intermédio e alto, com base na sua distribuição relativa em várias categorias de diagnósticos histopatológicos (16, 17, 24–28).

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, 16, 29). 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 (30, 31). 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 (30).

Informação sobre o agente patogénico

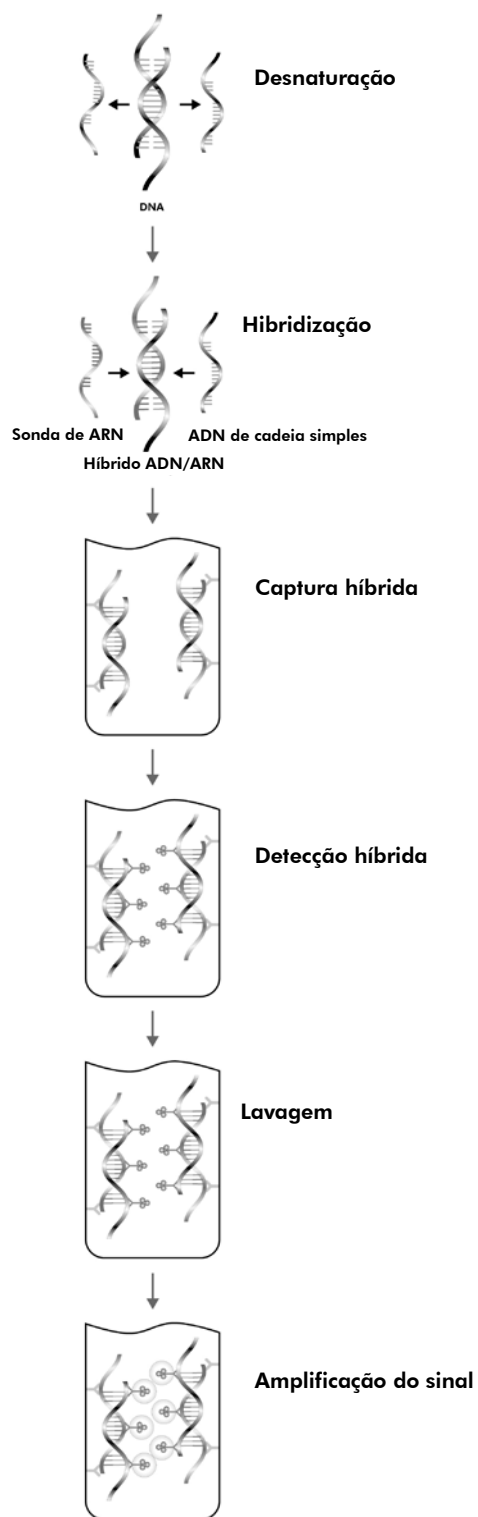
Os papilomavírus humanos são compostos por uma partícula viral icosaédrica (virião) que contém uma molécula circular de ADN de cadeia dupla com cerca de 8000 pares de base, rodeada por uma cápside proteica. Após a infeção das células epiteliais, o ADN viral estabelece-se em toda a espessura do epitélio, 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 episomais ou integradas, dependendo do tipo e do grau da lesão.

Princípio do procedimento

O *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, que utiliza a tecnologia HC2, é um ensaio de hibridização de ácidos nucleicos com amplificação do sinal que utiliza a deteção 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. A cada híbrido capturado ligam-se vários anticorpos conjugados, o que resulta numa considerável amplificação do sinal. Por cada anticorpo, são conjugadas diversas moléculas de fosfatase alcalina. À medida que o substrato é clivado pela fosfatase alcalina associada, é emitida uma luz que é medida em unidades relativas de luz (URL) por um instrumento *digene* microplaca Luminometer (DML). A intensidade da luz emitida indica a presença ou ausência de ADN alvo na amostra.

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

Fluxo de trabalho da captura híbrida



Preparação da amostra utilizando o QIAAsymphony SP

A preparação automatizada de amostras em PreservCyt pode ser levada a cabo utilizando o QIAAsymphony SP com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media ou com o kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA.

Preparação de amostras com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media

O kit QIAAsymphony DSP HPV Media oferece os extratos de amostras sobre a microplaca de hibridização que estão prontos para testes automatizados usando o Rapid Capture® System (RCS) com o digene HC2 High-Risk HPV DNA Test. O QIAAsymphony SP efetua todos os passos do procedimento de preparação da amostra para até 88 amostras, em lotes de até 24, numa única corrida.

O QIAAsymphony SP processa 88 amostras PreservCyt em 2 horas e 15 minutos, sem que seja necessária a intervenção do utilizador depois de o instrumento ser carregado com amostras.

O QIAAsymphony SP processa 88 amostras SurePath em 1 hora e 45 minutos, sem que seja necessária a intervenção do utilizador depois de o instrumento ser carregado com amostras. A preparação de amostras com o QIAAsymphony SP é seguida de imediato por uma incubação de 90 minutos dos extratos das amostras na microplaca de hibridização num aquecedor de microplacas. Durante a incubação dos extratos de amostras, os calibradores e os controlos da qualidade são desnaturados em separado num banho-maria, sendo depois pipetados manualmente para dentro da primeira coluna da microplaca de hibridização, uma vez concluída a incubação do extrato da amostra. A preparação de amostras em SurePath com o QIAAsymphony SP e o kit QIAAsymphony DSP HPV Media pode ser realizada antes do início do processamento de citologia ou depois da sua conclusão.

Importante: Os extratos das amostras produzidos em resultado da preparação das amostras em PreservCyt e SurePath através do kit QIAAsymphony DSP HPV Media só podem ser testados com o RCS. O desempenho manual do teste com extratos de amostras não está validado.

Durante a preparação automatizada de amostras utilizando o QIAAsymphony, consultar os manuais do utilizador aplicáveis do QIAAsymphony e as instruções de utilização do kit QIAAsymphony DSP HPV Media (manual) (*QIAAsymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)*), para além destas instruções de utilização, para obter as informações descritivas e processuais necessárias.

Preparação de amostras com o kit QIAasymphony DSP AXpH DNA

O QIAasymphony DSP AXpH DNA Kit facilita eluatos de ADN na microplaca de hibridização que estão prontos para o teste manual ou automatizado no RCS com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. O QIAasymphony SP efetua todos os passos do procedimento de preparação da amostra para até 88 amostras, em lotes de até 24, numa única corrida. O QIAasymphony SP processa 88 amostras em 4 horas e 30 minutos, sem que seja necessária a intervenção do utilizador depois de o instrumento ser carregado com amostras.

Durante a preparação automatizada de amostras utilizando o QIAasymphony, consultar os manuais do utilizador aplicáveis do QIAasymphony e o manual do kit QIAasymphony DSP AXpH DNA (*QIAasymphony DSP AXpH DNA Kit Handbook*), para além destas instruções de utilização, para obter as informações descritivas e processuais necessárias.

Realização de testes utilizando o Rapid Capture System

Os testes de alta produção e elevado volume com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test podem ser efetuados utilizando o RCS. O kit de 4 placas (4 plate kit, n.º de catálogo 618111) só pode ser usado com o RCS e não pode ser usado para testes manuais.

O RCS é um sistema de diluição e pipetagem automatizado de utilização geral que pode ser utilizado com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test para testes de alta produção e elevado volume. Este sistema processa até 352 amostras em 8 horas, incluindo um período de 3,5 horas durante o qual não é necessária intervenção do utilizador; podem ser gerados resultados de até 704 amostras em 13 horas.

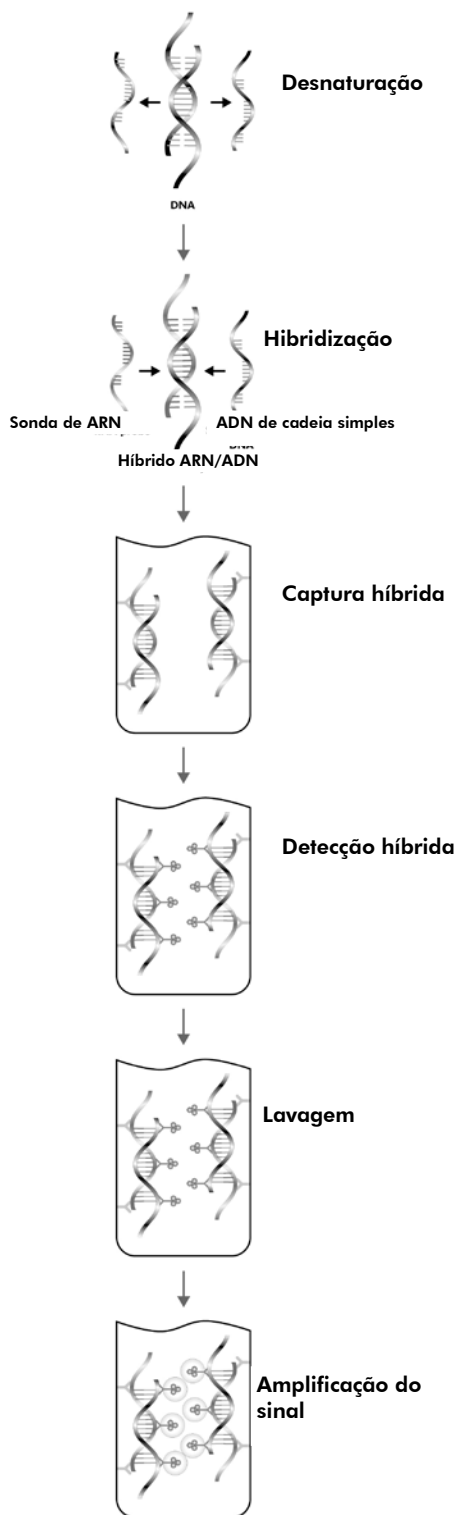
A preparação de amostras é realizada independentemente do RCS antes da colocação na plataforma do RCS. Além disso, a deteção quimioluminescente do sinal e a apresentação de resultados são efetuadas utilizando um instrumento DML offline comum aos testes manuais e automatizados no RCS.

Cada um dos passos do *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test são levados a cabo exatamente como na sequência do teste manual. O RCS permite o processamento escalonado de até 4 microplacas, sendo que cada microplaca contém amostras, os calibradores de teste e controlos de qualidade necessários.

Durante a realização de testes automatizados no RCS, consultar o manual do utilizador do Rapid Capture System (*Rapid Capture System User Manual*) e o manual do utilizador do Rapid Capture System — Realização de testes *digene* HC2 DNA usando amostras processadas

QIAAsymphony SP (*Rapid Capture System User Manual — Performing digene HC2 DNA Tests Using QIAAsymphony SP Processed Samples*), para além destas instruções de utilização, a fim de obter as informações descritivas e processuais necessárias

Flujo de trabajo de la captura de híbridos



Preparação manual de amostras

Preparação automatizada no Rapid Capture System

Materiais fornecidos

Kit de 1 placa

Há 96 testes no *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test de uma placa (1 plate *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, n.º de catálogo 5197-1330).

Durante a realização de testes manuais com o kit de 1 placa, o menor número de testes recomendado para cada utilização é 24. Se pretender utilizar menos de 24 testes, o número total de testes por kit pode ser reduzido devido aos volumes limitados de reagente. O número de resultados das doentes irá variar, dependendo do número de utilizações por kit, conforme especificado a seguir:

Número de utilizações	Número de resultados de doentes
1	88
2	80
3	72
4	64

Durante a realização de testes automatizados no RCS com o kit de 1 placa, a utilização do kit completo requer a realização de testes utilizando uma microplaca completa (88 amostras) por corrida do RCS. A realização de testes em microplaca parcial é aceitável. No entanto, todo o kit é utilizado devido ao volume morto necessário para a operação do instrumento.

Kit de 4 placas

Há 384 testes no *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test de quatro placas (4 plate *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, n.º de catálogo 618111).

O kit de 4 placas só pode ser usado para os testes automatizados no RCS. Para alcançar 384 testes, tem de ser usado o kit de 4 placas em 1 ou 2 corridas no RCS. Se for desejável menos de 2 corridas, o número total de testes por kit pode ser reduzido devido aos volumes limitados de reagente.

Conteúdo do kit

<i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA Test		
N.º de catálogo	5197-1330	618111
Número de testes	96	384
Indicator Dye (corante indicador) Contém 0,05% (p/v) de azida de sódio	0.35 ml	2.0 ml
Denaturation Reagent* (reagente de desnaturação) Diluir numa solução de hidróxido de sódio (NaOH)	50 ml	2 x 100 ml
Probe Diluent* (diluente de sonda) Solução tamponada com 0,05% (p/v) de azida de sódio	5 ml	20 ml
High-Risk HPV Probe (sonda de HPV de alto risco) Sonda de ARN do HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 em solução tamponada (tampa vermelha)	200 µl	3 x 200 µl
Low-Risk HPV Quality Control (controlo de qualidade do HPV de baixo risco) 5 pg/ml (500 000 cópias/ml) de ADN clonado de HPV 6 e ADN portador em STM com 0,05% (p/v) de azida de sódio.	1 ml	1 ml
High-Risk HPV Quality Control (controlo de qualidade do HPV de alto risco) 5 pg/ml (500 000 cópias/ml) de ADN clonado de HPV 16 e ADN portador em STM com 0,05% (p/v) de azida de sódio	1 ml	1 ml
Negative Calibrator (calibrador negativo) ADN portador em STM com 0,05% (p/v) de azida de sódio	2 ml	2 ml
High-Risk HPV Calibrator (calibrador de HPV de alto risco) 1 pg/ml de ADN clonado de HPV 16 e ADN portador em STM com 0,05% (p/v) de azida de sódio	1 ml	2 ml
Capture Microplate (microplaca de captura) Revestida com anticorpos de híbridos anti-ARN/ADN policlonais de cabra	1	4
Detection Reagent 1 (reagente de deteção 1) Anticorpos conjugados de fosfatase alcalina para híbridos de ARN/ADN em solução tamponada com 0,05% (p/v) de azida de sódio	12 ml	40 ml

<i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA Test		
N.º de catálogo	5197-1330	618111
Número de testes	96	384
Detection Reagent 2 (reagente de deteção 1)	12 ml	40 ml
CDP-Star® com Emerald II (substrato quimioluminescente)		
Wash Buffer Concentrate* (concentrado de tampão de lavagem)	100 ml	2 x 100 ml
Contém 1,5% (p/v) de azida de sódio		

*Consultar "Avisos e precauções", página 23, para obter informações relativas à saúde e segurança

Materiais necessários, mas não fornecidos

Importante: Assegurar que os instrumentos usados neste procedimento foram verificados e calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.

Equipamento e materiais para diagnóstico in vitro

Na QIAGEN apenas se encontra disponível equipamento e materiais validados com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

- *digene* Hybrid Capture 2 System ("sistema *digene* HC2"), composto por um luminómetro 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 sistema HC2 *digene* (*digene* HC2 System User Manual)
- Hybrid Capture System Rotary Shaker I
- Hybrid Capture System Microplate Heater I
- Hybrid Capture System Automated Plate Washer
- Hybrid Capture System Multi-Specimen Tube (MST) Vortexer 2 *
- Suporte de conversão e respetiva tampa (opcional)*
- Suporte de amostra e respetiva tampa *digene** (opcional)
- EXPANSÃO para 4 pipetas e suporte (opcional) †
- Dispensador de seladores de tubos e dispositivo de corte (opcional, utilizado com o MST Vortexer 2)
- Rapid Capture System (necessário para a utilização com o kit de 4 placas; opcional para o kit de 1 placa)
- Aparelho de lavagem
- Microplacas de hibridização
- Tampas das microplacas
- Tiras de poços de microplacas do RCS*
- Cubas para reagentes do RCS*

* Necessário para efetuar testes automatizados no RCS.

† Item personalizado utilizado para transferir amostras em STM para a microplaca de hibridização. Podem ser utilizadas outras pipetas multicanal, expansíveis personalizadas, desde que se obtenha um espaço de 3,2 cm quando expandidas.

- Tampas das cubas para reagentes do RCS*
- Pontas descartáveis do RCS*
- Tampas de encaixe do RCS*
- Tampão N2†
- Tampão D2†
- Bandeja do dispositivo de lavagem RCS azul‡
- Pontas de pipetas extra longas
- Tubos de colheita de amostras
- Suporte para tubos de colheita de amostras
- Tampas roscadas dos tubos de colheita de amostras
- Reservatórios de reagente descartáveis
- Película seladora de tubos DuraSeal™
- Microtubos de hibridização§
- Suporte de microtubos§
- Seladores de placas§

Materiais e equipamento de uso geral em laboratório

- Recipiente para banho-maria a 65 ± 2 °C de tamanho suficiente para comportar um suporte de amostras (21 cm de largura x 32 cm de profundidade x 18 cm de altura)
- Microcentrífuga
- Vórtice com fixação de copo
- Pipeta de um canal; configuração variável para volumes de 20–200 µl e 200–1000 µl
- Pipeta de deslocamento positivo repetido, como a pipeta Eppendorf® Repeater®
- Pipetas de 8 canais: configuração variável para volumes de 25–200 µl
- Temporizador
- Solução de hipoclorito de sódio, 0,5% v/v
- Parafilm® ou equivalente
- Pontas de pipeta descartáveis com barreiras para aerossóis para pipetas de um canal (volumes de 20–200 µl e 200–1000 µl)
- Pontas descartáveis para pipetas de deslocamento positivo repetido (12,5, 5, 2,5 e 1,25 ml)

* Necessário para efetuar testes automatizados no RCS.


† Necessário para a realização de testes com amostras preparadas com o kit QIA Symphony DSP AXP DNA.


‡ Necessário para a realização de testes automatizados no RCS de amostras processadas com o kit QIA Symphony DSP HPV Media.


§ Necessários para a hibridização com microtubos e banho-maria.

-
- Pontas descartáveis para pipetas de 8 canais (25–200 µl)
 - Lenços Kimtowels® ou toalhetes de papel com liberação reduzida de pelo equivalentes
 - Capa descartável para bancada
 - Luvas descartáveis isentas de pó
 - Tubos de 5 ml e/ou 15 ml em polipropileno com base redonda e tampa de encaixe
 - Suporte para alojar tubos de 10 ml ou 15 ml
 - Tubos cónicos em polipropileno de 50 ml


Materiais e equipamentos adicionais para a preparação de amostras em PreservCyt

 Consultar as instruções de utilização do kit QIAasymphony DSP HPV Media (manual) (*QIAasymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)*) para a preparação automatizada de amostras com o kit QIAasymphony DSP HPV Media.

 Consultar o manual do kit QIAasymphony DSP AXpH DNA (*QIAasymphony DSP AXpH DNA Kit Handbook*) para a preparação automatizada de amostras com o kit QIAasymphony DSP AXpH DNA.

 Consultar as instruções de utilização do kit *digene* HC2 Sample Conversion relativas à preparação manual de amostras.

Materiais e equipamentos adicionais para a preparação de amostras em SurePath.

 Consultar as instruções de utilização do kit QIAasymphony DSP HPV Media (manual) (*QIAasymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)*) para a preparação automatizada de amostras com o kit QIAasymphony DSP HPV Media

Manual SurePath sample preparation requires the following additional equipment and materials:

- Centrífuga de cabeça oscilante capaz de atingir $800 \pm 15 \times g$ e de receber tubos de centrífuga cónicos em polipropileno de 15 ml
- *digene* HC2 Sample Conversion Tubes (tubos de conversão de amostras HC2 *digene*) * ou tubos de polipropileno de 15 ml VWR® ou Corning®

Importante: Os tubos de conversão de amostras HC2 *digene* disponíveis na QIAGEN têm de ser utilizados com o MST Vortexer 2 ou o RCS.

- Pipetas de transferência de 7 ml com pontas padrão ou equivalente
- *digene* Specimen Transport Medium

* Os tubos de conversão de amostras HC2 *digene* disponíveis na QIAGEN têm de ser utilizados com o MST Vortexer 2 ou o RCS.

Avisos e precauções

Para utilização em diagnóstico in vitro.

Ler atentamente todas as instruções antes de utilizar o teste.

Advertências

Ao trabalhar com produtos químicos, usar sempre equipamento de laboratório adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consultar as fichas de dados de segurança (MSDSs) adequadas. Estas estão disponíveis online no formato PDF, prático e compacto, no endereço www.qiagen.com/safety, onde poderá encontrar, visualizar e imprimir as MSDSs para cada kit QIAGEN e respetivos componentes.

Amostras

CUIDADO **Risco de agentes infecciosos**



As amostras poderão conter agentes infecciosos e deverão ser manuseadas em conformidade. Considerar todas as amostras como potencialmente infecciosas.

Nenhum método de teste conhecido poderá garantir em absoluto que as amostras não irão transmitir infeções. Recomenda-se que as amostras de origem humana sejam manuseadas de acordo com as práticas de biossegurança nacionais e locais aplicáveis. 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:

- Não pipetar com a boca.
- Não fumar, comer ou beber nas áreas onde se manuseiam reagentes ou amostras.
- Usar luvas descartáveis sem pó de talco durante o manuseamento de reagentes ou amostras. Lavar bem as mãos depois de realizar a análise.
- Limpar e desinfetar todos os vestígios de amostras com um desinfetante tuberculocida, tal como hipocloreto de sódio a 0,5% p/v ou outro desinfetante adequado (32,).
- Descontaminar e eliminar todas as amostras, reagentes ou outros materiais potencialmente contaminados, em conformidade com os regulamentos locais e nacionais.

Após desnaturação e incubação, as amostras deixam de ser consideradas infecciosas (34); no entanto, o pessoal do laboratório deverá cumprir ainda as precauções indicadas a nível local e nacional.

Azida de sódio

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. 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% p/v de hidróxido de sódio.
3. Deixar repousar durante 16 horas.
4. Deixar correr água abundantemente.

Tampão N2

CUIDADO

Risco de compostos altamente reativos



Não adicionar lixívia ou soluções ácidas diretamente em qualquer solução ou resíduos que contenham tampão N2.

O Buffer N2 (tampão N2) contém hidrocloreto de guanidina, que pode formar compostos altamente reativos quando combinados com lixívia.

Em caso de derramamento de algum líquido contendo os tampões referidos, limpar com detergentes apropriados para utilização em laboratório e água. Se o líquido derramado contiver agentes potencialmente infecciosos, limpar a área afetada primeiramente com detergente apropriado para utilização em laboratório e água e, depois, com 1% (v/v) de solução de hipoclorito de sódio.

Testes automatizados no RCS

Consultar o manual do utilizador do sistema Rapid Capture (*Rapid Capture System User Manual*) para obter avisos e precauções adicionais específicos à utilização desse sistema para testes de alta produção e elevado volume.

Declarações de segurança e risco para componentes

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

Wash Buffer Concentrate (Concentrado de tampão de lavagem)



Contém: Sodium azide. Atenção! Nocivo por ingestão. Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. Evitar a libertação para o ambiente. Eliminar o conteúdo/ recipiente em instalação aprovada de destruição de resíduos.

Denaturation Reagent (Reagente de desnaturação)



Contém: sodium hydroxide. Perigo! Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. Pode ser corrosivo para os metais. Eliminar o conteúdo/ recipiente em instalação aprovada de destruição de resíduos. SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe 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. Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. Armazenar em local fechado à chave. Usar luvas de protecção/ vestuário de protecção/ protecção ocular/ protecção facial.

Probe Diluent (Diluyente de sonda)



Contém: acetic acid; Polyacrylic acid. Perigo! Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. Eliminar o conteúdo/ recipiente em instalação aprovada de destruição de resíduos. SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe 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. Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. Armazenar em local fechado à chave. Usar luvas de protecção/ vestuário de protecção/ protecção ocular/ protecção facial.

High-Risk HPV Calibrator (calibrador de HPV de alto risco)

Aviso! Provoca uma ligeira irritação cutânea. Se ocorrer irritação cutânea: Consultar/ver imediatamente um médico.

High-Risk HPV Quality Control (controlo de qualidade do HPV de alto risco)

Atenção! Causa uma irritação suave da pele. Em caso de irritação cutânea: consulte um médico.

Low-Risk HPV Quality Control (controlo de qualidade do HPV de baixo risco)


Atenção! Causa uma irritação suave da pele. Em caso de irritação cutânea: consulte um médico.

Negative Calibrator (calibrador negativo)

Atenção! Causa uma irritação suave da pele. Em caso de irritação cutânea: consulte um médico.

Precauções

O utilizador deve obedecer sempre às precauções que se seguem durante a realização do teste *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test:

- Não utilizar os reagentes depois do prazo de validade indicado junto ao símbolo  no rótulo da embalagem exterior ou do prazo de validade dos reagentes preparados.
- A realização do teste fora do tempo e intervalo de temperaturas indicados poderá dar origem a resultados inválidos. Os testes que não estejam dentro do tempo e intervalos de temperatura indicados são inválidos e devem ser repetidos.
- O procedimento, calibração do ensaio, controlo de qualidade e interpretação dos resultados da amostra com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test devem ser rigorosamente seguidos para obter resultados fiáveis no teste.
- É importante pipetar exatamente o volume de reagente indicado e misturar bem após a adição de cada reagente. Caso contrário, poderá obter resultados errados. Assegurar que as alterações de cor detetadas confirmam que estas condições foram satisfeitas.
- À exceção do concentrado de tampão de lavagem, os componentes do kit foram testados como uma unidade. Não trocar componentes de outras origens ou de lotes diferentes. No entanto, é aceitável combinar componentes de kits com o mesmo número de lote a fim de obter os volumes de reagente necessários para testar várias microplacas numa única utilização do RCS.
- 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 teste.
- Garantir que se evita a contaminação da microplaca de captura e do reagente de deteção 2 (DR2) com fosfatase alcalina exógena durante a realização do teste. As substâncias que podem conter fosfatase alcalina incluem o reagente de deteção 1 (DR1), bactérias, saliva, cabelo e óleos da pele. Cobrir a microplaca de captura após o passo de lavagem e durante a incubação do DR2 é particularmente importante porque a fosfatase alcalina exógena poderá reagir com o DR2, produzindo resultados falso-positivos.
- Proteger o DR2 contra a exposição prolongada a luz direta. Utilizar o DR2 imediatamente após a criação de alíquotas e evitar a luz direta do sol.
- Preparar a pipeta repetida antes da aplicação de reagente e verificar periodicamente a existência de bolhas de ar. Quantidades excessivas de bolhas de ar grandes na ponta da pipeta repetida poderá resultar numa aplicação incorreta e poderá ser evitado enchendo a pipeta, distribuindo todo o líquido e voltando a encher. Consultar instruções específicas de utilização no manual do utilizador da pipeta.

- Realizar a pipetagem multicanal utilizando a técnica de pipetagem inversa (consultar “Detecção híbrida”, página 58) para distribuir DR1 e DR2. Verificar a ponta de cada pipeta na pipeta multicanal quanto a um encaixe e enchimento corretos.
- Certificar-se de que cada poço da microplaca de captura é minuciosamente lavado (consultar “Lavagem”, página 60). Uma lavagem inadequada irá resultar no aumento do fundo e poderá provocar resultados falso-positivos. Os resíduos de tampão de lavagem nos poços da microplaca de captura poderão resultar na redução do sinal ou numa fraca reprodutibilidade.

Armazenamento e manuseamento de reagentes

Componentes do kit

Após a receção, guardar o kit a uma temperatura de 2–8 °C. Se desejar, o concentrado de tampão de lavagem, o reagente de desnaturação e o corante indicador poderão ser armazenados a uma temperatura de 2–30 °C. Todos os reagentes são fornecidos prontos a utilizar, à exceção do reagente de desnaturação (DNR), da mistura para sonda e do tampão de lavagem.

Reagentes preparados

Assim que esteja preparado, o DNR mantém-se estável durante 3 meses a 2–8 °C.

Uma vez preparado, o tampão de lavagem mantém-se estável durante três meses, quando armazenado a uma temperatura de 2–30 °C.

Se as amostras de teste em PreservCyt forem processadas com o kit QIAasymphony DSP HPV Media ou o kit QIAasymphony DSP AXpH DNA, os calibradores e controlos de qualidade abertos e não desnaturados mantêm-se estáveis durante 3 meses a uma temperatura de 2–8 °C.

Se as amostras de teste forem processadas com o kit QIAasymphony DSP AXpH DNA, o reagente de desnaturação 2 (DNR2) preparado mantém-se estável durante 8 horas a 15–30 °C.

Colheita e preparação de amostras

Colher e transportar as amostras cervicais e vaginais para a realização de testes com o digene HC2 High-Risk HPV DNA Test utilizando um dos seguintes dispositivos de amostragem:

- *digene* HC2 DNA Collection Device (composto por uma escova cervical e STM)

- Biopsias colhidas em *digene* STM
- Um dispositivo de colheita tipo escova ou um dispositivo de colheita combinado escova/espátula colocado em solução PreservCyt ou SurePath Preservative Fluid

As amostras colhidas com outros dispositivos de amostragem ou transportadas num outro meio de transporte não foram qualificadas para utilização com este teste. As características de desempenho deste teste foram estabelecidas apenas com os kits de colheita indicados.

O *digene* HC2 DNA Collection Device não deve ser utilizado para mulheres grávidas. 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 obter procedimentos adicionais de colheita e manuseamento de amostras.

As amostras cervicais e vaginais colhidas em STM não requerem a conversão da amostra antes do teste com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. As amostras em PreservCyt e SurePath requerem a conversão da amostra antes do teste com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Amostras cervicais e vaginais em STM

Importante: Não proceder à colheita de uma amostra cervical ou vaginal em STM se estiverem presentes elevadas concentrações de creme antifúngico, gel contraceptivo ou água do duche.

As amostras STM podem ser mantidas até 2 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 os ensaios forem realizados no prazo de uma semana. Se o ensaio for realizado após uma semana, cobrir as tampas do tubo da amostra com Parafilm e armazenar as amostras a –20 °C durante até 3 meses. Ao retirar as amostras do congelador para realizar os testes, substituir as tampas imediatamente com tampas roscadas para tubos de colheita de amostras.

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.

Biopsias cervicais

As biopsias cervicais acabadas de colher com 2–5 mm em corte transversal podem ser testadas com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Não utilizar biopsias com menos de 2 mm de diâmetro. Colocar imediatamente a amostra de biopsia em 1,0 ml de STM, cobrir a tampa do tubo da amostra com Parafilm, para evitar que a tampa salte, e guardar congelada a –20 °C. Expedir as amostras de biopsia a 2–30 °C para a entrega de um dia para o outro no laboratório de análises.

No local onde irá ser realizado o teste, armazenar a –20 °C até ao processamento. Ao retirar as amostras do congelador para realizar os testes, substituir as tampas imediatamente com tampas roscadas para tubos de colheita de amostras.

Amostras cervicais em solução PreservCyt

- **Importante** Não colher uma amostra cervical em PreservCyt para preparação de amostras com o kit QIASymphony DSP HPV Media se estiverem presentes elevadas concentrações de creme antifúngico, gel lubrificante vaginal ou sangue.
- **Importante** Não colher uma amostra cervical em PreservCyt para preparação de amostras com o kit QIASymphony DSP AXpH DNA se estiver presente gel contraceptivo.

Colher as amostras do modo de rotina e preparar as lâminas do ThinPrep® Pap Test de acordo com as instruções de utilização fornecidas pelo fabricante.

Após a colheita, guardar as amostras em PreservCyt durante até 3 meses a 2–30 °C antes da preparação de amostras para o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. As amostras em PreservCyt não podem ser congeladas.

The following methods are available for sample preparation:

Os métodos que se seguem encontram-se disponíveis para a preparação de amostras:

- Preparação automatizada de amostras utilizando o QIASymphony SP e o kit QIASymphony DSP HPV Media.
O resultado é um extrato de amostras, contendo partículas magnéticas, STM e DNR, pronto para avançar para o passo de desnaturação do teste.
- Preparação automatizada de amostras utilizando o QIASymphony SP e o kit QIASymphony DSP AXpH DNA.
O resultado é um ADN eluído pronto a avançar para o passo de desnaturação do teste.
- Preparação manual de amostras utilizando o *digene* HC2 Sample Conversion Kit.

O resultado da preparação manual de amostras é uma amostra desnaturada pronta a avançar para o passo de hibridização do teste.

Os requisitos do volume da amostra baseiam-se no método de preparação de amostras da seguinte forma:

- Para a preparação automatizada de amostras com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media são necessários 3 ml de amostra
- Para a preparação automatizada de amostras com o kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA são necessários 4 ml de amostra
- Para a preparação automatizada de amostras com o kit *digene* HC2 Sample Conversion são necessários 4 ml de amostra

As amostras com menos do volume necessário depois do teste de Papanicolau ter sido preparado contêm material insuficiente para os testes e poderão originar um resultado falso-negativo no *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Amostras cervicais em SurePath Preservative Fluid

Importante: Não colher uma amostra cervical em SurePath para preparação de amostras com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media se estiverem presentes gel contraceutivo, creme antifúngico ou creme anti-inflamatório.

Recolher as amostras em SurePath Preservative Fluid de acordo com as respetivas instruções de utilização.

A preparação de amostras em SurePath pode ser realizada antes do início do processamento de citologia ou depois da sua conclusão.

Se for realizada antes do início do processamento de citologia, usar uma amostra do original em SurePath que não tenha sido processada com nenhum outro método de diagnóstico, incluindo o BD PrepMate® System e o BD PrepStain® Slide Processor. Nestas instruções de utilização, estas amostras são referidas como "amostras em SurePath" para evitar confusões.

Se for realizada depois de concluído o processamento de citologia, usar uma amostra do pellet de células após gradiente em SurePath restante depois da preparação da amostra em SurePath, de acordo com as instruções do BD PrepMate System e do BD PrepStain Slide Processor. Nestas instruções de utilização, estas amostras são referidas como "amostras do pellet de células após gradiente em SurePath" para evitar confusões.

Os métodos que se seguem encontram-se disponíveis para a preparação de amostras:

- Preparação automatizada de amostras em SurePath utilizando o QIAAsymphony SP e o kit QIAAsymphony DSP HPV Media.
O resultado é um extrato de amostras contendo partículas magnéticas, STM e DNR pronto para avançar para o passo de hibridização do teste.
- Preparação automatizada de amostras do pellet de células após gradiente em SurePath utilizando o QIAAsymphony SP e o kit QIAAsymphony DSP HPV Media.
O resultado é um extrato de amostras contendo partículas magnéticas, STM e DNR pronto para avançar para o passo de hibridização do teste.
- Preparação manual de amostras do pellet de células após gradiente em SurePath.
O resultado da preparação manual de amostras é uma amostra desnaturada pronta a avançar para o passo de hibridização do teste.

Os requisitos do volume da amostra baseiam-se no método de preparação de amostras da seguinte forma:

Para a preparação automatizada de amostras com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media são necessários 950 µl

Para a preparação manual de amostras são necessários 2,8 ml da amostra do pellet de células após gradiente em SurePath

A utilização de um volume inferior ao necessário poderia originar um resultado falso-negativo no *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Preparação automatizada de amostras em SurePath

Após a colheita, guardar as amostras em SurePath durante até 4 semanas a 5-25 °C antes da preparação de amostras com o QIAAsymphony SP e o kit QIAAsymphony DSP HPV Media. A amostra em SurePath usada não pode ter sido processada com nenhum outro método de diagnóstico, incluindo o BD PrepMate e o BD PrepStain Slide Processor. Para a preparação automatizada de amostras são necessários 950 µl da amostra em SurePath.

Preparação automatizada de amostras do pellet de células após gradiente em SurePath

Importante: Imediatamente a seguir à preparação da lâmina SurePath Pap, pipetar 2,0 ml de SurePath Preservative Fluid para dentro do tubo da centrífuga com o pellet de células após gradiente. Isto conserva a integridade do pellet de células após gradiente para o desempenho do *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

O pellet de células após gradiente com SurePath Preservative Fluid pode ser armazenado durante até 4 semanas a 5–25 °C antes da preparação das amostras para o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Para a preparação automatizada de amostras são necessários 950 µl do pellet de células após gradiente em SurePath.

Preparação manual de amostras do pellet de células após gradiente em SurePath

Importante: Imediatamente a seguir à preparação da lâmina SurePath Pap, pipetar 2,0 ml de SurePath Preservative Fluid 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 *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

O pellet de células após gradiente com SurePath Preservative Fluid pode ser armazenado durante até 4 semanas a 2–30 °C antes da preparação das amostras para o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

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

Passos a seguir antes de começar

- Para o teste manual, deixar passar, pelo menos, 60 minutos até o Microplate Heater I estabilizar a uma temperatura de $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ a partir de uma temperatura inicial fria. Se não respeitar este período de aquecimento, a microplaca de hibridização pode derreter. Consultar o manual do utilizador do Microplate Heater I (*Microplate Heater I User Manual*) para obter mais instruções.
- Se se utilizar um banho-maria durante os passos de desnaturação e hibridização, certificar-se de que o banho-maria está a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ e que o nível de água é adequado para mergulhar todo o volume da amostra no tubo.

Preparação de reagentes

- Retirar todas as amostras e todos os reagentes necessários do frigorífico antes de iniciar o teste. Deixar que atinjam a temperatura de $20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15–30 minutos. Preparar as amostras em PreservCyt e SurePath antes elevar a temperatura de quaisquer amostras e reagentes anteriormente desnaturados até à temperatura ambiente.
- Se forem combinados reagentes prontos a utilizar para uma corrida no RCS com várias placas, misturar os frascos individuais minuciosamente e depois combinar o volume aplicável de reagente num tubo cónico de polipropileno limpo e descartável.
- Para a realização de testes manuais, os reagentes tampão de lavagem e mistura para sonda são preparados durante determinados passos do teste. Para testes automatizados no RCS, todos os reagentes são preparados antes de se iniciar o ensaio no RCS e são colocados na plataforma do RCS.
- Preparar o DNR e o DNR2, conforme aplicável, antes de preparar outros reagentes.
- Descartar todos os reagentes preparados (salvo indicação em contrário) e alíquotas de reagentes no final do teste.
- Utilizar as tabelas 1–5, abaixo, para determinar o volume necessário para cada reagente com base no número de testes/microplacas e método de teste. Os volumes para testes automatizados no RCS incluem o volume morto do reagente exigido pelo instrumento.

Tabela 1. Volumes necessários de reagentes preparados e prontos a usar para a realização de testes manuais em amostras em STM e amostras em PreservCyt e do pellet de células após gradiente em SurePath preparadas manualmente

Número de testes/tiras	Mistura para sonda	Tampão de lavagem	DR1	DR2
24/3	1.04 ml	>1 liter	3 ml	3 ml
48/6	2.08 ml	>1 liter	5 ml	5 ml
72/9	3.12 ml	>1 liter	7 ml	7 ml
96/12	4.16 ml	>1 liter	12 ml	12 ml

Tabela 2. Volumes necessários de reagentes preparados e prontos a usar para testes automatizados no RCS de amostras STM, amostras preparadas manualmente em PreservCyt e do pellet de células após gradiente em SurePath, e SurePath e amostras do pellet de células após gradiente em SurePath preparadas com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media

Número de microplacas	Mistura para sonda	Tampão de lavagem	DR1	DR2
≤1	5.20 ml	3 litros	10 ml	10 ml
≤1.5	6.24 ml	3 litros	14 ml	14 ml
≤2	8.32 ml	3 litros	18 ml	18 ml
≤2.5	9.36 ml	6 litros	22 ml	22 ml
≤3	10.40 ml	6 litros	26 ml	26 ml
≤3.5	12.48 ml	6 litros	30 ml	30 ml
≤4	13.52 ml	6 litros	34 ml	34 ml

Tabela 3. Volumes necessários de reagentes preparados e prontos a usar para testes automatizados no RCS de amostras em PreservCyt preparadas com o kit QIAasymphony DSP HPV Media

Número de microplacas	DNR	Mistura para sonda	Tampão de lavagem	DR1	DR2
≤1	2.2 ml	5.20 ml	3 litros	10 ml	10 ml
≤1.5	2.2 ml	6.24 ml	3 litros	14 ml	14 ml
≤2	2.4 ml	8.32 ml	3 litros	18 ml	18 ml
≤2.5	2.4 ml	9.36 ml	6 litros	22 ml	22 ml
≤3	2.6 ml	10.40 ml	6 litros	26 ml	26 ml
≤3.5	2.6 ml	12.48 ml	6 litros	30 ml	30 ml
≤4	2.8 ml	13.52 ml	6 litros	34 ml	34 ml

Tabela 4. Volumes necessários de reagentes preparados e prontos a usar para testes manuais de amostras em PreservCyt preparadas com o kit QIAasymphony DSP AXpH DNA

Número de testes/tiras	DNR	DNR2	Mistura para sonda	Tampão de lavagem	DR1	DR2
24/3	0.6 ml	1.0 ml	1.04 ml	>1 liter	3 ml	3 ml
48/6	0.6 ml	2.0 ml	2.08 ml	>1 liter	5 ml	5 ml
72/9	0.6 ml	2.5 ml	3.12 ml	>1 liter	7 ml	7 ml
96/12	0.6 ml	5.0 ml	4.16 ml	>1 liter	12 ml	12 ml

Tabela 5. Volumes necessários de reagentes preparados e prontos a usar para testes automatizado no RCS de amostras em PreservCyt preparadas com o kit QIAasympyony DSP AXpH DNA

Número de microplacas	DNR	DNR2	Mistura para sonda	Tampão de lavagem	DR1	DR2
≤1	2.2 ml	5.0 ml	5.20 ml	3 litros	10 ml	10 ml
≤1.5	2.2 ml	5.5 ml	6.24 ml	3 litros	14 ml	14 ml
≤2	2.4 ml	6.5 ml	8.32 ml	3 litros	18 ml	18 ml
≤2.5	2.4 ml	7.7 ml	9.36 ml	6 litros	22 ml	22 ml
≤3	2.6 ml	8.8 ml	10.40 ml	6 litros	26 ml	26 ml
≤3.5	2.6 ml	10.0 ml	12.48 ml	6 litros	30 ml	30 ml
≤4	2.8 ml	11.0 ml	13.52 ml	6 litros	34 ml	34 ml

Reagente de desnaturação

O kit de 1 placa vem com 50 ml de reagente de desnaturação e o kit de 4 placas vem com 2 x 100 ml de reagente de desnaturação. Preparar o DNR de acordo com o volume fornecido com o kit aplicável.

Notas:

- Depois de preparado, o DNR mantém-se estável durante 3 meses a 2–8 °C.
- Se a cor se esbater, adicionar 3 gotas adicionais de corante indicador e misturar minuciosamente antes de utilizar.

Frasco de 50 ml

1. Adicionar 5 gotas de corante indicador ao frasco de 50 ml de reagente de desnaturação.
2. Misturar minuciosamente.
O DNR deverá apresentar uma cor púrpura escura uniforme.
3. Rotular o DNR com a nova data de validade.

Frasco de 100 ml

1. Adicionar 10 gotas de corante indicador ao frasco de 100 ml de reagente de desnaturação.
2. Misturar minuciosamente.

O DNR deverá apresentar uma cor púrpura escura uniforme.

3. Rotular o DNR com a nova data de validade.

Reagente de desnaturação 2

Nota: O DNR2 só é necessário para a realização de testes com amostras em PreservCyt preparadas com o kit QIAasymphony DSP AXpH DNA.

1. Rotular um tubo cônico descartável em polipropileno limpo com a indicação "DNR2".
2. Adicionar o volume pretendido de tampão N2 (consultar a tabela 6, abaixo) ao recipiente rotulado.

Tabela 6. Preparação do DNR2

Volume de DNR2 necessário	Volume do Buffer N2	Volume do Buffer D2	Corante indicador
1.0 ml	0.4 ml	0.6 ml	1-2 gotas
2.0 ml	0.8 ml	1.2 ml	1-2 gotas
2.5 ml	1.0 ml	1.5 ml	1-2 gotas
5.0 ml	2.0 ml	3.0 ml	1-2 gotas
5.5 ml	2.2 ml	3.3 ml	1-2 gotas
6.5 ml	2.6 ml	3.9 ml	1-2 gotas
7.7 ml	3.1 ml	4.6 ml	1-2 gotas
8.8 ml	3.5 ml	5.3 ml	1-2 gotas
10.0 ml	4.0 ml	6.0 ml	1-2 gotas
11.0 ml	4.4 ml	6.6 ml	1-2 gotas

3. Adicionar o volume pretendido de Buffer D2 (consultar a tabela 6, abaixo) ao recipiente rotulado.
4. Adicionar o volume pretendido de corante indicador (consultar a tabela 6, abaixo) ao recipiente rotulado.

Nota: Utilizar o corante indicador fornecido com o kit do *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

5. Agitar no vórtice durante, no mínimo, 10 segundos.

Nota: Depois de preparado, o DNR2 mantém-se estável durante 8 horas a 15–30 °C.

Mistura para sonda

- Para a realização de testes manuais, preparar a mistura para sonda durante a incubação para desnaturação da amostra (conforme aplicável, consultar “Desnaturação de calibradores, controlos de qualidade e amostras em STM”, página 50 ou “Desnaturação de calibradores, controlos de qualidade e ADN eluído para os testes manuais”, página 47).
 - Ter extremo cuidado para evitar a contaminação de RNase. Utilizar pontas de pipeta com barreiras para aerossóis durante a pipetagem da sonda.
 - O diluente de sonda é viscoso. Certificar-se de que se obtém um vórtice visível durante a preparação da mistura para sonda; uma mistura incompleta poderá resultar num sinal reduzido.
 - Se se combinarem vários frascos da sonda para a realização de testes automatizados no RCS, agrupar (conjunto) a sonda num frasco e misturar através de pipetagem.
1. Para evitar prender a sonda na tampa do frasco, centrifugar cada frasco da sonda brevemente para fazer com que o líquido desça para o fundo do frasco.
 2. Bater levemente no frasco para misturar.
 3. Determinar a quantidade de mistura para sonda necessária:

Recomendação: Preparar mistura para sonda adicional para ter em conta o volume que se poderá perder nas pontas das pipetas ou na parte lateral do frasco. Os volumes especificados nas tabelas 1–5, acima, incluem o volume adicional recomendado.

Testes manuais: Determinar os volumes necessários para uma diluição a 1:25 da sonda no diluente de sonda para preparar a mistura para sonda (25 µl/teste). Os volumes são indicados em Tabela 1, página **Error! Bookmark not defined.** e Tabela 4 página **Error! Bookmark not defined.**, conforme aplicável.

Testes automatizados no RCS: Usar os volumes especificados na Tabela 2, página 35, Tabela 3, página **Error! Bookmark not defined.** ou Tabela 5, página **Error! Bookmark not defined.**, conforme aplicável.

4. Rotular um novo recipiente descartável como mistura para sonda de HPV de alto risco.
Dependendo do número de testes, recomenda-se a utilização de um tubo de polipropileno com base redonda e tampa de encaixe de 5 ml ou 15 ml.
5. Adicionar o volume pretendido de diluente de sonda (consultar a tabela 7, abaixo) ao recipiente rotulado.
6. Pipetar a quantidade necessária de sonda de HPV de alto risco para o diluente de sonda (consultar a tabela 7, abaixo) colocando a ponta da pipeta encostada à parede interior do tubo, imediatamente acima do menisco e expelindo o conteúdo.

Importante: Não mergulhar a ponta no diluente de sonda.

Tabela 7. Preparação da mistura para sonda

Volume de mistura para sonda necessário	Volume de diluente de sonda	Volume de sonda de HPV de alto risco
1.04 ml	1.0 ml	40 µl
2.08 ml	2.0 ml	80 µl
3.12 ml	3.0 ml	120 µl
4.16 ml	4.0 ml	160 µl
5.20 ml	5.0 ml	200 µl
6.24 ml	6.0 ml	240 µl
8.32 ml	8.0 ml	320 µl
9.36 ml	9.0 ml	360 µl
10.40 ml	10.0 ml	400 µl
12.48 ml	12.0 ml	480 µl
13.52 ml	13.0 ml	520 µl

7. Agitar no vórtice durante, pelo menos, 5 segundos à velocidade máxima para misturar bem.
Deverá ser produzido um vórtice visível.

Tampão de lavagem

Pontos importantes antes de iniciar o procedimento

- Para testes manuais, preparar o tampão de lavagem durante o passo de captura híbrida (consultar “Captura híbrida”, página 57).
- Para minimizar a exposição, adicionar água ao concentrado de tampão de lavagem durante a preparação.
- Para o método de lavagem manual da microplaca, preparar 3 litros de tampão de lavagem no aparelho de lavagem.

Recomendação: A cada 3 meses, limpar o aparelho de lavagem e os tubos com uma solução de 0,5% de hipoclorito de sódio e enxaguar bem com água destilada ou desionizada para evitar possível contaminação pela fosfatase alcalina presente em bactérias e fungos.

- Para o Automated Plate Washer, preparar o tampão de lavagem e armazenar num recipiente coberto, ou preparar 1 litro e colocar no reservatório de lavagem do Automated Plate Washer.
- Para testes automatizados no RCS, preparar a quantidade especificada (conforme aplicável, consultar Tabela 2, página 35, Tabela 3, página **Error! Bookmark not defined.** ou Tabela 5, página **Error! Bookmark not defined.**) no frasco de lavagem do RCS..

1. Misturar bem o concentrado de tampão de lavagem e adicionar o volume necessário de concentrado de tampão de lavagem (consultar a tabela 8, abaixo) no recipiente especificado.
2. Adicionar o volume pretendido de água destilada ou desionizada (consultar a tabela 8, abaixo) ao recipiente especificado.

Table 8. Preparation of Wash Buffer

Volume of Wash Buffer required	Volume of Wash Buffer concentrate	Volume of distilled or deionized water
1 liter	33.3 ml	966.7 ml
2 liters	66.6 ml	1933.4 ml
3 liters	100.0 ml	2900.0 ml
6 liters	200.0 ml	5800.0 ml

3. Colocar um toalhete de papel com liberação reduzida de pelo limpo sobre quaisquer aberturas do recipiente e misturar bem.
4. Selar o recipiente para evitar contaminação ou evaporação, ou colocar no respetivo instrumento, conforme aplicável.
5. Rotular o tampão de lavagem com a nova data de validade.

Nota: Uma vez preparado, o tampão de lavagem mantém-se estável durante três meses, quando armazenado a uma temperatura de 2–30 °C

Criar a disposição da placa

1. Criar uma disposição da placa utilizando o software de análise do ensaio *digene* com protocolos de ensaio *digene* para HPV.

Consultar o manual do utilizador do software aplicável para obter instruções sobre como criar uma disposição da placa com as posições corretas para os calibradores, controlos de qualidade e amostras.

Notas:

- Os calibradores, os controlos de qualidade e as amostras são utilizados numa configuração de coluna de 8 poços.
- Testar os calibradores e os controlos de qualidade nas posições que se seguem na microplaca (consultar Figura 1, página 42):
 - Modelos de replicação de calibrador negativo (NC) nos poços da microplaca A1, B1, C1

- Modelos de replicação de calibrador de HPV de alto risco (HRC) nos poços da microplaca D1, E1, F1
- Controlo de qualidade do HPV de baixo risco (QC1-LR) no poço da microplaca G1
- Controlo de qualidade do HPV de alto risco (QC2-HR) no poço da microplaca H1

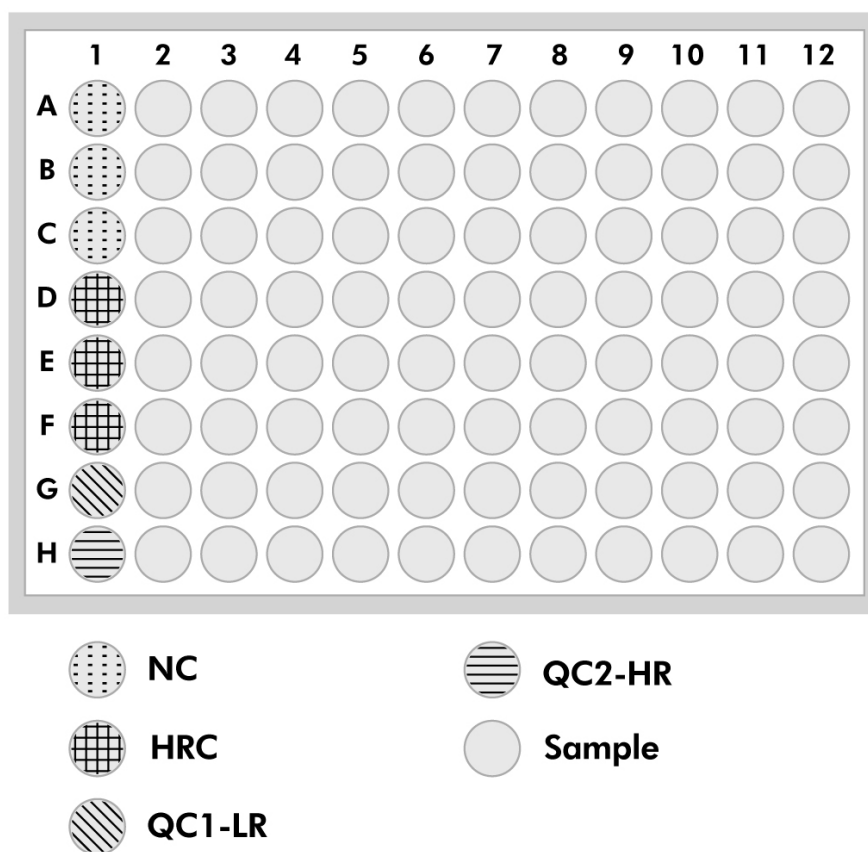


Figura 1. Posição dos calibradores, controlos de qualidade e amostra na microplaca.

Importante: Durante a realização de testes automatizados no RCS, utilizar protocolos de ensaio específicos para o RCS para criar a disposição da placa e gerar resultados. Os parâmetros definidos dos protocolos de ensaio específicos do RCS são diferentes dos parâmetros dos protocolos de ensaio para testes manuais (consultar “Cálculo de corte” página 67).

- Colocar os calibradores, controlos de qualidade e amostras a testar num suporte para tubos de colheita de amostras ou suporte de amostras pela ordem em que serão testados.

Importante: Durante a realização de testes automatizados no RCS, é crucial que a disposição da placa corresponda às amostras corretas testadas para evitar a obtenção de resultados de amostra incorretos. Para cada suporte de amostras e tampa utilizados, confirmar que os

números de série correspondem e, conforme aplicável, rotular cada suporte e tampa de amostras de acordo com a ordem em que serão testados no RCS. Utilizar um marcador e rótulo que não desapareçam no banho-maria a 65 °C.


Preparação da amostra

As amostras em PreservCyt e SurePath requerem a preparação da amostra antes do teste com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Dependendo do tipo de preparação da amostra realizado, as amostras preparadas estão prontas para diferentes passos do *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Os métodos disponíveis para a preparação de amostras são os seguintes:


- Preparação automatizada de amostras em SurePath e pellets de células após gradiente com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media
- Preparação automatizada de amostras em SurePath com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media
- Preparação automatizada de amostras em PreservCyt com o kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA
- Preparação manual de amostras em PreservCyt
- Preparação manual de amostras de pellets de células após gradiente em SurePath

Preparação de amostras em PreservCyt com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media


 Consultar as instruções de utilização do kit QIAAsymphony DSP HPV Media (manual) (QIAAsymphony DSP HPV Media Kit Instructions for Use (Handbook)) para a preparação de amostras em PreservCyt com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media.

Importante: Os extratos das amostras produzidos em resultado da preparação das amostras em PreservCyt através do kit QIAAsymphony DSP HPV Media só podem ser testados com o RCS. O desempenho manual do teste com extratos de amostras não está validado.

O resultado da preparação de amostras em PreservCyt com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media são extratos de amostras numa microplaca de hibridização com a primeira coluna vazia. Os extratos de amostras contêm partículas magnéticas, STM e DNR e estão prontos para testes automatizados no RCS no passo de desnaturação. Os calibradores, os controlos da qualidade e os extratos de amostras são desnaturados ao mesmo tempo na microplaca de hibridização durante os testes automatizados no RCS (ver “Desnaturação e hibridização de amostras preparadas com o QIAAsymphony SP,” página 47).


 Durante a realização de testes automatizados com o RCS de amostras preparadas com o QIAAsymphony SP, consultar o manual do utilizador do Rapid Capture System — Realização de testes *digene* HC2 DNA usando amostras processadas QIAAsymphony SP (*Rapid Capture System User Manual — Performing digene HC2 DNA Tests Using QIAAsymphony SP Processed Samples*), para obter instruções sobre como concluir o teste

Preparação de amostras em SurePath e pellets de células após gradiente em SurePath com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media


 Consultar as *instruções de utilização do kit QIAAsymphony DSP HPV Media (manual)* para a preparação de amostras em SurePath e de amostras de pellets de células após gradiente em SurePath com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media.

Important: Os extratos das amostras produzidos em resultado da preparação das amostras em SurePath através do kit QIAAsymphony DSP HPV Media só podem ser testados com o RCS. O desempenho manual do teste com extratos de amostras não está validado

O resultado da preparação de amostras SurePath e amostras de pellets de células após gradiente utilizando o kit QIAAsymphony DSP HPV Media é calibradores, controlos de qualidade e extratos de amostras numa microplaca de hibridização pronta para testes automatizados no passo de hibridização do teste no RCS.


 Durante a realização de testes automatizados com o RCS de amostras preparadas com o QIAAsymphony SP, consultar o manual do utilizador do Rapid Capture System — Realização de testes *digene* HC2 DNA usando amostras processadas QIAAsymphony SP (*Rapid Capture System User Manual — Performing digene HC2 DNA Tests Using QIAAsymphony SP Processed Samples*), para obter instruções sobre como concluir o teste.

Preparação de amostras em PreservCyt com o kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA

 Consultar o manual do kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA (*QIAAsymphony DSP AxpH DNA Kit Handbook*) para obter instruções para a preparação de amostras em PreservCyt.

O resultado da preparação de amostras em PreservCyt com o kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA é ADN eluído numa microplaca de hibridização com a primeira coluna vazia. O ADN eluído está pronto para o passo de desnaturação do teste. Os calibradores, os controlos de qualidade e ADN eluído são desnaturados ao mesmo tempo na microplaca de hibridização (consultar “Desnaturação e hibridização de amostras preparadas com o QIAAsymphony SP” página 47).

Preparação manual de amostras em PreservCyt

 Consultar as instruções de utilização do kit *digene* HC2 Sample Conversion relativas à preparação manual de amostras em PreservCyt.

A preparação manual de amostras em PreservCyt com o kit *digene* HC2 Sample Conversion resulta em amostras prontas para o passo de hibridização do teste. Preparar os calibradores e os controlos de qualidade separadamente (consultar "Desnaturação de calibradores, controlos de qualidade e amostras em STM" página 50).

Preparação manual de amostras de pellets de células após gradiente em SurePath

A preparação manual de amostras de pellets de células após gradiente em SurePath resulta em amostras prontas para o passo de hibridização do teste. Preparar os calibradores e os controlos de qualidade separadamente (consultar "Denaturation of calibrators, quality controls and STM specimens", página **Error! Bookmark not defined.**).

Importante: Se a amostra em SurePath com pellet de células após gradiente parecer conter menos de 1 ml, o pellet de células após gradiente não é adequado para a realização do teste com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, uma vez que o SurePath Preservative Fluid não foi adicionado após a citologia.

3. Levar a temperatura dos pellets de células após gradiente em SurePath até à temperatura ambiente e confirmar que o volume de líquido observado é equivalente a, aproximadamente, 2,8 ml.
4. Centrifugar os pellets de células após gradiente em SurePath num rotor de cabeça oscilante a $800 \pm 15 \times g$ durante 10 ± 1 minutos
5. Colocar os tubos no suporte.
6. Adicionar 200 µl de STM a cada pellet utilizando uma pipeta repetida ou de um canal.
7. 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 5–30 segundos ou até que o pellet flutue depois de se soltar do fundo do tubo e parecer dissolver-se.

Nota: Os tubos podem ser misturados sem tampa.

8. Pipetar 100 µl de DNR para cada amostra em SurePath utilizando uma pipeta repetida ou de um canal.

Importante: Certificar-se que não se toca nos lados do tubo pois tal poderá resultar em contaminação cruzada de amostras.

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

Nota: Os tubos podem ser misturados sem tampa.

10. Rotular os *digene* HC2 Sample Conversion Tubes ou tubos cónicos de 15 ml com a identificação aplicável da amostra e tipo (por exemplo "SP" para uma amostra SurePath) e colocar os tubos num suporte para tubos.

Nota: Para os testes automatizados no RCS, é necessário utilizar tubos de conversão de amostras HC2 *digene*.

11. Transferir todo o volume para o tubo cónico de 15 ml aplicável utilizando uma pipeta de transferência com ponta padrão de 7 ml descartável ou equivalente.
12. Tapar os tubos cónicos e colocar num suporte para tubos.
13. Incubar os tubos num banho-maria a 65 ± 2 °C durante 90 ± 5 minutos.

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

Se o teste for realizado no mesmo dia, desnaturar os calibradores e controlos de qualidade (consultar "Desnaturação de calibradores, controlos de qualidade e amostras em STM" página 50).

14. Remover o suporte para tubos do banho-maria após a incubação.

Se se utilizar um suporte de amostras, não permitir que arrefeça antes de retirar a tampa do suporte. Prosseguir imediatamente com o teste ou retirar a tampa do suporte e a película seladora de tubos DuraSeal.

Nota: Se o suporte de amostras arrefecer, os tubos poderão colar-se à tampa do suporte e, posteriormente, derramar o conteúdo.

As amostras em SurePath preparadas podem ser:

- Testados imediatamente (avançar para "Hybridization of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples", página 52)
- Armazenados (consultar "Optional stop point of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples", página 52)


Desnaturação e hibridização de amostras preparadas com o QIAAsymphony SP

O resultado das amostras de preparação no QIAAsymphony SP é uma microplaca de hibridização contendo, no mínimo, as amostras preparadas.

Se as amostras em PreservCyt tiverem sido preparadas com o QIAAsymphony SP, a primeira coluna da microplaca de hibridização está vazia. O conteúdo da microplaca está pronto para o passo de desnaturação do teste. Os calibradores e os controlos da qualidade são acrescentados à microplaca de hibridização, quer manualmente quer durante os testes automatizados no RCS, sendo depois realizado o passo de desnaturação.

Se tiverem sido preparadas amostras em SurePath ou pellets de células após gradiente em SurePath com o QIAAsymphony SP, a placa contém as amostras preparadas com os calibradores desnaturados e os controlos da qualidade pipetados na primeira coluna da microplaca de hibridização. O conteúdo da microplaca está pronto para os testes automatizados no RCS no passo de hibridização do teste.

Importante: Os extratos das amostras produzidos em resultado da preparação através do kit QIAAsymphony DSP HPV Media só podem ser testados com o RCS. O desempenho manual do teste com extratos de amostras não está validado.

 Durante a realização de testes automatizados com o RCS de amostras preparadas com o QIAAsymphony SP, consultar o manual do utilizador do Rapid Capture System — Realização de testes *digene* HC2 DNA usando amostras processadas QIAAsymphony SP (*Rapid Capture System User Manual — Performing digene HC2 DNA Tests Using QIAAsymphony SP Processed Samples*), para obter instruções sobre como concluir o teste.

Desnaturação de calibradores, controlos de qualidade e ADN eluído para os testes manuais

- Este procedimento destina-se a testes manuais de amostras em PreservCyt preparadas com o kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA. Se forem realizados testes automatizados no RCS, consultar o manual do utilizador do Rapid Capture System — Realização de testes *digene* HC2 DNA usando amostras processadas QIAAsymphony SP (*Rapid Capture System User Manual — Performing digene HC2 DNA Tests Using QIAAsymphony SP Processed Samples*) para obter instruções sobre como concluir o teste.

- A desnaturação dos calibradores e controlos de qualidade é levada a cabo utilizando DNR, ao passo que a desnaturação de ADN eluído é realizada utilizando DNR2..
1. Agitar cada calibrador e controlo de qualidade no vórtex durante 10 segundos, na regulação máxima.
 2. Inverter cada tubo para recuperar material da tampa do tubo.
 3. Remover as tampas dos tubos de calibrador e controlo de qualidade e descartá-las.
 4. Utilizando uma pipeta de um canal, adicionar 50 µl do calibrador ou controlo de qualidade aplicável no fundo de um poço de microplaca de hibridização vazia, de acordo com a disposição de placa criada.

Se o calibrador e os controlos de qualidade forem utilizados para testes adicionais, tapar os tubos com tampas roscadas novas para tubos de colheita de amostras, rotular com uma nova data de validade e armazenar a 2–8 °C.

Nota: Os calibradores e controlos de qualidade abertos e não desnaturados mantêm-se estáveis durante 3 meses a uma temperatura de 2–8 °C.

5. Agitar minuciosamente os DNR e DNR2 preparador no vórtex e dividir em alíquotas cada um deles para um reservatório de reagente adequadamente rotulado.

Importante: Adicionar o reagente certo à coluna correta da microplaca de eluatos.

6. Utilizando um pipetador de 8 canais, adicionar 25 µl de DNR à primeira coluna da microplaca de hibridização que contém os calibradores e os controlos da qualidade.
7. Utilizando um pipetador de 8 canais, adicionar 25 µl de DNR2 a cada poço da microplaca de hibridização que contém um ADN eluído.
8. Cobrir a microplaca de hibridização com uma tampa de microplaca e agitar durante 30 segundos no conjunto Rotary Shaker I a 1100 ± 100 rpm.
9. Colocar a microplaca no Microplate Heater I estabilizado a 65 ± 2 °C, sem salpicar. Incubar a microplaca de hibridização durante 45 ± 5 minutos.

Preparar a mistura para sonda durante esta incubação (consultar “Mistura para sonda”, página 39).

10. Remover a microplaca de hibridização do Microplate Heater I.

Os calibradores, controlos de qualidade e ADN eluído desnaturados podem ser:

- Armazenados (consultar “Ponto de paragem opcional de ADN eluído” página 49)
- Testados imediatamente (avançar para “Hibridização de ADN eluído” página 49)

Ponto de paragem opcional de ADN eluído

O ADN eluído desnaturado, incluindo calibradores e controlos de qualidade, cobertos com uma tampa de microplaca podem ser armazenados a 2–8 °C durante 2 semanas.

Hibridização de ADN eluído

1. Se a microplaca de hibridização que contém os calibradores desnaturados, os controlos da qualidade e ADN eluído tiver sido armazenada, retirar a tampa da microplaca e deixar a temperatura da microplaca de hibridização estabilizar a 20–25 °C.
2. Agitar a mistura para sonda minuciosamente no vórtex e dividir em alíquotas num reservatório de reagente descartável.
3. Pipetar cuidadosamente 25 µl da mistura para sonda para cada poço da microplaca de hibridização utilizando um pipetador de 8 canais e novas pontas para cada adição de mistura para sonda.

Evitar salpicos e tocar nas partes laterais dos poços da microplaca de hibridização.

4. Cobrir a microplaca de hibridização com uma tampa de microplaca e agitar durante 3 ± 2 minutos no conjunto Rotary Shaker I a 1100 ± 100 rpm.

Após serem agitados, os calibradores, controlos de qualidade e ADN eluído deverão mudar de cor para amarelo.

As amostras que permanecerem da cor púrpura poderão não ter recebido a quantidade correta de mistura para sonda. Adicionar mais 25 µl de mistura para sonda às amostras que tenham permanecido da cor púrpura e agitar novamente. Se uma amostra permanecer da cor púrpura depois deste procedimento ser seguido, testar novamente a amostra.

5. Colocar a microplaca no Microplate Heater I estabilizado a 65 ± 2 °C, sem salpicar. Incubar a microplaca de hibridização durante 60 ± 5 minutos.
6. Prosseguir para “Captura híbrida”, página 57 para continuar os testes.

Desnaturação e hibridização de amostras em STM, amostras em PreservCyt e amostras de pellets de células após gradiente em SurePath preparadas manualmente

- Durante a realização de testes de amostras em PreservCyt e amostras de pellets de células após gradiente em SurePath preparadas manualmente, o passo de desnaturação não é necessário para as amostras. No entanto, os calibradores e os controlos de qualidade necessários para o teste são desnaturados de acordo com as instruções abaixo.

- Algumas amostras em STM poderão conter sangue ou outro material biológico que poderá mascarar as alterações de cor após adição de DNR. As amostras que apresentam uma cor escura antes da adição de DNR poderão não proporcionar a alteração de cor adequada neste passo. Nestes casos, a não apresentação da alteração de cor adequada não afetará os resultados do teste. A mistura correta pode ser verificada através da observação da alteração de cor dos calibradores e controles de qualidade.

Desnaturação de calibradores, controles de qualidade e amostras em STM

- Nunca retirar o dispositivo de colheita de amostras do tubo de amostras.
 - Para evitar resultados falso-positivos, é essencial que todo o material da amostra entre em contacto com o DNR. A mistura após a adição de DNR é um passo crucial.
 - As amostras em STM desnaturadas utilizando o método do MST Vortexer 2 têm de utilizar o método "Hibridização utilizando uma microplaca e o Microplate Heater I", na página **Error! Bookmark not defined.** O método "Hibridização utilizando microtubos e banho-maria" (página 55) não foi validado com amostras em STM desnaturadas utilizando o MST Vortexer 2.
1. Retirar e descartar as tampas dos tubos.

Importante: Considerar as tampas retiradas dos tubos de amostras em STM como potencialmente infecciosas (consultar "Avisos e precauções" página 23, para obter informações adicionais).
 2. Pipetar o volume especificado (consultar a tabela 9, abaixo) de DNR para os tubos utilizando uma pipeta repetida ou ajustável.

Certificar-se de que não toca nos lados dos tubos pois tal poderá resultar em contaminação cruzada de amostras.

Importante: Os kits de 1 placa e os kits de 4 placas têm volumes diferentes para o calibrador de HPV de alto risco. Adicionar o volume certo de DNR.

Nota: O volume de DNR adicionado é equivalente a metade do volume de líquido no tubo..

Tabela 9. Adição de DNR

Calibrador, controlo de qualidade ou amostra em STM	Volume de DNR necessário
Calibrador negativo, 2 ml	1000 µl
Calibrador de HPV de alto risco, 1 ml	500 µl
Calibrador de HPV de alto risco, 2 ml	1000 µl
Controlo de qualidade do HPV de alto e baixo risco, 1 ml	500 µl
Amostra em STM, 1 ml	500 µl

3. Misturar os tubos utilizando o método MST Vortexer 2 ou o método de agitação individual manual de tubos no vórtice.

Método do MST Vortexer 2

- Cobrir os tubos com película seladora de tubos DuraSeal passando a película sobre os tubos no suporte de amostras.
- 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.
- Deslocar a alavanca com pega vermelha para a posição UP (cima) de modo a ficar na horizontal.
- Colocar o suporte de amostras firmemente nas guias do MST Vortexer 2, com o canto recortado maior do suporte voltado para o canto dianteiro direito. Prender o suporte de amostras deslocando a alavanca com a pega vermelha para a posição "down" (baixo) de modo a ficar na vertical.
- Certificar-se de que a configuração da velocidade é 100 (velocidade máxima) e ligar o MST Vortexer 2.
- Agitar no vórtex durante 10 segundos.
- Desligar o MST Vortexer 2.
- Remover o suporte de amostras do MST Vortexer 2 deslocando a alavanca com a pega vermelha para cima.

Método de agitação individual manual de tubos no vórtice

- a. Voltar a tapar os tubos com tampas roscadas novas para tubos de colheita de amostras.
- Misturar cada tubo minuciosamente por agitação individual no vórtex, a alta velocidade, durante 5 segundos.
Importante: Durante a mistura, deverá ser observado um vórtice visível de líquido que lava toda a superfície interna do tubo.
- Inverter cada tubo uma vez para lavar o interior do tubo, a tampa e a borda.
- Voltar a colocar o tubo no suporte.

O líquido no tubo deverá ficar púrpura.

4. Incubar os tubos num suporte em banho-maria a 65 ± 2 °C durante 45 ± 5 minutos.

Para testes manuais, preparar a mistura para sonda durante esta incubação (consultar "Mistura para sonda", página 39).

5. Remover os tubos do banho-maria após a incubação.

Se se utilizar um suporte de amostras, não permitir que arrefeça antes de retirar a tampa do suporte. Prosseguir imediatamente com o teste ou retirar a tampa do suporte e a película seladora de tubos DuraSeal.

Nota: Se o suporte de amostras arrefecer, os tubos poderão colar-se à tampa do suporte e, posteriormente, derramar o conteúdo.

Os calibradores, controlos de qualidade e amostras em STM desnaturados podem ser:

- Armazenados (consultar "Optional stop point of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples", página 52)
- Testados imediatamente (avançar para "Hybridization of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples", página 52)

Ponto de paragem opcional de amostras preparadas em STM e amostras em PreservCyt e amostras de pellets de células após gradiente em SurePath preparadas manualmente


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

Todas as amostras preparadas, incluindo calibradores e controlos de qualidade, podem ser armazenadas a 2–8 °C de um dia para o outro ou a –20 °C durante até 3 meses. Poderá ser levado a cabo um máximo de 3 ciclos de congelação/descongelação com um máximo de 2 horas à temperatura ambiente durante cada ciclo de descongelamento.

Para o armazenamento de um dia para o outro a 2–8 °C no suporte de amostras, cobrir as amostras com película seladora de tubos DuraSeal e voltar a colocar a tampa do suporte.

Para o armazenamento a –20 °C no suporte de amostras, retirar a tampa do suporte e a película seladora de tubos DuraSeal e colocar uma tampa aplicável nos tubos.

Hibridização de amostras preparadas em STM e amostras em PreservCyt e amostras de pellets de células após gradiente em SurePath preparadas manualmente

 Durante a realização de testes automatizados no RCS a amostras em STM ou a amostras em PreservCyt e amostras de pellets de células após gradiente em SurePath preparadas

manualmente, consultar o *manual do utilizador do Rapid Capture System* para obter instruções sobre como concluir o teste.

Se os calibradores, controlos de qualidade ou amostras desnaturados tiverem sido armazenados, permitir a elevação da temperatura a 20–25 °C e, se armazenados num suporte de amostras, retirar e descartar as tampas dos tubos..

- Estão disponíveis dois métodos de hibridização de amostras em STM, e de amostras em PreservCyt e de amostras de pellets de células após gradiente em SurePath preparadas manualmente: "Hibridização utilizando a microplaca e o Microplate Heater I" e "Hibridização utilizando microtubos e banho-maria".
- As amostras em STM desnaturadas utilizando o método do MST Vortexer 2 têm de utilizar "Hibridização utilizando uma microplaca e o Microplate Heater I", na página **Error! Bookmark not defined.** "Hibridização utilizando microtubos e banho-maria" (página 55) não foi validado com amostras em STM desnaturadas utilizando o MST Vortexer 2.
- O diluente de sonda é viscoso. Certificar de que a mistura para sonda é minuciosamente misturada e que é colocada a quantidade necessária em cada poço da microplaca de hibridização ou microtubo de hibridização.
- Durante a transferência da amostra para a microplaca de hibridização ou para o microtubo de hibridização, evitar tocar nas partes laterais dos poços da microplaca de hibridização ou microtubos de hibridização pois poderão ocorrer resultados falso-positivos se as amostras não forem cuidadosamente transferidas. Limitar a formação de bolhas de ar. Utilizar uma ponta de pipeta extralonga limpa para cada transferência, de modo a evitar contaminação cruzada

Hibridização utilizando uma microplaca e o Microplate Heater I

1. Obter e rotular uma microplaca de hibridização.
2. Agitar no vórtex utilizando um dos métodos seguintes:

Calibradores, controlos de qualidade ou amostras em STM com o MST Vortexer 2

- a. Conforme aplicável, cobrir os tubos com película seladora de tubos DuraSeal e fixar a tampa do suporte no suporte de amostras.
- b. Agitar o suporte de amostras no vórtex durante, no mínimo, 5 segundos à velocidade máxima.
- c. Colocar imediatamente o suporte de amostras sobre a bancada e abrir os fechos. Levantar a tampa do suporte aproximadamente 1 cm e deslocá-la com cuidado para a esquerda e a direita para libertar quaisquer tubos que possam ter-se colado à

película seladora de tubos DuraSeal. Destacar cuidadosamente a película seladora de tubos da tampa do suporte e descartar.

- d. Destacar cuidadosamente a película seladora de tubos da tampa do suporte e descartar.

Amostras em PreservCyt ou de pellets de células após gradiente em SurePath com o MST

Vortexer 2

- a. Conforme aplicável, cobrir os tubos com película seladora de tubos DuraSeal e fixar a tampa do suporte no suporte de amostras.
- b. Agitar o suporte de conversão no vórtex durante, no mínimo, 10 segundos à velocidade máxima.
- c. Colocar imediatamente o suporte de amostras sobre a bancada e abrir os fechos. Levantar a tampa do suporte aproximadamente 1 cm e deslocá-la com cuidado para a esquerda e a direita para libertar quaisquer tubos que possam ter-se colado à película seladora de tubos DuraSeal. Destacar cuidadosamente a película seladora de tubos da tampa do suporte e descartar.
- d. Destacar cuidadosamente a película seladora de tubos da tampa do suporte e descartar.

Qualquer tipo de amostra com o vórtice

- a. Agitar cada tubo individualmente no vórtex durante 5 segundos.

3. Utilizando a pipeta EXPAND-4 ou uma pipeta de um canal com uma ponta de pipeta extralonga, transferir 75 µl de cada calibrador, controlo de qualidade ou amostra para o fundo de um poço da microplaca de hibridização vazio, de acordo com a disposição da placa que foi criada..

Se as amostras forem armazenadas, tapar os calibradores, controlos de qualidade e amostras em STM desnaturados com tampas roscadas novas para tubos de colheita de amostras e colocar a tampa original para cada amostra nas amostras em PreservCyt e de pellets de células após gradiente em SurePath.

Nota: Armazenar as amostras de acordo com os limites indicados em "Optional stop point of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples", página 52.

4. Depois de transferir a última amostra, cobrir a microplaca de hibridização com uma tampa de microplaca e incubar durante 10 minutos a 20–25 °C.
5. Agitar a mistura para sonda minuciosamente no vórtex e dividir em alíquotas num reservatório de reagente descartável.

6. Pipetar cuidadosamente 25 µl da mistura para sonda para cada poço da microplaca de hibridização utilizando um pipetador de 8 canais e novas pontas para cada adição de mistura para sonda.

Evitar salpicos e tocar nas partes laterais dos poços da microplaca de hibridização.

7. Cobrir a microplaca de hibridização com uma tampa de microplaca e agitar durante 3 ± 2 minutos no conjunto Rotary Shaker I a 1100 ± 100 rpm.

Após a agitação, os calibradores, controlos de qualidade, amostras em STM e amostras SurePath devem mudar de cor para amarelo e as amostras em PreservCyt devem mudar de cor para cor-de-rosa.

As amostras que permanecerem da cor púrpura poderão não ter recebido a quantidade correta de mistura para sonda. Adicionar mais 25 µl de mistura para sonda às amostras que tenham permanecido da cor púrpura e agitar novamente. Se uma amostra permanecer da cor púrpura depois deste procedimento ser seguido, testar novamente a amostra.

8. Colocar a microplaca no Microplate Heater I estabilizado a 65 ± 2 °C, sem salpicar. Incubar a microplaca de hibridização durante 60 ± 5 minutos.
9. Prosseguir para "Captura híbrida", página 57 para continuar os testes.

Hybridization using microtubes and waterbath

1. Rotular e colocar o número necessário de microtubos de hibridização limpos no suporte de microtubos.
2. Agitar cada tubo de calibrador, controlo de qualidade e amostra individualmente no vórtex durante pelo menos 5 segundos antes de retirar a amostra.
3. Utilizando uma pipeta de um canal com uma ponta de pipeta extralonga, transferir 75 µl de cada calibrador, controlo de qualidade ou amostra para o fundo do microtubo de hibridização aplicável, de acordo com a disposição da placa que foi criada.

Se as amostras forem armazenadas, tapar os calibradores, controlos de qualidade e amostras em STM desnaturados com tampas roscadas novas para tubos de colheita de amostras e colocar a tampa original para cada amostra nas amostras em PreservCyt e de pellets de células após gradiente em SurePath.

Nota: Armazenar as amostras de acordo com os limites indicados em "Optional stop point of prepared STM samples and manually prepared PreservCyt and SurePath post-gradient cell pellet samples", página 52

4. Depois de transferir a última amostra, incubar os microtubos de hibridização durante 10 minutos a 20–25 °C.
5. Agitar a mistura para sonda minuciosamente no vórtex e dividir em alíquotas num reservatório de reagente descartável.

6. Pipetar cuidadosamente 25 µl da mistura para sonda para cada microtubo de hibridização utilizando um pipetador de 8 canais e novas pontas para cada fila.

Evitar salpicos e tocar nas partes laterais dos microtubos de hibridização.

Inspecionar a parte inferior do suporte para se certificar de que todos os microtubos de hibridização receberam a quantidade correta de mistura para sonda.

7. Cobrir os microtubos de hibridização com um selador de placas. Colocar a tampa do suporte sobre o suporte. Agitar o suporte de microtubos durante 3 ± 2 minutos no conjunto Rotary Shaker I a 1100 ± 100 rpm.

Após a agitação, os calibradores, os controlos de qualidade, as amostras em STM e as amostras de pellets de células após gradiente em SurePath devem mudar de cor para amarelo e as amostras em PreservCyt devem mudar de cor para rosa.

As amostras que permanecerem da cor púrpura poderão não ter recebido a quantidade correta de mistura para sonda. Adicionar mais 25 µl de mistura para sonda às amostras que tenham permanecido da cor púrpura e agitar novamente. Se uma amostra permanecer da cor púrpura depois deste procedimento ser seguido, testar novamente a amostra.

8. Incubar o suporte de microtubos durante 60 ± 5 minutos num banho-maria a 65 ± 2 °C.

Certificar-se de que o nível de água no banho-maria é suficiente para cobrir todo o volume do microtubo de hibridização.

Nota: O suporte de microtubos irá flutuar no banho-maria.

9. Prosseguir para “Captura híbrida”, página 57 para continuar os testes.

Captura híbrida

1. Retirar todos os poços da microplaca de captura que não são necessários da estrutura da placa.
2. Voltar a colocar os poços da microplaca não utilizados na embalagem original e voltar a selar.
3. Com um marcador, numerar sequencialmente cada coluna e rotular a microplaca de captura com um identificador aplicável.

As amostras serão adicionadas aos poços da microplaca de captura de acordo com a disposição da placa criada.

4. Conforme aplicável, retirar cuidadosamente a microplaca de hibridização do Microplate Heater I ou o suporte de microtubos do banho-maria.

Retirar imediatamente a tampa da microplaca e colocá-la numa superfície limpa ou retirar a tampa do suporte e puxar lentamente o selador da placa para cima e transversalmente ao suporte de microtubos.

5. Utilizando um pipetador de 8 canais, transferir todo o conteúdo (aproximadamente 100 µl) dos poços da microplaca de hibridização ou dos microtubos de hibridização para o fundo dos poços da microplaca de captura correspondente.

Utilizar novas pontas de pipeta para cada transferência e permitir que cada ponta de pipeta drene para garantir de que ocorre uma transferência completa da amostra. Se pretendido, a pipeta pode ser estabilizada pousando a parte intermédia das pontas de pipeta na extremidade superior dos poços da microplaca de captura (consultar **Figura 2**, abaixo).

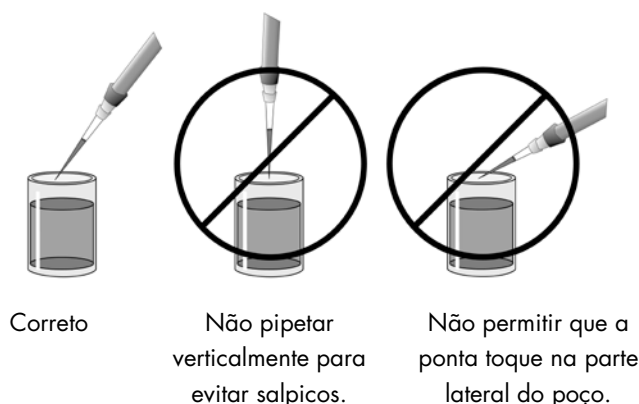


Figura 2. Pipetagem correta.

6. Cobrir a microplaca de captura com a tampa de microplaca ou um novo selador de placas e agitar durante 60 ± 5 minutos no Rotary Shaker I a 1100 ± 100 rpm a $20\text{--}25$ °C.
Preparar o tampão de lavagem durante esta incubação (consultar “Tampão de lavagem”, página 40).
7. No final da incubação, retirar a microplaca de captura do Rotary Shaker I e retirar cuidadosamente a tampa da microplaca ou o selador de placas.
8. Retirar o líquido dos poços da microplaca de captura descartando-os numa pia; inverter totalmente a microplaca de captura sobre a pia e agitar com força num movimento descendente.
Importante: Não voltar a inverter a microplaca.
Não provocar salpicos pela decantação demasiado próxima do fundo da pia.
9. Secar batendo firmemente 2–3 vezes sobre lenços Kimtowels ou toalhetes de papel com libertação reduzida de pelo equivalentes.
Certificar-se de que todo o líquido é removido dos poços da microplaca de captura e de que o topo da microplaca de captura está seco.
10. Prosseguir para “Deteção híbrida”, página 58 para continuar os testes.

Deteção híbrida

- Adicionar os reagentes ao longo da microplaca de captura da esquerda para a direita utilizando um pipetador de 8 canais. Limpar as pontas sobre um reservatório de reagente descartável para eliminar o excesso de reagente antes da colocação na microplaca.
 - Se não se utilizar um pipetador de 8 canais, poderá ser substituído por uma pipeta repetida. Dividir o DR1 em alíquotas para um tubo de polipropileno de tamanho suficiente para conter o volume necessário.
 - Recomenda-se a utilização da técnica de pipetagem inversa para melhorar a uniformidade da distribuição de reagente. O procedimento é descrito abaixo.
 - Se pretendido, o pipetador pode ser apoiado, colocando o centro das pontas das pipetas no rebordo superior dos poços da microplaca. Não tocar nas partes laterais dos poços da microplaca, pois pode ocorrer contaminação cruzada das amostras (consultar a Figura 2, página 57).
1. Misturar bem o DR1 e transferir cuidadosamente o volume aplicável (como aplicável, consultar Tabela 1, página **Error! Bookmark not defined.** ou Tabela 4, página **Error! Bookmark not defined.**) para um reservatório de reagente descartável limpo.
 2. Pipetar cuidadosamente 75 µl de DR1 para cada poço da microplaca de captura utilizando a técnica de pipetagem inversa, como se segue:

- a. Fixar pontas num pipetador de 8 canais; certificar-se de que todas as pontas estão firmemente encaixadas.
 - b. Empurrar o êmbolo da pipeta para além do primeiro ponto de paragem até ao segundo ponto de paragem.
 - c. Mergulhar as pontas no reagente.
 - d. Libertar o êmbolo lentamente e permitir que o reagente encha as pontas.
 - e. Colocar o reagente nos poços da microplaca premindo o êmbolo até ao primeiro ponto de paragem. Não libertar o êmbolo até que as pontas das pipetas tenham sido mergulhadas no reagente.
 - f. Certificar-se de que todos os poços da microplaca de captura foram cheios observando a intensidade da cor rosa. Todos os poços da microplaca de captura deverão apresentar uma intensidade de cor-de-rosa semelhante.
3. Cobrir a microplaca de captura com uma tampa de microplaca, Parafilm limpo ou equivalente, e incubar durante 30–45 minutos a 20–25 °C.
 4. Prosseguir para “Lavagem”, página 60 para continuar os testes.0.

Lavagem

Lavar a microplaca de captura utilizando um dos métodos abaixo.

Método do Automated Plate Washer

Manter o Automated Plate Washer sempre ligado. Certificar-se de 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 o manual do utilizador do Automated Plate Washer (*Automated Plate Washer User Manual*) para obter mais instruções.

- Certificar-se de que o reservatório de lavagem está cheio pelo menos até à marca de 1 litro com tampão de lavagem. Se não estiver, preparar o tampão de lavagem (consultar “Tampão de lavagem”, página 40).
 - Certificar-se de que o reservatório de enxaguamento está cheio de água desionizada ou destilada.
 - Certificar-se de que o reservatório de resíduos está vazio e que a tampa está firmemente apertada.
 - O Automated Plate Washer irá preparar automaticamente antes de cada lavagem e enxaguar após cada lavagem.
 - Se estiver a ser utilizada apenas uma tira parcial de poços da microplaca de captura, colocar os poços da microplaca vazios na microplaca de captura para completar a coluna antes da lavagem.
1. Remover a tampa da microplaca e colocar a microplaca de captura na plataforma do Automated Plate Washer.
 2. Verificar se o Automated Plate Washer está ligado e se o visor apresenta a indicação **Digene Wash Ready** (lavagem Digene pronta) ou **P1**.
 3. Selecionar o número de tiras a lavar premindo o botão **Rows** (filas) e depois **+** ou **-** para regular.
 4. Premir o botão **Rows** para regressar a **Digene Wash Ready** ou **P1**.
 5. Premir o botão **Start/Stop** (iniciar/parar) para começar.

O Automated Plate Washer irá efetuar 6 ciclos de enchimento e aspiração, demorando, aproximadamente 10 minutos. Irá ocorrer uma breve pausa durante o programa; não remover a microplaca prematuramente.

Quando o Automated Plate Washer terminar a lavagem, surgirá a indicação “Digene Wash Ready” ou “P1”.

6. Retirar a microplaca de captura da plataforma do Automated Plate Washer quando o programa terminar.
7. A microplaca de captura deverá ficar branca e sem quaisquer resíduos de líquido cor-de-rosa nos poços da microplaca de captura.
8. Prosseguir para “Amplificação do sinal”, página 62 para continuar os testes.

Método de lavagem manual

1. Retirar o DR1 dos poços da microplaca de captura colocando lenços Kimtowels ou toalhetes de papel com libertação reduzida de pelo equivalentes limpos sobre a microplaca de captura.
2. Certificar-se de que os toalhetes de papel ficam em contacto com toda a área da superfície da microplaca de captura e inverter cuidadosamente.
3. Permitir que a microplaca de captura drene durante 1–2 minutos.
4. Secar o poço com lenços Kimtowels ou toalhetes de papel com libertação reduzida de pelo equivalentes limpos.

Descartar cuidadosamente os toalhetes de papel usados para evitar contaminação com fosfatase alcalina.

5. Utilizando o aparelho de lavagem, lavar manualmente a microplaca de captura 6 vezes.
Para lavar corretamente, encha cada poço da microplaca de captura com tampão de lavagem até transbordar. Isto irá remover o DR1 das partes superiores dos poços da microplaca de captura. A lavagem é iniciada no poço da microplaca de captura A1 e continua em serpentina para a direita e para baixo. Após o enchimento de todos os poços da microplaca de captura, decantar o líquido para a pia com um movimento descendente forte. A segunda lavagem é iniciada no poço da microplaca de captura H12 num movimento de serpentina para a esquerda e para cima. Esta sequência de 2 lavagens é repetida mais 2 vezes para um total de 6 lavagens por poço da microplaca de captura.
6. Após a lavagem, secar a microplaca de captura invertendo-a sobre lenços Kimtowels ou toalhetes de papel com libertação reduzida de pelo equivalentes limpos e batendo firmemente 3–4 vezes. Substituir os toalhetes de papel e secar novamente.
7. Deixar a microplaca de captura invertida e deixar drenar durante 5 minutos. Secar a microplaca de captura mais uma vez.
A microplaca de captura deverá ficar branca e sem quaisquer resíduos de líquido cor-de-rosa nos poços da microplaca de captura.
8. Prosseguir para “Amplificação do sinal”, página 62 para continuar os testes.

Amplificação do sinal

- Usar um par de luvas novo para manusear o DR2.
 - Adicionar os reagentes ao longo da microplaca de captura da esquerda para a direita utilizando um pipetador de 8 canais.
 - Se não se utilizar um pipetador de 8 canais, poderá ser substituído por uma pipeta repetida. Dividir o DR2 em alíquotas para um tubo de polipropileno de tamanho suficiente para conter o volume necessário.
 - Adicionar o DR2 sem interrupção. O tempo de incubação de todos os poços da microplaca de captura deve ser o mais próximo possível.
 - Certificar-se de que não toca nas partes laterais dos poços da microplaca de captura e que o reagente não salpica para as pontas pois poderá ocorrer contaminação cruzada das amostras (consultar **Figura 2**, página 57).
1. Misturar bem o DR2 e transferir o volume aplicável (como aplicável, consultar Tabela 1, página **Error! Bookmark not defined.** ou Tabela 4, página **Error! Bookmark not defined.**) para um reservatório de reagente descartável limpo.
 2. Pipetar cuidadosamente 75 µl de DR2 para cada poço da microplaca de captura, utilizando a técnica de pipetagem inversa anteriormente descrita (consultar “Deteção híbrida” página 58).

Certificar-se de que todos os poços da microplaca de captura foram corretamente cheios observando a intensidade da cor amarela; todos os poços da microplaca de captura deverão apresentar uma intensidade de amarelo semelhante.
 3. Cobrir a microplaca de captura com uma tampa de microplaca e incubar a 20–25 °C durante 15 minutos (e não mais do que 30 minutos de incubação).

Importante: Evitar a luz direta do sol.
 4. Prosseguir para “Medir a microplaca de captura e gerar resultados”, página 62 para continuar os testes.

Medir a microplaca de captura e gerar resultados

1. Medir a microplaca de captura utilizando um instrumento DML.

Consultar o respetivo manual do utilizador do software para obter detalhes sobre a medição de uma microplaca de captura e a geração de relatórios de resultados de teste. O software de análise do ensaio *digene* irá permitir a introdução de informações pertinentes sobre o teste.

2. Se não tiver sido utilizada uma microplaca de captura completa, remover os poços da microplaca de captura usados da estrutura da microplaca, enxaguar a estrutura da microplaca minuciosamente com água destilada ou desionizada, secar e guardar para o teste seguinte.
3. Descartar todas as alíquotas de reagente e reagentes preparados, salvo indicação em contrário.

Diluir o DNR restante no frasco antes de descartar em conformidade com os procedimentos laboratoriais nacionais e locais.

Interpretação de resultados

O valor de corte (VC) do *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test de 1 pg/ml é equivalente a 100 000 cópias de HPV/ml ou 5000 cópias de HPV por ensaio

Resultados do teste de amostras em STM

As amostras STM com quocientes URL/valor de corte $\geq 1,0$ são consideradas “positive” (positivas) para 1 ou mais tipos de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68.

As amostras STM com quocientes URL/VC $< 1,0$ são consideradas “negative” (negativas) ou “no HPV DNA detected” (ADN de HPV não detetado) para os 13 tipos de HPV testados. As sequências de ADN de HPV de alto risco estão ausentes ou os níveis de ADN do HPV são inferiores ao limite de detecção do ensaio.

Resultados do teste de amostras SurePath

As amostras SurePath com quocientes URL/valor de corte $\geq 1,0$ são consideradas “positive” (positivas) para 1 ou mais tipos de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68.

As amostras em SurePath com quocientes URL/valor de corte $< 1,0$ são consideradas “negative” (negativas) ou “no HPV DNA detected” (ADN de HPV não detetado) para os 13 tipos de HPV testados. As sequências de ADN de HPV estão ausentes ou os níveis de ADN do HPV estão abaixo do limite de detecção do teste.

Resultados do teste de amostras em PreservCyt

As amostras em PreservCyt com quocientes URL/valor de corte $\geq 1,0$ são consideradas “positive” (positivas) para 1 ou mais tipos de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68.

As amostras em PreservCyt com quocientes URL/valor de corte $< 1,0$ são consideradas “negative” (negativas) ou “no HPV DNA detected” (ADN de HPV não detetado) para os 13 tipos de HPV testados. As sequências de ADN de HPV estão ausentes ou os níveis de ADN do HPV estão abaixo do limite de detecção do teste.

Para amostras em PreservCyt com quocientes URL/valor de corte $\geq 1,0$ e $< 2,5$, a QIAGEN recomenda a repetição do teste da amostra, conforme a seguir indicado:

- Se a primeira repetição do teste apresentar um quociente URL/valor de corte $\geq 1,0$, considerar a amostra como “positiva” (positiva). Não é necessário repetir o teste.
- Se a primeira repetição do teste apresentar um quociente URL/valor de corte $< 1,0$, é necessário repetir uma segunda vez o teste (terceiro resultado). O segundo resultado é o resultado final ($< 1,0$ é negativo, $\geq 1,0$ é positivo) e é indicado no relatório.

Quociente URL/valor de corte próximo de 1,0

Se o quociente URL/valor de corte de uma amostra estiver próximo, mas for inferior a, 1,0 suspeita-se de infecção por HPV de alto risco, pelo que se devem considerar métodos de teste alternativos e/ou uma nova amostra.

Outros tipos de HPV

Dado que este ensaio apenas deteta HPV de alto risco dos tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, e 68, ter em atenção que poderão estar presentes outros tipos de HPV de baixo risco na amostra. Se se pretender testar especificamente a presença de HPV de baixo risco de transmissão sexual, utilizar o *digene* HC2 HPV DNA Test, que deteta tipos de ADN de baixo risco e alto risco.

Verificação da calibração do ensaio

A verificação da calibração do ensaio é realizada para garantir que os reagentes, os calibradores e os controlos da qualidade estão a funcionar bem, permitindo uma determinação precisa do valor de corte do ensaio. O *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test requer a calibração do ensaio com cada teste; por isso, é necessário verificar cada ensaio. A verificação da calibração do ensaio é realizada para garantir que os reagentes e os materiais do calibrador e do controlo de qualidade fornecidos estão a funcionar adequadamente, permitindo a determinação rigorosa do valor de corte do ensaio. Os intervalos aceitáveis para a calibração do ensaio e controlos de qualidade foram estabelecidos apenas para instrumentos DML aprovados pela QIAGEN

A calibração do ensaio é automaticamente efetuada pelo software de análise do ensaio *digene* e impressa no relatório de análise de dados. No entanto, os utilizadores com o *digene* Qualitative Software versão 1.03 ou anterior têm de efetuar a verificação manual da calibração

do ensaio antes de poderem ser emitidos os relatórios de resultados de doentes. Contactar a Assistência Técnica da QIAGEN para obter mais informações.

O teste deve cumprir os critérios de calibração do ensaio especificados. Se algum dos critérios seguintes for inválido, o software não interpretará os resultados da amostra.

Calibrador negativo

O NC deve ser testado em triplicado para cada ensaio. A média do NC deve ser ≥ 10 e ≤ 250 URL e o coeficiente de variação (CV) deve ser $\leq 25\%$. Se o CV for $>25\%$, o software remove o valor URL mais afastado da média como um valor atípico e volta a calcular a média e o CV utilizando os valores restantes.

Se o CV for $>25\%$, a calibração do ensaio é inválida e o teste tem de ser repetido para todas as amostras de doentes. Assim, não apresentar relatórios relativos aos resultados da amostra da doente.

Calibrador positivo

O HPV de alto risco (HRC) tem de ser testado em triplicado em cada ensaio. O CV do HRC deve ser $\leq 15\%$. Se o CV for $>15\%$, o software remove o valor URL mais afastado da média como um valor atípico e volta a calcular a média e o CV utilizando os valores restantes.

Se o CV for $>15\%$, a calibração do ensaio é inválida e o teste tem de ser repetido para todas as amostras de doentes. Assim, não apresentar relatórios relativos aos resultados da amostra da doente.

Média do calibrador positivo / média do calibrador negativo

O software utiliza o $HRC\bar{X}$ e o $NC\bar{X}$ para calcular o $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$. Um $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$ válido é definido como $2,0 \leq HRC\bar{X}/NC\bar{X} \leq 15$.

Se o $HRC\bar{X}/NC\bar{X}$ for $<2,0$ ou >15 , a calibração do ensaio é inválida e o teste tem de ser repetido para todas as amostras das doentes. Assim, não apresentar relatórios relativos aos resultados da amostra da doente.

Cálculo de corte

O software de análise do ensaio *digene* calcula e apresenta relatórios dos quocientes URL/valor de corte e dos resultados positivos/negativos para todas as amostras. O valor de corte para determinar amostras positivas é o $HRC\bar{X}$. O software de análise do ensaio *digene* utiliza os valores URL da amostra para exprimir resultados como URL/valor de corte da amostra.

Para testes automatizados no RCS, o protocolo de ensaio do HPV no RCS aplica um fator de ajuste da calibração (CAF, calibration adjustment factor) de 0,8 ao $HRC\bar{X}$ válido. Este CAF é necessário para que as características de desempenho dos testes automatizados no RCS permaneçam equivalentes aos testes manuais. O CAF apenas é aplicado aos resultados do teste automatizado no RCS; por conseguinte, é crucial selecionar o protocolo de ensaio correto para gerar resultados do teste precisos.

Controlo de qualidade

As amostras de controlo de qualidade são fornecidas com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test e devem ser utilizadas para controlo de qualidade interno. Os controlos de qualidade fornecidos são alvos de ADN de HPV clonados e não são decorrentes de HPV na forma selvagem. Este é o mesmo tipo de material utilizado para os calibradores fornecidos. Poderão ser testados controlos de qualidade adicionais de acordo com as diretrizes ou os requisitos de regulamentos nacionais ou locais assim como de organizações de acreditação. Os controlos de qualidade fornecidos não funcionarão como um controlo de qualidade adequado para o processamento de solução PreservCyt ou SurePath Preservative Fluid.

Consultar o manual do utilizador do software de análise do ensaio *digene* aplicável para obter instruções sobre a introdução dos números de lote e das datas de validade dos controlos de qualidade. Para que um ensaio seja válido, o URL/valor de corte de cada controlo de qualidade deve ficar dentro dos critérios definidos conforme especificado na tabela 10, abaixo.

Se os controlos de qualidade não estiverem dentro destes intervalos, o ensaio é inválido e o teste deve ser repetido. Assim, não apresentar relatórios relativos aos resultados da doente.

Tabela 10. Critérios de validade do ensaio de controlo de qualidade

Controlo de qualidade	Mínimo (URL/valor de corte)	Máximo (URL/valor de corte)	CV (%)
QC1-LR	0.001	0.999	≤25
QC2-HR	2	8	≤25

Limitações

- O *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test para o papilomavírus humano dos tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 não está recomendado para a avaliação de suspeita de abuso sexual.
- A prevalência de infecção por HPV numa população pode afetar o desempenho. Os valores de previsão positivos diminuem quando se testam populações com baixa prevalência ou indivíduos que não apresentam risco de infecção.
- Um resultado negativo não exclui a possibilidade de infecção por HPV, uma vez que níveis muito baixos de infecção ou um erro na amostragem podem dar origem a um resultado negativo falso. Da mesma forma, este teste não deteta os tipos de ADN do HPV de baixo risco (6, 11, 42, 43 e 44).
- A infecção 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 cervical de alto grau ou cancro.
- Existe uma pequena percentagem de hibridização cruzada entre a sonda de HPV de alto risco e os tipos de HPV 6, 11, 40, 42, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 e MM9. As doentes cujas amostras apresentam níveis elevados destes tipos de HPV podem ser incorretamente encaminhadas para colposcopia (15, 35).
- O *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test destina-se a detetar tipos de HPV de alto risco, incluindo 39, 58, 59 e 68. Estudos analíticos levados a cabo pela QIAGEN, usando ADN plasmídico de HPV clonado, demonstram que o teste deteta estes tipos a concentrações que vão de 0,62 pg/ml a 1,39 pg/ml. Isto equivale às características de deteção de outros tipos de HPV visados pelo *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. A QIAGEN conseguiu validar a deteção destes tipos de HPV apenas num número limitado de amostras clínicas. Devido à baixa prevalência destes tipos na população geral (28), as características de desempenho do *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test para a deteção dos tipos de HPV 39, 58, 59 e 68 não foram estatisticamente confirmadas.
- Se estiverem presentes elevadas concentrações de creme antifúngico, gel contraceptivo ou água do duche no momento da recolha de uma amostra em STM para teste, é possível que se obtenha um resultado falso-negativo caso estas amostras contenham níveis de ADN de HPV que produzam valores de URL/valor de corte próximos do valor de corte do ensaio.
- Se estiverem presentes elevadas concentrações de creme antifúngico, gel lubrificante vaginal ou sangue no momento da recolha de uma amostra cervical em PreservCyt para preparação de amostras com o kit QIAasymphony DSP HPV Media, é possível que se obtenha um resultado falso-negativo, caso estas amostras contenham níveis de ADN de HPV que produzam valores de URL/valor de corte próximos do valor de corte do ensaio.

- Se estiver presente gel contraceptivo no momento da recolha de uma amostra cervical em PreservCyt para a preparação de amostras com o kit QIAasymphony DSP AXpH DNA, poderá ocorrer um resultado falso-negativo no teste.
- Se estiver presente gel contraceptivo, creme antifúngico ou creme anti-inflamatório no momento da recolha de uma amostra cervical em SurePath para a preparação de amostras com o kit QIAasymphony DSP HPV Media, poderá ocorrer um resultado falso-negativo no teste.
- É possível a ocorrência de reatividade cruzada entre a sonda de HPV de alto risco 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.
- Durante a realização de testes automatizados no RCS, a não observação visual da placa de hibridização para garantir uma transferência correta da amostra e a não correção de qualquer transferência incorreta da amostra poderá originar resultados falso-negativos.

Características de desempenho

Desempenho clínico durante o rastreio de doentes com resultados normais no esfregaço de Papanicolau como auxiliar na avaliação de risco para a gestão de doentes

A seguir são descritos os resultados de 8 estudos clínicos independentes realizados por instituições médicas, académicas e governamentais de renome em centros nos Estados Unidos e no estrangeiro. Os estudos utilizaram os métodos de Papanicolau estabelecidos, em uso nos países onde o estudo foi realizado. Em todos os casos, à exceção de 2, foi utilizado o sistema de Bethesda para interpretar os resultados do Papanicolau. Para mais informações sobre a terminologia equivalente de rastreio de cancro do colo do útero na Comunidade Europeia, consulte as orientações europeias relativas à garantia da qualidade do rastreio do cancro do colo do útero (36). 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 *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test em comparação com o esfregaço de Papanicolau 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 *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Tabela 11. Estimativas de desempenho — sensibilidade e especificidade

População	Sensibilidade (%)				Especificidade (%)		
	n	(n/N)			(n/N)		
		Intervalo de confiança (IC) 95%			IC 95%		
		Apenas Papanicolau	Apenas HPV	HPV + Papanicolau	Apenas Papanicolau	Apenas HPV	HPV + Papanicolau
Europa Ocidental 1	7592	51.6	96.3	100.0	98.5	96.2	95.1
		(14/27)	(26/27)	(27/27)	(7453/7565)	(7275/7565)	(7193/7565)
		32.0–71.3	81.0–99.9	87.2–100.0	98.2–98.8	95.7–96.6	94.6–95.6
América Latina 1	6115	58.4	94.8	97.4	98.7	93.9	93.4
		(45/77)	(73/77)	(75/77)	(5962/6038)	(5669/6038)	(5637/6038)
		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	89.7	94.1	94.1	94.0	89.9
		(53/68)	(61/68)	(64/68)	(5745/6108)	(5742/6108)	(5490/6108)
		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	89.7	92.5	86.4	80.0	76.4
		(90/107)	(96/107)	(99/107)	(2436/2818)	(2253/2818)	(2152/2818)
		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	100.0	100.0	76.3	83.0	68.0
		(41/42)	(42/42)	(42/42)	(1445/1894)	(1572/1894)	(1287/1894)
		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	100.0	100.0	97.6	96.2	95.5
		(1/2)	(2/2)	(2/2)	(1013/1038)	(999/1038)	(991/1038)
		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 do *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test disponíveis, dados do HCS utilizados caso contrário; dados combinados.

Tabela 12. Estimativas de desempenho — valor preditivo positivo e negativo

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

*Dados do *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test disponíveis, dados do HCS utilizados caso contrário; dados combinados.

Em todos os estudos, existe uma melhoria uniforme e frequentemente muito significativa, na sensibilidade do *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test em comparação com o Papanicolau apenas. Tal como para a sensibilidade, o valor preditivo negativo do HPV ultrapassa o do Papanicolau apenas em todos os casos, aproximando-se dos 100%. Este valor preditivo negativo demonstra a elevada probabilidade de ausência de doença cervical de grau elevado ou cancro em mulheres com citologia normal que não apresentem infeção por HPV.

Embora a especificidade do *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test seja inferior à do Papanicolau apenas, a análise do rácio 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 paciente para realizar colposcopia baseia-se em todas as informações clínicas e de risco, assim como o histórico da paciente disponível para o médico. Variáveis importantes incluem história de infeção por HPV e/ou esfregaço de Papanicolau com resultado anormal, idade na primeira relação

sexual, número de parceiros sexuais, e doenças sexualmente transmitidas concomitantes (37, 38).

Embora a prevalência de doença de grau elevado não varie significativamente entre os estudos a partir dos quais o desempenho foi determinado, a prevalência de infecção por HPV numa população poderá afetar o desempenho, e normalmente varia com a população de doentes. Além disso, foi demonstrado que a prevalência de infecção por HPV reduz dramaticamente com a idade (17, 24–29, 38–40). Os valores preditivos positivos reduzem quando se testam populações com baixa prevalência ou indivíduos com risco reduzido 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 levadas a cabo para demonstrar que as doentes com Papanicolau negativo/HPV negativo apresentam um risco menor de desenvolver doença cervical em comparação com mulheres tradicionalmente definidas como de risco reduzido cujo estado em termos de HPV não é conhecido e em comparação com doentes com Papanicolau negativo/HPV positivo (consultar as tabelas 13 e 14, abaixo).

Tabela 13. Análise longitudinal — risco relativo de doença de grau elevado

Grupo de estudo	Idade	Classificação de baixo risco	n	Casos de NIC 3+	Taxa (por 100 anos de doente)	Risco relativo IC 95%
NCI	30 e mais	Papanicolau normal, HPV negativo	12,054	28	0.043	0.897 (0.596–1.348)
		Resultados de Papanicolau normais consecutivos*	9429	19	0.048	1.000
	Todas	Papanicolau normal, HPV negativo	17,594	48	0.056	0.678 (0.514–0.894)
		Resultados de Papanicolau normais consecutivos*	13,392	44	0.082	1.000
França	30 e mais	Papanicolau normal, HPV negativo	1690	3	0.084	0.849 (0.307–2.35)
		Resultados de Papanicolau normais consecutivos†	2026	4	0.099	1.000
	Todas	Papanicolau normal, HPV negativo	2180	3	0.066	0.491 (0.221–1.09)
		Resultados de Papanicolau normais consecutivos†	2650	7	0.136	1.000

* Três resultados de Papanicolau normais em aproximadamente 2 anos.

† Dois resultados de Papanicolau normais em aproximadamente 2 anos.

Tabela 14. Análise longitudinal — taxas de doença estratificadas por estado de HPV na linha de base

Grupo de estudo	Idade	Estado na linha de base	n	Casos de NIC 3+	Taxa (por 100 anos de doente)	Risco relativo IC 95%
NCI	30 e mais	Papanicolau normal, HPV positivo	1078	24	0.451	10.50 (6.13–18.0)
		Papanicolau normal, HPV negativo	12,054	28	0.043	1.00
	Todas	Papanicolau normal, HPV positivo	2561	63	0.096	10.64 (7.33–15.5)
		Papanicolau normal, HPV negativo	17,594	48	0.056	1.00
França	30 e mais	Papanicolau normal, HPV positivo	419	14	2.346	27.3 (8.41–88.3)
		Papanicolau normal, HPV negativo	1696	3	0.084	1.00
	Todas	Papanicolau normal, HPV positivo	619	22	2.520	37.0 (11.8–116)
		Papanicolau normal, HPV negativo	2180	3	0.066	1.00

A utilidade clínica do resultado do teste de HPV é novamente demonstrada pelo risco acrescido de doença cervical em mulheres com resultado HPV positivo em comparação com mulheres com resultado HPV negativo.

Desempenho clínico durante o rastreio de doentes com resultados ASC-US no esfregaço de Papanicolau para determinar a necessidade de envio 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 esfregaços de Papanicolau 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 *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test 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 rastreio de cancro do colo do útero na Comunidade Europeia, consulte as orientações europeias relativas à garantia da qualidade do rastreio do cancro do colo do útero (42). 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 patologistas 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.

A amostra inicial foi testada com um protótipo do *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test que continha sondas para 11 dos 13 tipos de HPV (excluindo os tipos de HPV 59 e 68). Não se esperava que esta diferença resultasse num perfil de desempenho significativamente diferente para o teste..

Estiveram disponíveis resultados do High-Risk HPV DNA Test e diagnósticos histológicos de 885 mulheres com esfregaços de Papanicolau ASC-US. Os testes na maioria das pacientes foi feito com amostras recolhidas em solução STM e PreservCyt. Devido às semelhanças entre as características de desempenho do *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test para meio de transporte de amostras (STM) e para a solução PreservCyt, o desempenho do ensaio é apresentado apenas para solução PreservCyt

Entre as que apresentaram indicação de esfregaço de Papanicolau ASC-US, o valor preditivo negativo do *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test para uma HSIL ou doença mais grave na colposcopia é 99% (consultar a tabela 15, abaixo).

Tabela 15. Comparação do digene HC2 High-Risk HPV DNA Test contra histologia de consenso; população com indicação de Papanicolau ASC-US; estudo Kaiser, amostras em PreservCyt

		HSIL ou mais grave no momento da colposcopia		Total
		+	-	
digene HC2 High-Risk HPV DNA Test result	+	66	317	383
	-	5	497	502
Total		71	814	885

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

Os valores preditivos positivos e negativos teóricos baseados em diversas prevalências para um ASC-US inicial verificar-se ser HSIL ou mais grave com base em resultados de teste a HPV de alto risco são determinados (consultar a tabela 16, abaixo).

Tabela 16. Valor preditivo positivo e negativo teórico de teste a HPV de alto risco a partir de resultados no esfregaço de Papanicolau ASC-US

Prevalência teórica de HSIL	Resultado inicial de ASC-US no esfregaço de Papanicolau	
	Valor preditivo positivo no ensaio	Valor preditivo negativo no 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 variação entre os diversos grupos etários incluídos neste estudo é determinada (consultar a tabela 17, abaixo).

Tabela 17. Dados do estudo Kaiser: Desempenho do digene HC2 High-Risk HPV DNA Test face aos resultados da histologia de consenso (HSIL) — características específicas da idade

	Idade <30	Idade 30–39	Idade >39
n	287	233	365
Prevalência de doença (%)	12.2	11.2	2.7
Sensibilidade (%)	100	88.46	80.0
(n/N)	(35/35)	(23/26)	(8/10)
IC 95%	90.0–100.0	69.9–97.6	44.4–97.5
Especificidade (%)	31.4	66.2	79.15
(n/N)	(79/252)	(132/207)	(281/355)
IC 95%	25.7–37.5	59.3–72.6	74.6–83.3
Valor preditivo negativo (%)	100.0	97.86	99.29
(n/N)	(79/79)	(137/140)	(281/283)
Valor preditivo positivo (%)	16.83	24.73	9.76
(n/N)	(35/208)	(23/93)	(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 clínico em vários centros utilizando o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test 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 recolhidas. 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. Foram recolhidas amostras na altura da colposcopia. Foram testadas amostras com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test e os resultados foram comparados com o estado da doença determinado para cada paciente. 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 18, abaixo).

O *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test 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 de previsão negativo e positivo para a deteção de neoplasia cervical de alto grau. Devido às semelhanças entre as características de desempenho do *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test para meio de transporte de amostras e para a solução PreservCyt, o desempenho do ensaio é apresentado apenas para solução PreservCyt. Não foi observada qualquer diferença nos resultados do teste de HPV de alto risco para as amostras transportadas em STM e em solução PreservCyt.

Tabela 18. Algoritmo do grau da doença de doentes

Resultado da citologia	Resultado da histologia	Grau da doença
Negativo	Negativo ou não efetuado*	Negativo
LSIL	Negativo	LSIL
HSIL	Negativo	HSIL
Cancro	Negativo	HSIL+
Negativo	LSIL	LSIL
LSIL	Não efetuado*	LSIL
LSIL	LSIL	LSIL
HSIL	LSIL	LSIL
Cancro	LSIL	LSIL
Negativo	HSIL	HSIL
LSIL	HSIL	HSIL
HSIL	HSIL	HSIL
HSIL	Não efetuado*	HSIL
Cancro	HSIL	HSIL
Negativo	Cancro	HSIL+
LSIL	Cancro	HSIL+
HSIL	Cancro	HSIL+
Cancro	Não efetuado*	HSIL+
Cancro	Cancro	HSIL+

* Não se procedeu a biopsia e/ou curetagem endocervical (CEC) pois não foram observadas anomalias durante a colposcopia ou o resultado da histologia não se encontrava disponível.

O desempenho do *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test foi determinado usando 327 amostras em PreservCyt, 96 das quais foram colhidas de mulheres diagnosticadas com doença cervical de

grau elevado (consultar as tabelas 19 e 20, abaixo). As comparações foram levadas a cabo utilizando todas as doentes do estudo com resultados anormais no esfregaço de Papanicolau de referência.

Tabela 19. Resultados do teste ao HPV de alto risco

		Grau da doença final HSIL		Grau da doença final LSIL		Grau da doença final negativo		Total
		+	-	+	-	+	-	
Resultado no esfregaço de Papanicolau de referência	LSIL	44	4	78	33	28	37	224
	HSIL	45	3	29	14	5	7	103
	Total	89	7	107	47	33	44	327
	Total	96		154		77		327

O *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test 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 no esfregaço de Papanicolau de LSIL, HSIL ou equivalente (consultar a tabela 20, abaixo). O teste também demonstrou um valor preditivo negativo de cerca de 95% nesta população.

Tabela 20. Característica de desempenho do teste de ADN do HPV de alto risco entre doentes com esfregaço de Papanicolau de referência LSIL ou mais grave e um grau da doença final de HSIL

		Grau da doença final		Total
		HSIL	LSIL or negative	
Resultado do teste de ADN de HPV de alto risco	+	89	140	229
	-	7	91	98
	Total	96	231	327

Sensibilidade $[TP/(TP+FN)] = 92,7\%$ (89/96)
 IC 95% = 85,6–97,0
 Especificidade $[TN/(TN+FP)] = 39,4\%$ (91/231)
 IC 95% = 33,1–46,0
 Prevalência de doença para LSIL indicativo para HSIL final = 21,4%
 Prevalência de doença para HSIL indicativo para HSIL final = 46,6%
 Valor preditivo positivo geral = 38,9% (89/229)
 Valor preditivo negativo geral = 92,8% (91/98)

Embora a especificidade do *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test parecer ser um pouco baixa, não se espera uma correlação estrita entre a ausência de neoplasia e um resultado negativo para HPV. O ADN de HPV pode estar presente em mulheres que não tenham apresentação progressão para doença de grau elevado. De facto, quando foi realizado o teste da reacção em cadeia da polimerase (PCR) do HPV (um ensaio apenas utilizado para fins de investigação) em amostras com resultados positivos no *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test e cujo grau da doença correspondente foi inferior a neoplasia de grau reduzido, quase 75% foram positivos.

Foram determinados os valores preditivos positivos e negativos teóricos do *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test para resultados iniciais de LSIL ou HSIL no esfregaço de Papanicolau que se verificaram ser HSIL ou doença mais grave após colposcopia (consultar a tabela 21, abaixo).

Tabela 21. Valor preditivo positivo e negativo teórico do *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test de resultados iniciais de LSIL ou HSIL no esfregaço de Papanicolau

Prevalência teórica de HSIL	Resultado inicial de LSIL ou HSIL no esfregaço de Papanicolau	
	Valor preditivo positivo no ensaio	Valor preditivo negativo no ensaio
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

Desempenho de colheita vaginal ou auto-colheita

Na literatura citada para o desempenho do *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test de amostras vaginais colhidas pela própria paciente, foram inscritas mais de 141 000 mulheres entre os 16 e os 54 anos. As coortes do estudo incluíram mulheres da China (41, 42), do México (43, 44) e do Reino Unido (45). As conceções do estudo variaram ligeiramente, mas, regra geral, as mulheres com um resultado de teste positivo foram sujeitas a mais exames colposcópicos e os resultados foram comunicados em termos de sensibilidade e especificidade em contraponto com o método comparativo.

Em dois estudos em que havia dados disponíveis para comparar amostras colhidas pela própria paciente com amostras colhidas pelo médico, os resultados indicam uma grande sensibilidade a CIN2+ para os dois métodos (42, 45), 81–85% para amostras colhidas pela própria paciente e 96–100% para amostras colhidas pelo médico. Os resultados de especificidade foram similares para CIN2+ para os dois métodos (42, 45), 81–82% para amostras colhidas pela própria paciente e 83–85% para amostras colhidas pelo médico. Noutros estudos em que havia apenas dados sobre o desempenho das amostras colhidas pela própria paciente, o desempenho da sensibilidade do *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test para CIN2+ foi 3,4 vezes superior ao da citologia (43) e sensibilidade de 98% antes do ajuste da tendência de verificação (44).

Sensibilidade analítica

Um painel não clínico de ADN plasmídico de HPV clonado foi testado para determinar se cada um dos 13 tipos de HPV são detetados pelo *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test 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, 1,0 pg/ml, 0,5 pg/ml e 0,2 pg/ml) de cada um dos 13 tipos de ADN do HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) foi executada em triplicado. Calculou-se o sinal médio (em unidades relativas de luz, URL) para cada concentração de cada tipo de HPV e comparou-se com o calibrador positivo de alto risco.

O limite de deteção de cada tipo de HPV em STM é apresentado na tabela 22, abaixo. Os limites de deteção variaram entre 0,62 pg/ml e 1,39 pg/ml, dependendo do tipo de HPV testado. O limite de deteção médio para todos os 13 tipos de ADN do HPV foi de 1,08 pg/ml com um desvio padrão de 0,05 pg/ml.

Tabela 22. Resumo dos limites detetáveis de sensibilidade para cada tipo em STM

Tipo de ADN do HPV	Concentração de ADN de HPV detetável (pg/ml)	Desvio-padrão	IC 95%
16	1.09	0.06	0.94–1.29
18	1.05	0.05	0.88–1.29
31	1.01	0.05	0.91–1.15
33	1.35	0.02	1.26–1.45
35	1.11	0.05	0.95–1.31
39	1.39	0.09	1.16–1.71
45	1.14	0.04	0.99–1.35
51	0.78	0.10	0.70–0.88
52	1.37	0.06	1.21–1.58
56	0.62	0.04	0.58–0.67
58	0.82	0.04	0.73–0.94
59	1.10	0.06	1.00–1.21
68	1.19	0.04	1.03–1.39
Média (todos os tipos)	1.08	0.05	0.95–1.25

Equivalência entre tipos de amostras

Equivalência entre as amostras em meio de transporte de amostras (STM) e em solução PreservCyt (PC)

A equivalência entre as amostras em STM e em PreservCyt foi examinada para recuperação igual de ADN do HPV 18. Aproximadamente 10^6 células HeLa positivas com 18 genomas de HPV integrados foram contaminados em STM e num conjunto celular negativo PreservCyt. Cada tipo de amostra foi processado de acordo com o respetivo procedimento de processamento/desnaturação, descrito neste folheto informativo e testado com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Os resultados demonstraram que a recuperação do ADN do HPV 18 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 *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Equivalência entre a preparação manual de amostras em PreservCyt e a preparação de amostras em PreservCyt com o kit QIAasymphony DSP HPV Media

Foram realizados estudos utilizando amostras em PreservCyt colhidas de uma subpopulação de mulheres com citologia normal (n=1276) e uma subpopulação de mulheres com citologia ASC-

US ou superior a ASC-US (n=402). A preparação manual de amostras e a preparação de amostras com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media foram realizadas para cada amostra seguida de testes automatizados no RCS com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test (ver tabela 23, abaixo).

Tabela 23. Concordância de resultados da amostra em PreservCyt entre a preparação manual de amostras e a preparação de amostras com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media (n=1678)

Concordância positiva (%) (n/N) IC 95%		Concordância negativa (%) (n/N) IC 95%	
Todas positivas	Região fortemente positiva (URL/valor de corte $\geq 2,5$)	Todas negativas	Região fortemente negativa (URL/valor de corte $< 0,8$)
96.0 (409/426) 93.7–97.5	97.6 (372/381) 95.6–98.8	96.2 (1204/1252) 95.0–97.1	99.1 (1173/1184) 98.3–99.5

A sensibilidade e especificidade relativa do ensaio de amostras em PreservCyt preparadas utilizando o método de preparação de amostras com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media correlaciona-se fortemente com os resultados obtidos utilizando o método de preparação manual de amostras, tal como evidenciado pelo limite inferior de IC 95% para uma concordância quer positiva quer negativa.

Equivalência entre a preparação manual de amostras em PreservCyt e a preparação de amostras em PreservCyt com o kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA

Foram realizados estudos utilizando amostras em PreservCyt colhidas de uma subpopulação de mulheres com idades entre 30 anos e mais com citologia normal (n=1901) e uma subpopulação de mulheres com citologia ASC-US (n=398). A preparação manual de amostras e a preparação de amostras com o kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA foram realizadas para cada amostra seguida de testes com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test (ver tabela 24, abaixo).

Tabela 24. Concordância de resultados da amostra em PreservCyt entre a preparação manual de amostras e a preparação de amostras com o kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA (n=2299)

Concordância positiva (%) (n/N) IC 95%		Concordância negativa (%) (n/N) IC 95%	
Região fortemente positiva (URL/valor de corte $\geq 2,5$)		Região fortemente negativa (URL/valor de corte $< 0,8$)	
Todas positivas		Todas negativas	
92.7	96.5	99.1	99.9
(281/303)	(245/254)	(1978/1996)	(1967/1969)
89.3–95.2	93.4–98.1	98.6–99.4	99.6–100.0

A sensibilidade e especificidade relativa do ensaio de amostras em PreservCyt preparadas utilizando o método de preparação de amostras com o kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA correlaciona-se fortemente com os resultados obtidos utilizando o método de preparação manual de amostras, tal como evidenciado pelo limite inferior de IC 95% para uma concordância quer positiva quer negativa.

Equivalência entre STM e preparação manual de amostras de pellet de células após gradiente em SurePath

Uma avaliação clínica em duas fases foi levada a cabo utilizando 6 centros de colheita e 3 locais de teste nos Estados Unidos. Doentes que frequentavam uma clínica de DST, clínica de obstetrícia/ginecologia, clínica de colposcopia, hospital ou centro de planeamento familiar eram elegíveis para inscrição em conformidade com critérios de inclusão e exclusão predeterminados.. A fase de viabilidade, destinada a determinar um valor de corte (VC) aplicável do *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test para utilização com amostras de pellet de células após gradiente em SurePath, contou aproximadamente com 400 doentes inscritas. A fase de validação clínica, que contou aproximadamente com 1500 doentes inscritas para validar o VC escolhido, teve início após uma análise provisória da fase de viabilidade ter demonstrado que um VC de 1,0 URL/VC utilizando amostras de pellet de células após gradiente em SurePath produziu uma concordância aceitável com os resultados das amostras em STM.

Em ambas as fases de avaliação, amostras cervicais SurePath e em STM emparelhadas foram colhidas de cada participante do sexo feminino com consentimento. A amostra em SurePath foi então enviada para um laboratório de citologia para preparação das lâminas. Após preparação citológica, as restantes amostras de pellet de células após gradiente em SurePath e a amostra em

STM correspondente foram testadas com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test utilizando um VC de 1,0 URL/VC (consultar a tabela 25 abaixo).

Tabela 25. Concordância dos resultados da amostra de pellet de células após gradiente em SurePath com os resultados da amostra em STM (todas as idades e classificação citológica) (n=1490)

Concordância positiva (%) (n/N) IC 95%		Concordância negativa (%) (n/N) IC 95%	
Todas positivas	Região fortemente positiva (URL/valor de corte $\geq 2,5$)	Todas negativas	Região fortemente negativa (URL/valor de corte $< 0,80$)
93.5 (401/429) 90.7–95.6	96.4 (378/392) 94.1–98.0	95.3 (1011/1061) 93.8–96.5	96.0 (1002/1044) 94.6–97.1

A sensibilidade e especificidade relativa do ensaio de teste de amostras de pellet de células após gradiente em SurePath correlaciona-se fortemente com os resultados obtidos no teste de amostras em STM conforme evidenciado pelo limite inferior do IC 95% para a concordância positiva e negativa.

Equivalência entre a preparação manual de amostras de pellet de células após gradiente em SurePath e a preparação de amostras em SurePath com o kit QIAasymphony DSP HPV Media

Foram realizados estudos com amostras em SurePath recolhidas das seguintes subpopulações:

- mulheres com citologia normal (n=1189)
- mulheres com uma citologia de ASC-US ou superior a ASC-US (n=199)

Para cada amostra em SurePath, foi realizada uma preparação com o kit QIAasymphony DSP HPV Media e uma preparação manual da amostra de pellet de células após gradiente. O teste automatizado no RCS com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test (ver tabela 26 abaixo) foi realizado para cada uma das amostras preparadas.

Tabela 26. Concordância de resultados entre a preparação manual de amostras em SurePath e a preparação de amostras em SurePath com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media (n=1388)

Concordância positiva (%)		Concordância negativa (%)	
(n/N)		(n/N)	
IC 95%		IC 95%	
Região fortemente positiva		Região fortemente negativa	
Todas positivas	(URL/valor de corte $\geq 2,5$)	Todas negativas	(URL/valor de corte $< 0,8$)
91.7	97.5	99.0	99.7
(222/242)	(192/197)	(1134/1146)	(1124/1127)
87.6–94.6	94.2–98.9	98.2–99.4	99.2–99.9

A sensibilidade e especificidade relativa do ensaio de amostras em SurePath preparadas utilizando o método de preparação de amostras com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media correlaciona-se fortemente com os resultados obtidos utilizando o método de preparação manual de amostras, tal como evidenciado pelo limite inferior de IC 95% para uma concordância quer positiva quer negativa.

Equivalência entre a preparação manual de amostras de pellet de células após gradiente em SurePath e a preparação de amostras de pellet de células após gradiente em SurePath com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media

Foram realizados estudos com amostras em SurePath recolhidas das seguintes subpopulações:

- mulheres com citologia normal (n=1200)
- mulheres com uma citologia de ASC-US ou superior a ASC-US (n=183)

A preparação manual de amostras e a preparação de amostras com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media foram realizadas para cada amostra de pellet de células após gradiente em SurePath seguida de testes automatizados no RCS com o digene HC2 High-Risk HPV DNA Test (ver tabela 27 abaixo).

Tabela 27. Concordância de resultados da amostra de pellet de células após gradiente em SurePath entre a preparação manual de amostras e a preparação de amostras com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media (n=1383)

Concordância positiva (%) (n/N) IC 95%		Concordância negativa (%) (n/N) IC 95%	
Todas positivas	Região positiva forte URL/VC ≥ 2,5	Todas negativas	Região negativa forte URL/VC ≥ 0,8
92.6	97.4	94.4	99.3
(188/203)	(147/151)	(1114/1180)	(1078/1086)
88.2–95.5	93.4–99.0	92.9–95.6	98.6–99.6

A sensibilidade e especificidade relativa do ensaio de amostras de pellet de células após gradiente em SurePath preparadas utilizando o método de preparação de amostras com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media correlaciona-se fortemente com os resultados obtidos utilizando o método de preparação manual de amostras, tal como evidenciado pelo limite inferior de IC 95% para uma concordância quer positiva quer negativa..

Concordância entre métodos de teste

Um estudo multicêntrico (n=2270) foi levado a cabo para avaliar os resultados do teste clínico com o RCS em comparação com os resultados do teste utilizando o método manual. O teste foi realizado em 3 locais, externos à QIAGEN, com amostras de doentes colhidas em 5 locais de colheita. O conjunto de dados consistiu em 1269 amostras cervicais colhidas em solução PreservCyt e 1001 amostras colhidas em STM.

As concordâncias estatísticas, entre amostras correspondentes testadas com o RCS e com o teste manual, foram calculadas para esta população de doentes (consultar as tabelas 28 e 29, abaixo).

Tabela 28. Resumo da concordância entre o teste automatizado RCS e o teste manual — amostras em STM (n=1001)

Classificação citológica	Prevalência de HPV (%)	Concordância positiva (%)		Concordância negativa (%)	
		(n/N) IC 95%		(n/N) IC 95%	
		Todas positivas	Região fortemente positiva (URL/valor de corte >2,5)	Todas negativas	Região fortemente negativa (URL/valor de corte <0,8)
DLN* <30 anos	21	99.3 (139/140) 96.1–100.0	99.1 (112/113) 95.2–100.0	99.3 (538/542) 98.1–99.8	100.0 (531/531) 99.3–100.0
DLN ≥30 anos	15	92.0 (23/25) 74.0–99.0	93.8 (15/16) 69.8–99.8	100.0 (143/143) 97.5–100.0	100.0 (142/142) 97.4–100.0
ASC-US	65	98.1 (51/52) 89.7–100.0	100.0 (47/47) 92.4–100.0	96.4 (27/28) 81.7–99.9	100.0 (26/26) 86.8–100.0
LSIL+	96	100.0 (65/65) 94.5–100.0	100.0 (62/62) 94.2–100.0	66.7 (2/3) 9.4–99.2	66.7 (2/3) 9.4–99.2
Outro	33	100.0 (1/1) 2.5–100.0	100.0 (1/1) 2.5–100.0	100.0 (2/2) 15.8–100.0	100.0 (2/2) 15.8–100.0
Todas amostras em STM	28	98.6 (279/283) 96.4–99.6	99.2 (237/239) 97.0–99.9	99.2 (712/718) 98.2–99.7	99.9 (703/704) 99.2–100.0

* DLN = dentro dos limites da normalidade

Tabela 29. Resumo da concordância entre o teste automatizado RCS e o teste manual — amostras em PreservCyt (n=1269)

Classificação citológica	HPV Prevalência (%)	Concordância positiva (%) (n/N) IC 95%		Concordância negativa (%) (n/N) IC 95%	
		Todas positivas	Classificação citológica	HPV Prevalência (%)	Todas positivas
DLN <30 anos	20	96.2 (75/78) 89.2–99.2	100.0 (64/64) 94.4–100.0	98.4 (301/306) 96.2–99.5	99.0 (293/296) 97.1–99.8
DLN ≥30 anos	8	88.7 (47/53) 77.0–95.7	92.1 (35/38) 78.6–98.3	99.1 (578/583) 98.0–99.7	99.5 (571/574) 98.5–99.9
ASC-US	36	100.0 (48/48) 92.6–100.0	100.0 (46/46) 92.3–100.0	96.6 (84/87) 90.3–99.3	96.5 (83/86) 90.1–99.3
LSIL+	77	100.0 (64/64) 94.4–100.0	100.0 (62/62) 94.2–100.0	89.5 (17/19) 66.9–98.7	88.9 (16/18) 65.3–98.6
Outra citologia	11	100.0 (3/3) 29.2–100.0	100.0 (3/3) 29.2–100.0	100.0 (24/24) 85.6–100.0	100.0 (24/24) 85.8–100.0
Todas amostras em PreservCyt*	20	96.4 (238/247) 93.2–98.3	98.6 (211/214) 96.0–99.7	98.5 (1007/1022) 97.6–99.2	98.9 (990/1001) 98.0–99.4

* DLN = dentro dos limites da normalidade.

† Dados da citologia indisponíveis para 4 doentes.

Foi efetuado um estudo clínico suplementar utilizando amostras em PreservCyt residuais arquivadas colhidas de uma subpopulação de mulheres com idades igual ou superior a 30 anos com citologia normal (consultar a tabela 30, abaixo) com uma prevalência de HPV de 4,8%.

Tabela 30. Resumo da concordância entre o teste automatizado RCS e o teste manual — mulheres DLN com idade igual ou superior a 30 anos (n=2077)

Concordância positiva (%) (n/N) IC 95%		Concordância negativa (%) (n/N) IC 95%	
Todas positivas	Região fortemente positiva (URL/valor de corte >2,5)	Todas negativas	Região fortemente negativa (URL/valor de corte <0,8)
92.0 (92/100) 84.84–96.48	91.8 (78/85) 83.77–96.62	99.3 (1964/1977) 98.88–99.65	99.7 (1944/1949) 99.40–99.92

Surgiram 7 resultados discordantes entre os resultados do teste manual e o teste manual automatizado no RCS na região fortemente positiva. Os resultados iniciais do teste manual para estas 7 amostras encontravam-se fora do algoritmo de repetição de teste de amostras em PreservCyt recomendado; no entanto, uma vez que a conceção do estudo exigia o teste de todas as amostras em triplicado, havia disponíveis resultados repetidos para elucidar resultados discrepantes.

Os dados de testes repetidos para cada uma das 7 amostras discordantes sugere que todas as amostras discordantes são negativas para ADN de HPV (consultar a tabela 31, abaixo). Com base nos resultados negativos repetidos obtidos para ambas as réplicas, cada um dos resultados do teste manual inicialmente positivos foi, provavelmente, falso-positivo.

Ta Tabela 31. Amostras em PreservCyt discordantes para mulheres DLN com idade igual ou superior a 30 anos (n=7)

Amostra	Local	Testes manuais (URL/valor de corte)			Testes automatizados no RCS (URL/valor de corte)		
		Inicial	Repetição 1	Repetição 2	Inicial	Repetição 1	Repetição 2
1	A	2.51	0.08	0.08	0.12	0.17	0.14
2	A	20.18	0.08	0.09	0.19	0.24	0.20
3	A	3.88	0.12	0.11	0.17	0.22	0.22
4	A	9.37	0.09	0.09	0.15	0.21	0.20
5	A	6.01	0.17	0.13	0.25	0.30	0.30
6	B	2.97	0.71	0.99	1.59	0.89	0.90
7	C	11.01	0.16	0.14	0.19	0.15	0.21

Os resultados deste estudo clínico indicam uma concordância geral entre os testes automatizados no RCS e manuais utilizando amostras em STM ou em PreservCyt.

Reprodutibilidade

Reprodutibilidade geral do teste manual

Foi levado a cabo um estudo de reprodutibilidade multicêntrico para determinar a reprodutibilidade entre dias, entre local e geral do *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test utilizando um painel de ADN de HPV visados 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 *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test 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 PreservCyt
- Calibrador negativo
- Calibrador de HPV de alto risco positivo 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 todos os dias em triplicado utilizando o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Os resultados indicaram que a reprodutibilidade do *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test com amostras clínicas é muito boa (consultar a tabela 32, abaixo).

Tabela 32. Reprodutibilidade geral — reprodutibilidade multicentro (todos os ensaios em todos os locais)

Medida estatística	Resultado
Positivos esperados com um resultado positivo observado (IC 95%)	100.0% (99.0–100.0)
Negativos esperados com um resultado negativo observado (IC 95%)	99.0% (97.49–99.73)
Concordância (IC 95%)	99.5% (98.70–99.86)
Kappa	0.990

Reprodutibilidade com amostras clínicas em STM

Testes manuais

Foi levado a cabo um estudo para avaliar a reprodutibilidade de testes manuais e amostras clínicas em STM com o **digene** HC2 High-Risk HPV DNA Test. Um painel de 20 membros composto por conjuntos clínicos (10 positivos e 10 negativos) foi preparado combinando amostras em STM anteriormente testadas. 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 utilizando mistura para sonda combinada da sonda de HPV de alto risco e uma sonda de HPV de baixo risco. Não se esperava que reprodutibilidade do teste divergisse quando se utilizasse apenas a mistura para sonda no **digene** HC2 High-Risk HPV DNA Test. O URL/valor de corte médio e o IC de 95% próximo da média foram calculados (consultar a tabela 33, abaixo).

Tabela 33. Reprodutibilidade de amostras em STM — teste manual (ordem decrescente por URL/valor de corte médio)

ID da amostra	URL/valor de corte médio	IC 95%	Resultado positivo no teste (%) (n/N)
10	3.18	3.02–3.35	100 (20/20)
20	1.43	1.36–1.50	100 (20/20)
11	1.25	1.20–1.28	100 (20/20)
12	1.21	1.15–1.27	100 (20/20)
15	1.20	1.14–1.25	100 (20/20)
13	1.07	1.01–1.11	80 (16/20)
16	1.06	1.01–1.09	75 (15/20)
17	1.04	1.00–1.06	80 (16/20)
14	0.98	0.92–1.02	45 (9/20)
18	0.92	0.87–0.96	20 (4/20)
19	0.72	0.68–0.75	0 (0/20)
7	0.40	0.33–0.46	0 (0/20)
4	0.38	0.35–0.39	0 (0/20)
9	0.37	0.32–0.41	0 (0/20)
1	0.35	0.32–0.36	0 (0/20)
2	0.35	0.31–0.37	0 (0/20)
8	0.32	0.29–0.34	0 (0/20)
3	0.30	0.27–0.31	0 (0/20)
6	0.27	0.24–0.30	0 (0/20)
5	0.26	0.23–0.28	0 (0/20)

Para as 5 amostras com URL/VC médios 20% ou mais acima do valor de corte, 100 das 100 réplicas (100,0%) foram positivas. Para as 5 amostras com URL/VC médios 20% acima ou abaixo do valor de corte, 60 de 100 (60%; IC 95% = 49,7–69,6) das réplicas foram positivas e 40 de 100 (40%) foram negativas. Para as 10 amostras com o URL/VC médios 20% ou mais abaixo do valor de corte, 200 de 200 réplicas (100%) foram negativas.

Os resultados indicam que as amostras a 20% ou mais afastados do VC poderá produzir resultados consistentes. As amostras próximas do valor de corte produziram números aproximadamente iguais de resultados positivos e negativos. Estes dados demonstram que o teste manual de amostras em STM com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test produzem resultados reprodutíveis.

Testes automatizados no RCS

Foi levado a cabo um estudo para avaliar a reprodutibilidade no ensaio, dia a dia e entre laboratórios do teste automatizado no RCS de amostras em STM com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Foi testado um painel de 16 membros de amostras clínicas em conjunto (consultar a tabela 34, abaixo) utilizando um único lote de reagentes, duas vezes por dia em 3 dias diferentes. Cada membro do painel foi testado em quadruplicado.

Tabela 34. Reprodutibilidade de amostras em STM — Composição do painel de teste automatizado no RCS

Membro do painel	URL/valor de corte aproximado	Resultado esperado no teste
1N	<0.4	Negativo
2N	0.4–0.8	Negativo
3P	0.8–1.2	Alto negativo/baixo positivo
4P	0.8–1.2	Alto negativo/baixo positivo
5P	0.8–1.2	Alto negativo/baixo positivo
6P	1.2–2.0	Baixo positivo
7P	1.2–2.0	Baixo positivo
8P	1.2–2.0	Baixo positivo
9P	2.0–5.0	Baixo positivo
10P	5.0–10.0	Médio positivo
11N	<0.4	Negativo
12N	<0.4	Negativo
13N	<0.4	Negativo
14XR	Material clínico positivo para ADN de HPV de baixo risco em conjunto negativo clínico em STM	Alto negativo/baixo positivo
15XR	ADN plasmídico de HPV de baixo risco em conjunto negativo clínico em STM	Alto negativo/baixo positivo
16XR	Controlo do vetor do ADN plasmídeo em conjunto negativo clínico em STM	Alto negativo/baixo positivo

Dois membros do painel (14XR e 15XR) foram incluídos para avaliar a possível hibridização cruzada da mistura para sonda do *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test com amostras que contenham apenas tipos de ADN de HPV de baixo risco 6, 11, 42, 43 e 44. O membro do painel 16XR era composto por ADN pGEM® numa concentração de 1,49 ng/ml e servido como controlo de vetor para o membro do painel 15XR. Os resultados deste teste não apresentaram quaisquer resultados falso-positivos devido à presença de tipos de ADN de HPV de baixo risco em amostras clínicas. Estes resultados são consistentes com os testes manuais.

A reprodutibilidade foi calculada de acordo com o método descrito pelo NCCLS E5-A* (consultar a tabela 35, abaixo). Este método requer o cálculo de componentes de variância para cada uma das fontes de variabilidade: laboratório, dia, ensaio e erro (definido como variação inter-ensaio e entre ensaios)..

* NCCLS. Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline (Avaliação do desempenho preciso de dispositivos de química clínica; norma orientadora aprovada). Documento E5-A do NCCLS (1999).

Tabela 35. Reprodutibilidade de amostras em STM — Teste automatizado no RCS; reprodutibilidade quantitativa

Membro do painel	n	URL/valor de corte médio	Desvio-padrão					CV total (%)
			No ensaio	Entre ensaios	Entre dias	Entre laboratórios	Total	
1N	72	0.13	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	15.10
2N	72	0.36	0.03	0.01	0.03	0*	0.04	11.69
3P	72	0.96	0.06	0.06	0.04	0*	0.09	9.55
4P	72	1.03	0.06	0.18	0.06	0*	0.19	18.81
5P	72	1.41	0.11	0.14	0.15	0.06	0.24	17.00
6P	72	1.73	0.10	0.27	0*	0.11	0.31	18.10
7P	72	1.74	0.12	0.21	0*	0*	0.24	13.78
8P†	70	1.95	N/A‡	N/A‡	N/A‡	N/A‡	0.47	23.80
9P	72	5.21	0.34	0.44	0.21	0*	0.59	11.36
10P	72	7.67	0.46	0.63	0.71	0*	1.05	13.70
11N	72	0.13	0.01	0.01	0.01	0*	0.02	16.89
12N	72	0.17	0.03	0.06	0.03	0*	0.07	39.14
13N	72	0.15	0.02	0.02	0*	0.01	0.03	17.01

* Os componentes de variância negativos são definidos para igual a zero.

† Duas réplicas inválidas para o membro do painel 8P impedem a análise do componente de variância devido à diferença do tamanho dos grupos em comparação.

‡ N/A: a análise de variância não é possível devido ao número menor de réplicas em relação a outros membros do painel.

Reprodutibilidade de amostras clínicas em PreservCyt

Testes manuais

A reprodutibilidade de testes manuais a amostras em PreservCyt com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test foi determinada num estudo em que se utilizaram 24 reproduções de amostras com diversas concentrações de ADN de HPV. As amostras eram compostas por solução PreservCyt e glóbulos brancos, com e sem bactérias com plasmídeo de HPV 16.

As amostras foram testadas em réplicas de 4 em cada um dos 5 dias para um total de 20 réplicas por amostra. Em cada um dos 5 dias do estudo, foi preparada uma amostra de 8 ml para cada amostra de acordo com as instruções de utilização do *digene* HC2 Sample Conversion Kit e as mesmas foram testadas. A média e o IC 95% foram calculados (consultar a tabela 36, abaixo).

Tabela 36. Reprodutibilidade de amostras em PreservCyt — teste manual com preparação manual da amostra; reprodutibilidade qualitativa (ordem decrescente por URL/valor de corte médio)

ID da amostra	URL/valor de corte médio	IC 95%	Resultado positivo no teste (%) (n/N)
21	3.51	3.19–3.83	100 (20/20)
12	1.58	1.48–1.69	100 (20/20)
13	1.42	1.32–1.52	100 (20/20)
17	1.38	1.23–1.53	90 (18/20)
18	1.36	1.23–1.48	95 (19/20)
15	1.32	1.16–1.49	85 (17/20)
23	1.17	1.06–1.27	75 (15/20)
16	1.14	1.07–1.20	75 (15/20)
20	1.10	0.96–1.21	85 (17/20)
19	1.06	0.95–1.17	45 (9/19)
22	1.05	0.99–1.10	70 (14/20)
11	1.04	0.96–1.11	65 (13/20)
14	0.94	0.86–1.01	25 (5/20)
24	0.77	0.73–0.81	0 (0/20)
3	0.28	0.25–0.30	0 (0/20)
1	0.27	0.24–0.30	0 (0/20)
7	0.27	0.25–0.30	0 (0/20)
2	0.27	0.25–0.28	0 (0/20)
5	0.26	0.24–0.28	0 (0/20)
4	0.24	0.22–0.25	0 (0/20)
9	0.23	0.21–0.25	0 (0/20)
8	0.22	0.18–0.27	0 (0/20)
10	0.22	0.20–0.25	0 (0/20)
6	0.19	0.17–0.21	0 (0/20)

Para as 6 amostras com URL/VC médios 20% ou mais acima do valor de corte, 114 das 120 réplicas (95,0%) foram positivas. Para as 7 amostras com URL/VC médios 20% acima ou abaixo do valor de corte, 88 de 139 (63,3%; IC 95% = 54,3–70,9) das réplicas foram positivas e 51 de 139 (36,7%) foram negativas. Para as 4 amostras 10% acima ou abaixo do valor de corte, 41 das 79 (51,9%) réplicas foram positivas e 38 das 79 (48,1%) foram negativas. Para as 11 amostras com o URL/VC médios 20% ou mais abaixo do valor de corte, 220 de 220 réplicas (100%) foram negativas.

Os resultados indicam que as amostras a 20% ou mais afastados do VC poderá produzir resultados consistentes. As amostras próximas do valor de corte produziram números aproximadamente iguais de resultados positivos e negativos. Estes dados demonstram que o teste manual de amostras em PreservCyt com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test produzem resultados reprodutíveis.

Teste automatizado no RCS com preparação manual da amostra.

Um estudo interno a testes automatizados no RCS foi levado a cabo utilizando amostras clínicas em PreservCyt obtidas predominantemente de mulheres com um resultado na citologia de ASC-US ou superior a ASC-US (prevalência de HPV de 57%). As amostras foram divididas em 2 alíquotas; cada alíquota foi então processada individualmente utilizando o *digene* HC2 Sample Conversion Kit e testada em duplicado com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Tal como para outros testes qualitativos de diagnóstico in vitro (IVD), a variabilidade nos resultados do *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test obtida a partir de amostras clínicas está associada principalmente a um ou uma combinação dos seguintes aspetos: colheita da amostra, preparação da amostra e procedimento de teste. Dado que os resultados do teste comparados foram obtidos da mesma amostra clínica, a conceção experimental foi controlada quanto a variabilidade devido à colheita da amostra. A repetibilidade dos resultados obtidos a partir de 2 alíquotas de amostras preparadas individualmente da mesma amostra clínica (indicada abaixo como “entre alíquotas preparadas”) reflete a variação devido à combinação do mesmo procedimento de preparação e teste. A repetibilidade dos resultados obtidos da mesma alíquota de amostra (indicada abaixo como “na alíquota preparada”) reflete a variação apenas do procedimento de teste (consultar a tabela 37, abaixo).

Tabela 37. Reprodutibilidade de amostras em PreservCyt — Teste automatizado no RCS com preparação manual da amostra; reprodutibilidade qualitativa

		Concordância positiva (%) (n/N) IC 95%	Concordância negativa (%) (n/N) IC 95%	Concordância geral (%) (n/N) IC 95%
Análise				
Na alíquota preparada	Todos os dados	99.62 (261/262) 97.9–100.0	94.7 (160/169) 90.1–97.5	97.7 (421/431) 95.8–98.9
	Regiões fortemente positivas e fortemente negativas	100.0 (249/249) 98.5–100.0	98.2 (160/163) 94.7–99.6	99.3 (409/412) 97.9–99.9
Entre alíquotas preparadas	Todos os dados	99.6 (264/265) 97.9–100.0	98.2 (163/166) 94.8–99.6	99.1 (427/431) 97.6–99.8
	Regiões fortemente positivas e fortemente negativas	100.0 (249/249) 98.5–100.0	99.4 (161/162) 96.6–100.0	99.8 (410/411) 98.7–100.0

Foi levado a cabo um estudo adicional para avaliar a reprodutibilidade quantitativa de resultados obtidos com o teste automatizado no RCS de amostras em PreservCyt simuladas. Os três locais de teste, incluindo a QIAGEN, participaram no estudo.

Cada um dos laboratórios onde foram realizados os testes levaram a cabo testes automatizados no RCS e manuais do *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test duas vezes por dia em 5 dias diferentes com um painel de reprodutibilidade de 6 membros fornecido. Cada membro do painel era composto por culturas de células contaminadas em solução PreservCyt destinadas a produzir um valor URL/valor de corte aproximado (consultar a tabela 38, abaixo).

Os membros do painel de ADN positivo de HPV foram preparados através da adição de quantidades variáveis de células SiHa com ADN positivo para HPV (de uma linhagem celular de um laboratório). O membro negativo do painel era composto por células Jurkat negativas para HPV (de uma linhagem celular de um laboratório diferente). A concentração celular final de todos os 6 membros do painel foi aproximadamente 5×10^4 células/ml.

Tabela 38. Reprodutibilidade de amostras em PreservCyt — Teste automatizado no RCS com preparação manual da amostra; reprodutibilidade quantitativa dos membros do painel

Membro do painel	Tipo de célula	URL/valor de corte aproximado	Resultado esperado
1N	Jurkat	<1.0	Negativo
2N	Jurkat	<1.0	Negativo
3P	SiHa e Jurkat	5.0–8.0	Baixo positivo
4P	SiHa e Jurkat	5.0–8.0	Baixo positivo
5P	SiHa	30.0–50.0	Médio positivo
6P	SiHa	200.0	Alto positivo

A reprodutibilidade foi calculada de acordo com o método descrito pelo NCCLS E5-A* (consultar a tabela 39, abaixo). Este método requer o cálculo de componentes de variância para cada uma das fontes de variabilidade: laboratório, dia, ensaio e erro (definido como variação inter-ensaio e entre ensaios). Cada um dos 6 membros do painel foi testado em quadruplicado em cada um dos 10 ensaios (2 ensaios por dia durante 5 dias de teste) em cada um dos 3 laboratórios de teste.

Tabela 39. Reprodutibilidade de amostras em PreservCyt — Teste automatizado no RCS com preparação manual da amostra; reprodutibilidade quantitativa

Panel member	n	Mean RLU/CO	Standard deviation				Total	Total CV (%)
			Within run	Between run	Between day	Between lab		
1N	120	0.20	0.04	0.01	0.01	0.08	0.089	44.4
2N	120	0.20	0.06	0.01	0*	0.08	0.10	52.2
3P	120	4.05	0.76	1.17	0*	0.26	1.42	35.1
4P	120	4.23	0.74	0.86	0*	0.31	1.18	27.8
5P	120	28.6	5.00	5.61	4.41	0*	8.71	30.5
6P	120	214.6	33.95	27.25	18.09	25.53	53.61	25.0

* Negative variance components are set equal to zero.

Para complementar este estudo de reprodutibilidade inicial com dados de amostras muito próximos do ponto de corte do ensaio, foi levado a cabo um estudo de precisão adicional num local externo à QIAGEN utilizando o RCS.

* NCCLS. Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline (Avaliação do desempenho preciso de dispositivos de química clínica; norma orientadora aprovada). Documento E5-A do NCCLS (1999).

O painel era composto por 1 membro negativo, 2 membros negativos ou baixo positivos e 2 membros baixo positivos. Cada membro do painel foi preparado através da contaminação de culturas de células Jurkat e SiHa em solução PreservCyt para produzir os quocientes URL/valor de corte visados (consultar a tabela 40, abaixo).

Este local externo concluiu o teste automatizado no RCS utilizando um único lote de reagentes do *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test para cada execução do teste, realizando o teste 2 vezes por dia em 3 dias diferentes com um painel de 5 membros fornecido de amostras simuladas em PreservCyt. Cada membro do painel foi dividido em 4 amostras e todas as 4 amostras foram testadas na mesma microplaca (consultar a tabela 41, abaixo).

Tabela 40. Reprodutibilidade de amostras em PreservCyt — Teste automatizado no RCS com preparação manual da amostra; reprodutibilidade quantitativa próxima dos membros do painel de VC do ensaio

Membro do painel	URL/valor de corte aproximado	Resultado esperado
1N	0.2	Negativo
2N	0.8–1.2	Alto negativo/baixo positivo
3P	0.8–1.2	Alto negativo/baixo positivo
4P	1.2–2.0	Baixo positivo
5P	1.2–2.0	Baixo positivo

Tabela 41. Reprodutibilidade de amostras em PreservCyt — Teste automatizado no RCS com preparação manual da amostra; reprodutibilidade quantitativa próxima do VC do ensaio

Membro do painel	n	URL/valor de corte médio	Desvio-padrão				Total CV (%)
			No ensaio	Entre ensaios	Entre dias	Total	
1N	24	0.14	0.01	0*	0.02	0.02	15.12
2N	24	1.39	0.14	0.15	0*	0.21	14.84
3P	24	1.31	0.16	0*	0.11	0.19	14.70
4P	24	1.74	0.13	0.21	0.18	0.31	17.73
5P	24	1.63	0.24	0.20	0.26	0.40	24.63

* Os componentes de variância negativos são definidos para igual a zero.

Preparação de amostras com o kit QIAasymphony DSP HPV Media.

Foi realizado um estudo interno de preparação de amostras com o kit QIAasymphony DSP HPV Media utilizando amostras clínicas em PreservCyt obtidas de mulheres com um dos seguintes resultados citológicos:

- ASC-US ou superior a ASC-US
- negativo para lesão intraepitelial ou malignidade (NILM)

Foram removidas duas amostras de cada amostra. Cada amostra foi preparada individualmente com o kit QIAasymphony DSP HPV Media e os resultados foram determinados por teste automatizado no RCS com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Tal como para outros testes qualitativos de diagnóstico in vitro (IVD), a variabilidade nos resultados do *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test obtida a partir de amostras clínicas está associada principalmente a um ou uma combinação dos seguintes aspetos: colheita da amostra, preparação da amostra e procedimento de teste. Dado que os resultados do teste comparados foram obtidos da mesma amostra clínica (indicado como “entre amostras”), a conceção experimental foi controlada quanto a variabilidade devido à colheita da amostra. A reprodutibilidade de resultados (consultar a tabela 42, abaixo) obtida de 2 amostras preparadas individualmente a partir da mesma amostra clínica, reflete a variação devida à preparação da amostra e ao procedimento de teste.

T Tabela 42. Reprodutibilidade de amostras PreservCyt — preparação de amostras com o kit QIAasymphony DSP HPV Media; reprodutibilidade qualitativa entre amostras

Concordância positiva (%)	Concordância negativa (%)	Concordância geral (%)
(n/N)	(n/N)	(n/N)
IC 95%	IC 95%	IC 95%
99.0	96.4	97.3
(95/96)	(161/167)	(256/263)
94.3–99.8	92.4–98.3	94.6–98.7

An additional study was performed to evaluate the reproducibility of results using simulated Foi levado a cabo um estudo adicional para avaliar a reprodutibilidade de resultados com amostras em PreservCyt simuladas. A preparação de amostras com o kit QIAasymphony DSP HPV Media foi seguida de testes automatizados no RCS com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Os 8 membros do painel positivo foram preparados acrescentando células de SiHa ou HeLa com ADN

de HPV positivo às células C-33 A com ADN de HPV negativo em solução em PreservCyt, enquanto os 2 membros do painel com ADN de HPV negativo continham apenas células C-33 A com ADN de HPV negativo.

Três diferentes operadores realizaram os testes num único dia com três instrumentos QIAAsymphony SP diferentes e três lotes do kit QIAAsymphony DSP HPV Media diferentes com membros do painel 2N, 3E, 5P, 7P e 9P. Os membros do painel 2N, 3E, 5P e 7P foram testados com 18 réplicas em 3 corridas diferentes, produzindo 54 pontos de dados para cada membro do painel. Os membros do painel 9P foram testados com 16 réplicas em 3 corridas diferentes, produzindo 48 pontos de dados.

Um operador realizou o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test em três dias diferentes com três instrumentos QIAAsymphony SP diferentes e um lote do kit QIAAsymphony DSP HPV Media com membros do painel 1N, 4E, 6P, 8P e 10P. Os membros do painel 1N, 4E, 6P e 8P foram testados com 18 réplicas em 8 corridas diferentes, produzindo 144 pontos de dados para cada membro do painel. Os membros do painel 10P foram testados com 16 réplicas em 8 corridas diferentes, produzindo 128 pontos de dados.

Para os membros do painel com um URL/valor de corte médio 20% ou mais acima do VC, 572 de 572 (100,0%) foram positivos. Para os membros do painel com um URL/valor de corte médio 20% acima ou abaixo do valor de corte, 98 de 198 (49,5%) foram positivos e 100 de 198 (50,5%) foram negativos. Para os membros do painel com um URL/valor de corte médio 20% ou mais abaixo do valor de corte, 198 de 198 (100,0%) foram negativos (consultar a tabela 43 abaixo).

Tabela 43. Reprodutibilidade de amostras PreservCyt — preparação de amostras com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media; reprodutibilidade qualitativa

Membro do painel	Tipo de célula	URL/valor de corte médio	Desvio-padrão	Resultado positivo no teste (%) (n/N)
1N	C-33 A	0.37	0.05	0 (0/144)
2N	C-33 A	0.41	0.06	0 (0/54)
3E	HeLa e C-33 A	0.81	0.11	6 (3/54)
4E	SiHa e C-33 A	1.09	0.18	66 (95/144)
5P	HeLa e C-33 A	3.17	0.46	100 (54/54)
6P	SiHa e C-33 A	4.81	0.74	100 (144/144)
7P	HeLa e C-33 A	6.77	0.97	100 (54/54)
8P	SiHa e C-33 A	9.41	1.39	100 (144/144)
9P	HeLa e C-33 A	13.72	2.81	100 (48/48)
10P	SiHa e C-33 A	28.13	5.08	100 (128/128)

Os resultados indicam que as amostras a 20% ou mais afastados do VC poderá produzir resultados consistentes. As amostras próximas do VC produziram números aproximadamente iguais de resultados positivos e negativos. Estes dados demonstram que a preparação de amostras em PreservCyt com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media seguida de teste com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test produz resultados reprodutíveis.

Os resultados do estudo interno foram também utilizados para avaliar a reprodutibilidade quantitativa de resultados obtidos com a preparação de amostras em PreservCyt com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media (consultar as tabelas 44 e 45, abaixo).

Tabela 44. Reprodutibilidade de amostras PreservCyt — preparação de amostras com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media; reprodutibilidade quantitativa com o mesmo operador

Membro do painel	n	URL/valor de corte médio	Desvio-padrão				CV total estimado (%)
			Dentro das corridas	Entre corridas	Entre combinações*	Desvio-padrão total estimado	
1N	144	0.37	0.04	0.03	0.03	0.06	14.92
4E	144	1.09	0.12	0.11	0.09	0.19	17.24
6P	144	4.81	0.49	0.40	0.42	0.77	15.92
8P	144	9.41	0.96	0.97	0.46	1.44	15.32
10P	128	28.13	4.00	2.04	2.54	5.16	18.35

* Entre combinações de instrumentos QIAAsymphony SP e dias diferentes.

Tabela 45. Reprodutibilidade de amostras PreservCyt — preparação de amostras com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media; reprodutibilidade quantitativa no mesmo dia

Membro do painel	n	URL/valor de corte médio	Desvio-padrão			CV total estimado (%)
			Dentro das corridas	Entre corridas [†]	Desvio-padrão total estimado	
2N	54	0.41	0.04	0.05	0.06	15.86
3E	54	0.81	0.08	0.08	0.12	14.48
5P	54	3.17	0.38	0.33	0.50	15.72
7P	54	6.77	0.92	0.38	1.00	14.73
9P	48	13.72	2.64	1.15	2.88	21.01

[†]Uma corrida consiste numa combinação de um kit QIAAsymphony DSP HPV Media, um instrumento QIAAsymphony SP e um operador

A reprodutibilidade quantitativa é muito elevada, tal como indicado por todos os valores CV que permanecem abaixo de 25%. Os desvios-padrão entre corridas são comparáveis ao valor correspondente dentro de corridas, o que indica resultados consistentes independentemente do instrumento ou lote de kit usado.

Preparação de amostras com o kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA

Foi realizado um estudo interno de preparação de amostras com o kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA utilizando amostras clínicas em PreservCyt obtidas de mulheres com citologia de ASC-US ou NILM. Foram removidas duas amostras de cada amostra. Cada amostra foi preparada individualmente com o kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA e os resultados foram determinados por teste automatizado no RCS com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Tal como para outros testes qualitativos de diagnóstico in vitro (IVD), a variabilidade nos resultados do *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test obtida a partir de amostras clínicas está associada principalmente a um ou uma combinação dos seguintes aspetos: colheita da amostra, preparação da amostra e procedimento de teste. Dado que os resultados do teste comparados foram obtidos da mesma amostra clínica (indicado como “entre amostras”), a conceção experimental foi controlada quanto a variabilidade devido à colheita da amostra. A reprodutibilidade de resultados (consultar a tabela 46, abaixo) obtida de 2 amostras preparadas individualmente a partir da mesma amostra clínica, reflete a variação devida à preparação da amostra e ao procedimento de teste.

Tabela 46. Reprodutibilidade de amostras PreservCyt — preparação de amostras com o kit QIAasymphony DSP AXpH DNA; reprodutibilidade qualitativa entre amostras

Concordância positiva (%)	Concordância negativa (%)	Concordância geral (%)
(n/N)	(n/N)	(n/N)
IC 95%	IC 95%	IC 95%
95.3	96.7	96.2
(101/106)	(176/182)	(277/288)
89.4–98.0	92.3–98.5	93.3–97.9

Foi levado a cabo um estudo adicional para avaliar a reprodutibilidade de resultados com amostras em PreservCyt simuladas. A preparação de amostras com o kit QIAasymphony DSP AXpH DNA foi seguida de testes automatizados no RCS com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Três diferentes operadores realizaram o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test em diferentes dias utilizando diferentes instrumentos e diferentes lotes de reagente com um painel de 9 membros. Cada membro do painel foi testado em duplicado em 24 diferentes ensaios, produzindo 48 pontos de dados para cada membro do painel. Os 8 membros do painel positivo foram preparados acrescentando células de SiHa ou HeLa com ADN de HPV positivo às células H9 com ADN de HPV negativo em solução em PreservCyt, enquanto o membro do painel com ADN de HPV negativo continha apenas células H9 com ADN de HPV negativo.

Para os membros do painel com um URL/valor de corte médio 20% ou mais acima do VC, 237 de 240 (98,8%) foram positivos. Para os membros do painel com um URL/valor de corte médio 20% acima ou abaixo do valor de corte, 95 de 144 (66,0%) foram positivos e 49 de 144 (34,0%) foram negativos. Para os membros do painel com um URL/valor de corte médio 20% ou mais abaixo do valor de corte, 48 de 48 (100,0%) foram negativos (consultar a tabela 47, abaixo).

Tabela 47. Reprodutibilidade de amostras PreservCyt — preparação de amostras com o kit QIAasymphony DSP AXpH DNA; reprodutibilidade qualitativa

Membro do painel	Tipo de célula	URL/valor de corte médio	Desvio-padrão	Resultado positivo no teste (%) (n/N)
1N	H9	0.17	0.03	0 (0/48)
2E	H9 e HeLa	1.00	0.16	56 (27/48)
3E	H9 e HeLa	1.16	0.57	54 (26/48)
4E	H9 e SiHa	1.18	0.23	88 (42/48)
5P	H9 e SiHa	1.89	0.20	100 (48/48)
6P	H9 e HeLa	2.05	0.43	96 (46/48)
7P	H9 e SiHa	2.97	0.45	100 (48/48)
8P	H9 e HeLa	5.67	0.61	100 (48/48)
9P	H9 e SiHa	9.91	1.63	98 (47/48)

Os resultados indicam que as amostras a 20% ou mais afastados do VC poderá produzir resultados consistentes. As amostras próximas do VC produziram números aproximadamente iguais de resultados positivos e negativos. Estes dados demonstram que a preparação de amostras em PreservCyt com o kit QIAasymphony DSP AXpH DNA seguida de teste com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test produz resultados reprodutíveis.

Os resultados do estudo interno foram também utilizados para avaliar a reprodutibilidade quantitativa de resultados obtidos com a preparação de amostras em PreservCyt com o kit QIAasymphony DSP AXpH DNA (consultar a tabela 48, abaixo).

Tabela 48. Reprodutibilidade de amostras PreservCyt — preparação de amostras com o kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA; reprodutibilidade quantitativa

Membro do painel	n	URL/valor de corte médio	Desvio-padrão			Desvio-padrão total estimado	CV total estimado (%)
			Dentro das corridas	Entre corridas	Entre combinações*		
1N	48	0.17	0.02	0.02	0.01	0.03	18.13
2E	48	1.00	0.14	0.05	0.06	0.16	16.20
3E	48	1.16	0.48	0.22	0.23	0.57	49.27
4E	48	1.18	0.16	0.14	0.10	0.23	19.63
5P	48	1.89	0.09	0.09	0.16	0.20	10.63
6P	48	2.05	0.18	0.34	0.19	0.43	20.83
7P	48	2.97	0.27	0.23	0.28	0.45	15.14
8P	48	5.67	0.35	0.44	0.24	0.61	10.85
9P	48	9.91	1.36	0.55	0.71	1.63	16.42

*Entre combinações de kits *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test, QIAAsymphony DSP AXpH DNA, RCS usado, QIAAsymphony SP usado e operador.

Reprodutibilidade de amostras clínicas em SurePath

Testes manuais

A reprodutibilidade de testes manuais a amostras de pellet de células após gradiente em SurePath com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test foi determinada num estudo em que se utilizaram 3 laboratórios. Os membros do painel foram testados utilizando um VC de 1,0 URL/VC em dias diferentes e com ensaios diferentes utilizando um conjunto idêntico de membros do painel com estado de HPV positivo ou negativo conhecido. O painel era composto por 5 membros positivos, 2 membros alto negativos/baixo positivos e 5 membros negativos.

Cada membro do painel foi preparado combinando amostras clínicas únicas colhidas em SurePath Preservative Fluid com um estado de HPV negativo e positivo conhecido para obter os valores URL/valor de corte visados pretendidos. Cada membro do painel foi testado em duplicado, duas vezes por dia, durante um período de 5 dias em cada um dos 3 laboratórios participantes (consultar a tabela 49, abaixo).

Tabela 49. Reprodutibilidade de amostras de pellet de células após gradiente em SurePath — teste manual; reprodutibilidade qualitativa

Membro do painel	URL/valor de corte médio	Resultado positivo no teste (%) (n/N)
1	0.20	0.0 (0/60)
2	0.21	0.0 (0/60)
3	0.22	0.0 (0/60)
4	0.28	3.3 (2/60)
5	0.36	3.3 (2/60)
6	0.83	21.7 (13/60)
7	1.17	43.3 (26/60)
8	19.47	100.0 (60/60)
9	25.65	100.0 (60/60)
10	81.52	100.0 (60/60)
11	154.18	100.0 (60/60)
12	765.29	100.0 (60/60)

Testes automatizados no RCS

A reprodutibilidade dos resultados de amostras de pellet de células após gradiente em SurePath com teste automatizado no RCS foi comparada com os resultados obtidos com testes manuais. Foram testadas duas alíquotas da mesma amostra de pellet de células após gradiente em SurePath processada (da mesma amostra) (consultar a tabela 50 abaixo).

Tabela 50. Reprodutibilidade de amostras de pellet de células após gradiente em SurePath — teste automatizado no RCS; concordância de resultados entre o teste automatizado no RCS e o teste manual

Concordância positiva (%) (n/N) IC 95%		Concordância negativa (%) (n/N) IC 95%	
Todas positivas	Região fortemente positiva (URL/valor de corte $\geq 2,5$)	Todas negativas	Região fortemente negativa (URL/valor de corte $< 0,80$)
99.0 (417/421) 97.6–99.7	100.0 (375/375) 99.0–100.0	97.7 (1057/1079) 96.9–98.75	98.7 (1050/1064) 97.8–99.28

Preparação de amostras em SurePath com o kit QIAasymphony DSP HPV Media

Foi levado a cabo um estudo para avaliar a reprodutibilidade de resultados com amostras em SurePath simuladas. A preparação de amostras com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media foi seguida de testes automatizados no RCS com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Os 4 membros do painel positivo foram preparados acrescentando células de SiHa com ADN de HPV positivo às células H-9 com ADN de HPV negativo em SurePath Preservative Fluid, enquanto o membro do painel com ADN de HPV negativo continha apenas células H-9 com ADN de HPV negativo em SurePath Preservative Fluid.

Três diferentes operadores realizaram os testes em seis dias diferentes com três instrumentos QIAAsymphony SP diferentes e 3 lotes do kit QIAAsymphony DSP HPV Media diferentes com membros do painel 1N, 2E, 3P, 4P e 5P. Foram testados membros do painel 1N, 2E, 3P e 4P com 18 réplicas em 37 corridas diferentes, produzindo 666 pontos de dados para membros do painel 2E e 3P e 665 pontos de dados para membros do painel 1N e 4P. Os membros do painel 5P foram testados com 16 réplicas em 37 corridas diferentes, produzindo 590 pontos de dados. Foram excluídos quatro pontos de dados devido ao volume insuficiente, como assinalado pelo QIAAsymphony SP durante a preparação das amostras.

Para os membros do painel com um URL/valor de corte médio 20% ou mais acima do VC, 1921 de 1921 (100,0%) foram positivos. Para os membros do painel com um URL/valor de corte médio 20% acima ou abaixo do valor de corte, 410 de 666 (61,6%) foram positivos e 256 de 666 (38,4%) foram negativos. Para os membros do painel com um URL/valor de corte médio 20% ou mais abaixo do valor de corte, 664 de 665 (99,8%) foram negativos (consultar a tabela 51, abaixo).

Tabela 51. Reprodutibilidade de amostras SurePath — preparação de amostras com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media; reprodutibilidade qualitativa

Membro do painel	Tipo de célula	URL/valor de corte médio	Desvio-padrão	Resultado positivo no teste (%) (n/N)
1N	H-9	0.38	0.06	0.2 (1/665)
2E	SiHa e H-9	1.06	0.17	61.6 (410/666)
3P	SiHa e H-9	4.51	0.78	100.0 (666/666)
4P	SiHa e H-9	8.34	1.57	100.0 (665/665)
5P	SiHa e H-9	24.69	5.12	100.0 (590/590)

Os resultados indicam que as amostras em SurePath a 20% ou mais afastadas do VC poderão produzir resultados consistentes. As amostras em SurePath próximas do VC produziram números aproximadamente iguais de resultados positivos e negativos. Estes dados demonstram que a

preparação de amostras em SurePath com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media seguida de teste com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test produz resultados reprodutíveis.

Os resultados do estudo interno foram também utilizados para avaliar a reprodutibilidade quantitativa de resultados obtidos com a preparação de amostras em SurePath com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media (consultar a tabela 51, abaixo).

Três diferentes operadores realizaram os testes em seis dias diferentes com três instrumentos QIAAsymphony SP diferentes e 3 lotes do kit QIAAsymphony DSP HPV Media diferentes com membros do painel 1N, 2E, 3P, 4P e 5P. Os membros do painel 1N, 2E, 3P e 4P foram testados com 18 réplicas, produzindo 162 pontos de dados para cada membro do painel. O membro do painel 5P foi testado com 16 réplicas, produzindo 144 pontos de dados (ver tabela 52, abaixo).

Tabela 52. Reprodutibilidade de amostras SurePath — preparação de amostras com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media; reprodutibilidade quantitativa

Membro do painel	n	URL/valor de corte médio	Desvio-padrão				CV total estimado (%)
			Dentro das corridas	Entres dias	Entre combinações*	Desvio-padrão total estimado	
1N	162	0.37	0.06	0.02	0.03	0.07	19.18
2E	162	1.05	0.14	0.07	0.10	0.18	17.41
3P	162	4.40	0.62	0.00	0.43	0.75	17.09
4P	162	8.24	1.15	1.01	1.34	1.77	21.42
5P	144	23.89	3.95	4.10	4.67	6.11	25.59

* A run consists of a combination of a QIAAsymphony DSP HPV Media Kit, a QIAAsymphony SP instrument and an operator on a particular day.

A reprodutibilidade quantitativa é muito elevada, tal como indicado por todos os valores CV que permanecem abaixo de 26%. Os desvios-padrão entre corridas são comparáveis ao valor correspondente dentro de corridas, o que indica resultados consistentes independentemente do instrumento ou lote de kit usado.

Preparação de amostras de células após gradiente em SurePath com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media

Foi levado a cabo um estudo para avaliar a reprodutibilidade de resultados com amostras de pellet de células após gradiente em SurePath simuladas. A preparação de amostras com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media foi seguida de testes automatizados no RCS com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Foi usado material de cultura de células em 70% de SurePath

Preservative Fluid para simular as amostras de pellet de células após gradiente em SurePath. Os 4 membros positivos do painel foram preparados acrescentando células de SiHa com ADN de HPV positivo às células H-9 com ADN de HPV negativo em SurePath Preservative Fluid, enquanto o membro do painel com ADN de HPV negativo continha apenas células H-9 com ADN de HPV negativo em SurePath Preservative Fluid.

Quatro operadores realizaram os testes em seis dias diferentes com três instrumentos QIAAsymphony SP diferentes e três lotes do kit QIAAsymphony DSP HPV Media igualmente diferentes com os membros 1, 2, 3, 4 e 5 do painel. Foram testados os membros 1, 2, 3 e 4 do painel com 18 réplicas em 37 corridas diferentes, produzindo 666 pontos de dados para os membros 1 e 3 do painel, e 665 pontos de dados para membros 2 e 4 do painel. Foram excluídos dois pontos de dados devido ao volume insuficiente, tal como assinalado pelo QIAAsymphony SP durante a preparação das amostras. O membro 5 do painel foi testado com 16 réplicas em 37 corridas diferentes, produzindo 592 pontos de dados.

Para os membros do painel com um URL/VC médio 20% ou mais acima do VC, 1923 de 1923 (100,0%) foram positivos. Para os membros do painel com um URL/VC médio 20% acima ou abaixo do VC, 416 de 665 (62,6%) foram positivos e 249 de 665 (37,4%) foram negativos. Para os membros do painel com um URL/VC médio 20% ou mais abaixo do VC, 666 de 666 (100%) foram negativos (consultar a tabela 53 abaixo).

Tabela 53. Reprodutibilidade de amostras de pellet de células após gradiente em SurePath — preparação de amostras com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media; reprodutibilidade qualitativa

Membro do painel	Tipo de célula	URL/VC médio	Desvio-padrão	CV (%)	Resultado positivo no teste (%) (n/N)
1	H-9	0.12	0.02	18.77	0.0 (0/666)
2	SiHa and H-9	0.96	0.11	11.15	62.6 (416/665)
3	SiHa and H-9	4.72	0.56	11.89	100.0 (666/666)
4	SiHa and H-9	9.34	0.98	10.46	100.0 (665/665)
5	SiHa and H-9	24.9	3.37	13.55	100.0 (592/592)

Os resultados indicam que as amostras de pellet de células após gradiente em SurePath a 20% ou mais afastadas do VC poderão produzir resultados consistentes. As amostras de pellet de células após gradiente em SurePath próximas do VC produziram números aproximadamente iguais de resultados positivos e negativos. Estes dados demonstram que a preparação de amostras de pellet de células após gradiente em SurePath com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media seguida de teste com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test produz resultados reprodutíveis.

Os resultados do estudo interno foram também utilizados para avaliar a reprodutibilidade quantitativa de resultados obtidos com a preparação de amostras de pellet de células após gradiente em SurePath com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media.

Quatro operadores realizaram os testes em seis dias diferentes com três instrumentos QIAAsymphony SP diferentes e três lotes do kit QIAAsymphony DSP HPV Media igualmente diferentes com os membros 1, 2, 3, 4 e 5 do painel. Os membros 1, 2, 3 e 4 do painel foram testados com 18 réplicas, produzindo 162 pontos de dados para cada membro do painel. O membro 5 do painel foi testado com 16 réplicas, produzindo 144 pontos de dados (ver tabela 54 abaixo).

Tabela 54. Reprodutibilidade de amostras de pellet de células após gradiente em SurePath — preparação de amostras com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media; reprodutibilidade quantitativa

Membro do painel	n	URL/VC médio	Desvio-padrão			Desvio-padrão total estimado	CV total estimado (%)
			Dentro das corridas	Entres dias	Entre combinações*		
1	162	0.12	0.02	0.00	0.01	0.02	19.80
2	162	1.00	0.08	0.02	0.06	0.10	10.27
3	162	4.99	0.37	0.13	0.38	0.55	11.00
4	162	9.78	0.61	0.23	0.54	0.85	8.72
5	144	26.40	2.19	0.70	1.51	2.75	10.41

* Between combinations of different days, operators, QIAAsymphony DSP HPV Media Kit lots and QIAAsymphony SP instruments.

A reprodutibilidade quantitativa é muito elevada, tal como indicado por todos os valores CV, que permanecem abaixo de 20%. Os desvios-padrão entre corridas são comparáveis ao valor correspondente dentro de corridas, o que indica resultados consistentes independentemente do instrumento ou lote de kit usado.

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 o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Todos os micro-organismos foram analisados a concentrações de 1×10^5 e 1×10^7 organismos por ml. Foram analisados ADN purificados de vírus e plasmídeos a uma concentração de 4 ng/ml.

As seguintes bactérias foram testadas e todas apresentaram resultados negativos no *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test:

- *Acinetobacter anitratus*
- *Acinetobacter lwoffii* (ATCC 17908)
- *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285)
- *Bacteroides melaninogenicus*
- *Candida albicans* (ATCC 14053 ou 10231)
- *Chlamydia trachomatis*
- *Enterobacter cloacae*
- *Escherichia coli* (HB101) *
- *Escherichia coli*
- *Fusobacterium nucleatum*
- *Gardnerella vaginalis*
- *Haemophilus ducreyi*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Lactobacillus acidophilus*
- *Mobiluncus curtisii*
- *Mobiluncus mulieris*
- *Mycoplasma hominis*
- *Mycoplasma hyorhinis*
- *Neisseria gonorrhoeae* (ATCC 19424)
- *Neisseria lactamica* (NRL 2118)
- *Neisseria meningitidis* (ATCC 13077)
- *Neisseria sicca* (ATCC 29256)
- *Peptostreptococcus anaerobius*
- *Proteus vulgaris* (ATCC 21117, 8427, 33420)
- *Serratia marcescens*
- *Staphylococcus aureus* (estirpe Cowan)
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Streptococcus faecalis* (ATCC 14508)
- *Streptococcus pyogenes* (ATCC 27762)

* Foram testados tanto a estirpe *E. coli* utilizada para cultivar plasmídeos (HB101) como um isolado clínico de *E. coli*.

- *Treponema pallidum*
- *Trichomonas vaginalis*
- *Ureaplasma urealyticum*

O seguinte ADN viral ou plasmídeo ou soro humano foram testados e todos apresentaram resultados negativos no *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test:

- Adenovirus 2
- Citomegalovirus
- Vírus Epstein-Barr
- Soro positivo para o antígeno de superfície da hepatite B
- Herpes simples tipo I
- Herpes simples tipo II
- Vírus da imunodeficiência humana (VIA, RT ADN)
- HPV tipos 1, 2, 3, 4, 5, 8, 13 e 30
- Vírus símio tipo 40 (SV40)

O único plasmídeo que apresentou reatividade cruzada no *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test foi o pBR322. A reatividade cruzada entre o pBR322 e a mistura para sonda 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 no *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test 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 *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test devido a sequências homólogas de pBR322 em amostras clínicas parece ser baixa.

Hibridização cruzada

Dezoito tipos de HPV diferentes (alto e baixo risco) foram testados com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test em concentrações de 4 ng/ml de ADN do HPV. Todos os alvos HPV de alto risco foram positivos. Este estudo também demonstrou que existe uma pequena quantidade de hibridização cruzada entre os tipos de HPV 6 e 42 e o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. As amostras com níveis elevados (4 ng/ml ou superior) de ADN do HPV dos tipos 6 ou 42 podem apresentar resultados falso-positivos no *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. A importância

clínica deste facto é que as doentes com uma concentração de 4 ng/ml ou superior de ADN do HPV dos tipos 6 ou 42 podem ser, desnecessariamente, encaminhadas para colposcopia.

O *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test apresentou igualmente reatividade cruzada com os tipos de HPV 40, 53 e 66. Estes tipos são raros e não existem provas suficientes para estabelecer uma correlação rigorosa entre a infeção por estes tipos e o desenvolvimento de doença de alto grau (15). Tem sido igualmente registado na literatura que sondas complexas semelhantes às utilizadas neste teste podem provocar resultados falso-positivos devido a hibridização cruzada com tipos de HPV 11, 53, 54, 55, 66, MM4, MM7, MM8 ou MM9 (35). 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 *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. 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) em 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, um resultado falso-negativo pode ser verificado em amostras clínicas com níveis de ADN do HPV próximos do valor de corte positivo para o ensaio (1 pg/ml) se existirem elevadas concentrações de creme antifúngico ou de gel contraceptivo. No entanto, é muito improvável que uma amostra clínica seja constituída quase exclusivamente por uma destas 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 PreservCyt

Preparação manual de amostras

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 *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. 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 nalgumas amostras clínicas não inibem a detecção do ADN do HPV através do *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Preparação de amostras com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media

Os efeitos do sangue e de outras substâncias potencialmente interferentes em amostras em PreservCyt foram avaliados com o kit QIAAsymphony DSP HPV Media para a preparação de amostras e testes automatizados no RCS com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Os efeitos das seguintes substâncias interferentes foram testados:

- Creme antifúngico
- Creme anti-inflamatório
- Sangue
- Gel contraceptivo
- Água do duche
- Supositórios desodorizantes femininos
- Gel lubrificante
- Espermicida

Cada uma das substâncias foi adicionada a conjuntos clínicos negativos e positivos. Não foram observados resultados falso-positivos ou falso-negativos com nenhuma das substâncias em uma concentração que possa ser encontrada em amostras cervicais. No entanto, um resultado falso-negativo pode ser verificado em amostras clínicas com níveis de ADN do HPV próximos do valor de corte para o ensaio se existirem elevadas concentrações de creme antifúngico, de gel lubrificante vaginal ou de sangue. No entanto, é muito improvável que uma amostra clínica seja constituída quase exclusivamente por uma destas substâncias, uma vez que o colo do útero é normalmente limpo antes da recolha de amostras citológicas para testes de HPV.

Preparação de amostras com o kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA

O efeito do sangue total em amostras em PreservCyt foi avaliado com o kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA para preparação de amostras e com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test para os testes. As amostras clínicas com sangue visível foram selecionadas e testadas utilizando os métodos de preparação de amostras manual e automatizado com o kit QIAAsymphony DSP AXpH DNA. Os resultados foram comparados para as 238 amostras tendo produzido uma concordância total de 94,12% e um valor p de McNemar de 0,2850, indicando que não existe

uma diferença significativa no desempenho clínico entre os métodos de preparação de amostras manual e automatizado com o kit QIASymphony DSP AXpH DNA.

Os efeitos das seguintes substâncias interferentes foram testados:

- Água do duche
- Creme antifúngico
- Gel contraceutivo
- Células mononucleares de sangue periférico (CMSP)
- Gel lubrificante
- Aerossóis para a higiene feminina
- Espermicida
- Partículas magnéticas
- Líquido TopElute

Cada substância foi adicionada a conjuntos celulares negativos e positivos em concentrações que podem ser encontradas em amostras cervicais ou que podem ser acrescentadas durante a preparação das amostras. Não foi observado qualquer resultado falso-positivo com nenhuma das substâncias em nenhuma concentração. Não foram observados quaisquer resultados falso-negativos à exceção do gel contraceutivo. Não colher uma amostra cervical em PreservCyt para preparação de amostras automatizada com o kit QIASymphony DSP AXpH DNA se estiver presente gel contraceutivo.

Efeito do sangue e outras substâncias nas amostras em SurePath

Preparação de amostras em SurePath com o kit QIASymphony DSP HPV Media

Os efeitos do sangue e de outras substâncias potencialmente interferentes em amostras em SurePath foram avaliados com o kit QIASymphony DSP HPV Media para a preparação de amostras e testes automatizados no RCS com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Os efeitos das seguintes substâncias interferentes foram testados:

- Creme antifúngico
- Creme anti-inflamatório
- Sangue
- Gel contraceutivo

- Água do duche
- Supositórios desodorizantes femininos
- Gel lubrificante
- Espermicida

Cada uma das substâncias foi adicionada a conjuntos clínicos negativos e positivos. Não foram observados resultados falso-positivos com nenhuma das substâncias em uma concentração que possa ser encontrada em amostras cervicais.

Não foram observados quaisquer resultados falso-negativos à exceção das seguintes substâncias:

- o gel contraceptivo causou resultados falso-negativos numa concentração muito baixa.
- Se houver uma elevada concentração de creme antifúngico na amostra, pode ser verificado um resultado falso-negativo em amostras clínicas com níveis de ADN de HPV perto do corte para o ensaio. No entanto, é muito improvável que uma amostra clínica seja constituída quase exclusivamente por creme antifúngico, uma vez que o colo do útero é normalmente limpo antes da recolha de amostras citológicas para esfregaço de Papanicolau e testes de HPV.
- Não colher uma amostra cervical em SurePath para preparação de amostras automatizada com o kit QIAasymphony DSP HPV Media se estiver presente creme antifúngico ou gel contraceptivo.
- Preparação de amostras de pellet de células após gradiente em SurePath com o kit QIAasymphony DSP HPV Media
- Os efeitos do sangue e de outras substâncias potencialmente interferentes em amostras de pellets de células após gradiente em SurePath foram avaliados com o kit QIAasymphony DSP HPV Media para a preparação de amostras e testes automatizados no RCS com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.
- Os efeitos das seguintes substâncias interferentes foram testados:
 - Creme antifúngico
 - Creme anti-inflamatório
 - Sangue
 - Gel contraceptivo
 - Água do duche
 - Supositórios desodorizantes femininos
 - Gel lubrificante
 - Espermicida

Cada substância foi adicionada a conjuntos clínicos negativos e positivos, que foram depois processados através do BD PrepMate System para simular a amostra de pellet de células após gradiente em SurePath. Foi observado um único resultado falso-positivo tanto para sangue como para creme antifúngico; contudo, a análise estatística não mostrou nenhuma interferência significativa. Não foram observados resultados falso-positivos com nenhuma das outras substâncias numa concentração que possa ser encontrada em amostras cervicais.

Foram observados resultados falso-negativos para creme antifúngico, creme anti-inflamatório e gel contraceptivo. Não colher uma amostra cervical em SurePath para preparação de amostras automatizada com o kit QIAasympphony DSP HPV Media se estiver presente creme antifúngico, creme anti-inflamatório ou gel contraceptivo.

Carry-over (contaminação cruzada)

O RCS foi concebido para minimizar a contaminação das amostras ou carry-over de fosfatase alcalina residual através da utilização de pontas de pipeta descartáveis para a aspiração dos reagentes e das amostras. Para confirmar esta característica de conceção, a QIAGEN realizou vários estudos para avaliar se a utilização do RCS aumentava o potencial de carry-over ou contaminação cruzada de amostras em comparação com o método manual. Vários instrumentos RCS foram utilizados para avaliar a possibilidade de carry-over de sistema para sistema.

Num estudo, 2 ng e 20 ng de ADN plasmídeo de HPV foi adicionado a material de controlo negativo para preparar amostras em STM alto positivo. A concentração de 20 ng/ml produz valores URL aproximadamente 3–5 vezes superiores aos da amostra clínica com valor positivo mais elevado que se espera observar durante testes clínicos de rotina. Estas amostras alto positivas simuladas foram colocadas por toda a microplaca num padrão de xadrez, alternando com poços que continham apenas controlo negativo (poços de teste). Esta conceção considera possíveis efeitos aditivos de amostras alto positivas sequenciais. As microplacas foram então testadas utilizando os métodos de teste manual e automatizado no RCS. Após o processamento, os números de poços de teste falso-positivos foram comparados. O teste automatizado no RCS não produziu mais poços de teste falso-positivos do que o teste manual com estas amostras STM simuladas, mesmo quando era colocada uma sequência extremamente alta de amostras positivas na microplaca.

Numa segunda avaliação de carry-over, as amostras em PreservCyt de doentes HPV positivas foram combinadas para criar um painel de amostras com níveis divergentes de quimioluminescência para produzir quocientes URL/valor de corte representativos da amplitude esperada durante testes clínicos automatizados no RCS de rotina. As amostras positivas variavam entre aproximadamente 200–1800 URL/VC. Para avaliar o potencial de carry-over (contaminação cruzada), incluindo os efeitos potencialmente aditivos de amostras alto positivas

sequenciais, estes membros do painel positivo foram colocados em microplacas num padrão de xadrez junto aos poços de controlo negativos. Estas placas foram então testadas utilizando o método de teste automatizado no RCS.

Os resultados desta avaliação de carry-over, utilizando amostras de doentes em conjunto, sugere uma possível taxa de falso-positivos de 0,3% devido aos efeitos de carry-over durante a realização de testes automatizados no RCS com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

A experiência da QIAGEN na realização de testes com amostras em PreservCyt em conjunto sugere que o conjunto de amostras em PreservCyt de doentes cria amostras que não apresentam características semelhantes a amostras de uma única doente. Embora os efeitos deste conjunto no potencial de carry-over de testes automatizados no RCS não sejam conhecidos, testes pré-clínicos adicionais de testes automatizados no RCS indicam um potencial não aumentado para resultados falso-positivos devido a carry-over. Estas avaliações foram levadas a cabo utilizando amostras de plasmídeos artificiais com concentrações de ADN aproximadamente 5 vezes superiores das observadas no ambiente clínico.

Uma terceira avaliação de carry-over (contaminação cruzada) criou amostras de teste adicionando um corante fluorescente em concentrações representativas da gama dinâmica de URL do ensaio para matrizes de fundo que aproximavam a viscosidade das amostras clínicas e os reagentes do *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test. Estas amostras de teste foram então processadas utilizando 3 instrumentos RCS separados e o potencial de carry-over de cada dos seguintes passos chave do procedimento do RCS foi avaliado:

- Transferência de amostras
- Lavagem da microplaca
- Transferência placa a placa
- Adição à sonda
- Agitação da microplaca

A fluorescência resultante foi medida a um comprimento de onda de excitação de 485 nm e um comprimento de onda de emissão de 535 nm e era suficientemente sensível para detetar um evento carry-over na ordem dos 1:20 000, que corresponderia a um resultado falso-positivo com o *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test (ou seja, 1 pg em 20 ng). Os resultados desta avaliação demonstraram não existir evento de carry-over durante qualquer um dos passos chave do procedimento do RCS que levassem a um resultado falso-positivo no *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Estabilidade do reagente no sistema

A QIAGEN avaliou as características de desempenho de testes automatizados no RCS durante a utilização de reagentes que permaneciam na plataforma do sistema por períodos prolongados. Os reagentes com maior probabilidade de serem sujeitos a colocação prolongada no sistema incluem a mistura para sonda, DR1, DR2 e microplaca de captura.

O desempenho do teste foi avaliado utilizando reagentes acabados de preparar e reagentes que ficaram a envelhecer no instrumento RCS à temperatura ambiente durante um período de 16 horas (para simular 2 turnos de trabalho em ambiente laboratorial). O teste a amostras clínicas simuladas foi levado a cabo utilizando 2 instrumentos RCS em cada um dos 2 dias de teste com uma matriz de reagentes definida (consultar a tabela 55, abaixo).

Tabela 55. Conceção do estudo para estabilidade do reagente no sistema

Instrumento RCS	Dia 1	Dia 2
1	Reagentes envelhecidos	Reagentes acabados de preparar
2	Reagentes acabados de preparar	Reagentes envelhecidos

Na figura 3 abaixo é apresentado um gráfico de todos os pontos de dados URL/valor de corte. O gráfico e a análise de regressão para reagentes envelhecidos contra reagentes acabados de preparar indicam uma concordância entre ambos.

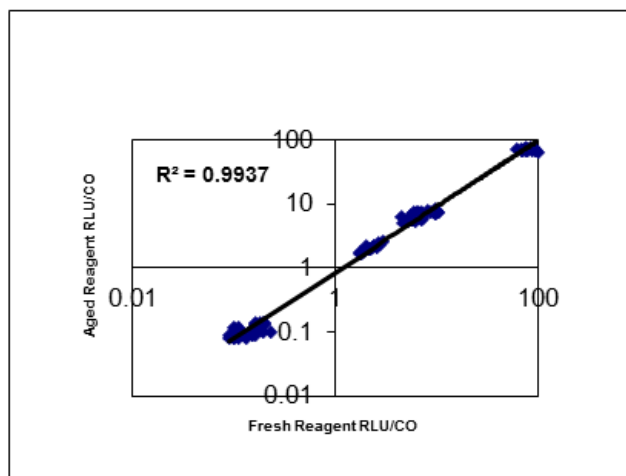


Figura 3. Gráfico de dispersão de comparação dos valores do calibrador de ensaio e de controlo utilizando reagentes envelhecidos e acabados de preparar.

Um exame mais extensivo dos resultados de concordância mostra que não ocorreram alterações nos resultados qualitativos quando se utilizam reagentes envelhecidos (consultar a tabela 56, abaixo)

Tabela 56. Concordância entre reagentes acabados de preparar e envelhecidos

Medida estatística	Resultado
Concordância geral (%)	100.0%
(n/N)	(96/96)
IC 95%	97.97–100.0
Concordância positiva (%)	100.0%
(n/N)	(64/64)
IC 95%	97.97–100.0
Concordância negativa (%)	100.0%
(n/N)	(32/32)
IC 95%	97.97–100.0
R ²	0.9937
Declive	0.97
Intersecção	0.47
Kappa	1.0

A análise de dados demonstra que os resultados são estatisticamente idênticos para reagentes acabados de preparar e envelhecidos, indicando que os reagentes são suficientemente estáveis quando colocados no instrumento durante um período de até 16 horas.

Referências

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

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










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

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

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

Símbolos

Os símbolos na tabela seguinte são utilizados nestas instruções de utilização:

Símbolo	Definição do símbolo
	Contém suficiente para 96 testes
	Contém o suficiente para 384 testes
	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	Número de catálogo
	Fabricante
	Representante autorizado na Comunidade Europeia
	Prazo de validade
	Consultar as instruções de utilização
	Número GTIN

Guia para a resolução de problemas

Comentários e sugestões

Alteração de cor incorreta ou não observada durante a desnaturação

- | | |
|---|--|
| a) DNR incorretamente preparado | Verificar se o DNR contém o corante indicador e apresenta uma cor púrpura escura. |
| b) DNR não adicionado | Verificar se o DNR foi adicionado à amostra, medindo o volume da amostra (em princípio, 1,5 ml). Se o volume indicar que o DNR não foi adicionado, proceder à adição correta, misturar e avançar com o ensaio se a alteração de cor adequada for observada. |
| c) A amostra contém sangue ou outros materiais que dissimulam alterações de cor | Não é de esperar que ocorra exatamente a alteração de cor descrita com estes tipos de amostras; os resultados do teste não deverão ser negativamente afetados. |
| d) O pH da amostra pode ser invulgarmente ácido | 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. |

Os controlos de qualidade dão resultados incorretos.

- | | |
|---|--|
| a) Protocolo de ensaio incorreto escolhido para o teste | Se o protocolo de ensaio for incorreto para o teste a realizar, ler novamente a microplaca, no prazo de 30 minutos após a adição de DR2, usando o protocolo correto. |
| b) Colocação inversa de QC1-LR e QC2-HR | Voltar a testar as amostras. |
| c) Colocação inversa de HRC e QC2-HR | Voltar a testar as amostras. |

Comentários e sugestões

Alteração de cor incorreta observada durante a hibridização.

- | | |
|--|--|
| a) Mistura inadequada de mistura para sonda com calibradores, controlo de qualidade e/ou amostras desnaturados; ou mistura para sonda não adicionada; ou volume incorreto de reagente adicionado | Agitar a microplaca de hibridização ou o suporte que contém os microtubos durante mais 2 minutos. Se existirem tubos ou poços que ainda permaneçam púrpura, adicionar mais 25 µl da mistura para sonda correta e misturar bem. Se depois da adição de mistura para sonda e nova mistura, não ocorrer a alteração de cor prevista e a amostra não contiver sangue ou outros materiais, voltar a testar a amostra. |
| b) A amostra contém sangue ou outros materiais que dissimulam alterações de cor | Não é de esperar que ocorra exatamente a alteração de cor descrita com estes tipos de amostras; os resultados do teste não deverão ser negativamente afetados. |
| c) A amostra tinha <1000 µl de STM | Verificar o volume da amostra original. O volume deverá ser 1425 µl ± 20 µl (após a remoção de uma alíquota de 75 µl para teste). Se o volume for <1425 µl, a amostra original continha <1000 µl de STM. Obter uma nova amostra. |

O teste falha na validação. Nenhum sinal observado nos calibradores positivos, controlos de qualidade ou nas amostras.

- | | |
|---|---|
| a) Nenhuma sonda adicionada ao diluente de sonda | Preparar mistura para sonda conforme descrito nestas instruções de utilização. Rotular cuidadosamente os tubos. |
| b) Sonda contaminada com RNase durante a preparação | Utilizar pontas de pipeta com proteção contra aerossóis para pipetar a amostra e usar luvas. Preparar a mistura para sonda num recipiente estéril. Utilizar apenas reservatórios de reagente descartáveis novos e limpos. |
| c) Mistura inadequada da mistura para sonda | Depois de adicionar sonda ao diluente de sonda, misturar muito minuciosamente por agitação em vórtex a alta velocidade durante, pelo menos, 5 segundos. Deverá ser produzido um vórtice visível. |
| d) Mistura inadequada de mistura para sonda e | Depois de adicionar mistura para sonda e amostra a cada poço da microplaca de hibridização ou microtubo de hibridização, agitar no conjunto Rotary Shaker I a |

Comentários e sugestões

amostra desnaturada	1100 ± 100 rpm durante 3 ± 2 minutos. Verificar a alteração de cor de púrpura para amarelo em todos os poços da microplaca ou microtubo.
e) Tempo ou temperatura incorretos durante a fase de hibridização	Hibridizar durante 60 ± 5 minutos a 65 ± 2 °C. Verificar a temperatura do Microplate Heater I ou do banho-maria. Certificar-se de que o Microplate Heater I ou banho-maria está configurado para aquecer as amostras à temperatura correta e foi preaquecido durante 60 minutos antes da utilização. Certificar-se de que o nível de água é adequado para aquecer amostras à temperatura correta. Os banhos-maria deverão ser periodicamente calibrados.
f) Mistura inadequada durante a fase de captura	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. (Consultar o manual do utilizador do Rotary Shaker I (Rotary Shaker I User Manual)).
g) Falha ao adicionar a quantidade correta de DR 1 ou ao incubar durante o tempo especificado	Pipetar 75 µl de DR 1 para cada poço da microplaca utilizando um pipetador de 8 canais. Incubar a 20–25 °C durante 30–45 minutos.
h) Falha ao adicionar a quantidade correta de DR2 ou ao incubar durante o tempo especificado	Pipetar 75 µl de DR2 para cada poço da microplaca utilizando um pipetador de 8 canais. Incubar a 20–25 °C durante 15–30 minutos.
i) Avaria do instrumento DML ou programação incorreta	Consultar o manual do utilizador do instrumento DML aplicável assim como o manual do utilizador do software para obter mais instruções ou contactar a Assistência Técnica da QIAGEN.

Valores de URL elevados em calibradores, controlos de qualidade e/ou amostras (≥200 URL em muitos ou em todos os poços da microplaca). O teste poderá falhar na validação do ensaio.

a) DNR não adicionado; ou volume de reagente incorreto adicionado; ou, mistura inadequada de	Certificar-se de que a pipeta repetida está a distribuir de modo preciso antes de adicionar DNR. É essencial ter pipetas calibradas. Adicionar metade do volume de DNR a cada tubo e misturar bem. Para evitar resultados falso-
--	--

Comentários e sugestões

DNR com amostras, calibradores ou controlos de qualidade	positivos, certificar-se de que o líquido lava toda a superfície interna do tubo. Os calibradores, controlos de qualidade e amostras deverão mudar de cor para púrpura após a adição de DNR.
b) Fuga ligeira no instrumento DML; porta não selada; selo à volta da porta quebrado	Verificar a leitura de fundo (medição de dados brutos) do instrumento DML através da leitura de uma microplaca vazia. Uma leitura superior a 50 URL indica que existe uma ligeira fuga. Consultar o manual do utilizador aplicável do instrumento DML para obter instruções ou contactar a Assistência Técnica da QIAGEN.
c) Contaminação do DR2 ou dos poços da microplaca de captura com DR1 ou fosfatase alcalina exógena	Consultar “Verificação de contaminação do DR2”, pág. 139.
d) Tampão de lavagem contaminado	Consultar “Verificação da contaminação do aparelho de lavagem e/ou origem da água”, pág. 139.
e) Automated Plate Washer contaminado	Consultar “Verificação da contaminação do aparelho de lavagem e/ou origem da água”, pág. 139.
f) Lavagem inadequada dos poços da microplaca de captura após incubação de DR 1	Lavar minuciosamente os poços da microplaca de captura com tampão de lavagem 6 vezes, enchendo os poços até transbordar ou utilizando o Automated Plate Washer. Não deverá ficar visível qualquer resíduo de líquido cor-de-rosa nos poços da microplaca após a lavagem. Consultar o manual do utilizador do Automated Plate Washer (Automated Plate Washer User Manual) para obter instruções sobre como testar quanto à presença de contaminação ou avaria.
g) Contaminação dos poços da microplaca com DR1	Certificar-se de que todas as superfícies de trabalho estão limpas e secas. Ter cuidado durante a utilização de DR1. Evitar aerossóis.
h) Utilização da mesma área dos lenços Kimtowels ou toalhetes de papel com libertação reduzida de pelo equivalentes para	Não voltar a secar com lenços Kimtowels ou toalhetes de papel com libertação reduzida de pelo equivalentes anteriormente usados.

Comentários e sugestões

secar a solução de
hibridização

- i) Utilização de toalhetes de
secagem incorretos
- Utilizar lenços Kimtowels ou toalhetes de papel com liberação reduzida de pelo equivalentes para a secagem.

Razões de PC/NC baixas ou elevado número de amostras baixo positivas com razões <2,0 (>20%). O teste poderá falhar na validação do ensaio.

- a) Preparação inadequada
da amostra
- Adicionar o volume correto de DNR e misturar cuidadosamente por agitação em vórtex. Para evitar resultados falso-positivos, certificar-se de que o líquido lava toda a superfície interna do tubo.
- Para amostras em PreservCyt, certificar-se de que é concluída a mistura e ressuspensão adequadas do pellet de células antes da incubação para desnaturação.
- Deverá ser observada uma alteração de cor distinta de púrpura claro para escuro. Incubar durante 45 ± 5 minutos a 65 ± 2 °C.
- b) Mistura para sonda
inadequadamente
misturada ou mistura para
sonda adicionada em
quantidade insuficiente
- Preparar a mistura para sonda conforme descrito. Misturar minuciosamente por agitação em vórtex, garantido que é produzido um vórtice visível. É necessário adicionar mistura para sonda aos tubos com uma pipeta de deslocamento positivo para garantir uma distribuição adequada.
- c) Volume inadequado de
mistura para sonda
adicionado a cada
microtubo de hibridização
ou poço da microplaca
- Certificar-se de que o pipetador de 8 canais está a distribuir de modo preciso antes de adicionar mistura para sonda. Adicionar 25 µl de mistura para sonda a cada microtubo ou poço da microplaca que contém calibradores desnaturados, controlos de qualidade e amostras. A alteração de cor deverá ser de púrpura escuro para amarelo após a adição e mistura minuciosa. As amostras em PreservCyt deverão mudar de cor para cor-de-rosa em vez de amarelo.
- d) Perda de atividade do DR1
- Guardar DR1 a 2–8 °C. Usar antes da data de expiração.
- e) Captura insuficiente
- O procedimento de captura deve ser realizado utilizando um conjunto Rotary Shaker I a 1100 ± 100 rpm. Validar a

Comentários e sugestões

- | | |
|----------------------------------|--|
| | velocidade do agitador através de calibração. |
| f) Lavagem inadequada | Lavar minuciosamente os poços da microplaca com tampão de lavagem 6 vezes, enchendo os poços até transbordar ou utilizando o Automated Plate Washer. |
| g) Tampão de lavagem contaminado | Consultar “Verificação da contaminação do aparelho de lavagem e/ou origem da água”, pág. 139. |

Séries de amostras positivas com valores URL aproximadamente iguais.

- | | |
|---|--|
| a) Contaminação dos poços da microplaca durante o teste | Cobrir a microplaca de captura durante todas as incubações. Evitar expor os tubos a contaminação por aerossóis durante o ensaio. Use luvas descartáveis isentas de pó durante manipulações. |
| b) Contaminação do DR2 | Certificar-se de que o stock não é contaminado durante a pipetagem de DR2 para os poços da microplaca de captura. Evitar a contaminação do DR2 por aerossóis de DR1 ou de poeira do laboratório, etc. |
| c) Avaria do Automated Plate Washer | Consultar “Verificação da contaminação do aparelho de lavagem e/ou origem da água”, página 139 ou consultar o manual do utilizador do Automated Plate Washer (Automated Plate Washer User Manual) para obter instruções sobre como testar quanto à presença de contaminação ou avaria. |

CVs amplos entre réplicas.

- | | |
|---|---|
| a) Pipetagem inadequada | Verificar a pipeta para garantir que estão a ser distribuídos volume reprodutíveis. Calibrar as pipetas por rotina. |
| b) Mistura insuficiente | Misturar minuciosamente em todos os passos. Agitar num vórtex antes e depois da incubação para desnaturação e após a adição de mistura para sonda. Certificar-se de que é produzido um vórtice visível. |
| c) Transferência incompleta de líquido dos microtubos de hibridização ou dos poços da microplaca de hibridização para os poços da microplaca de | Certificar-se de que são transferidos volumes reprodutíveis durante a fase de transferência da microplaca de hibridização para os poços da microplaca de captura. |

Comentários e sugestões

captura

- | | |
|---|--|
| d) Condições de lavagem inadequadas | Lavar minuciosamente os poços da microplaca com tampão de lavagem 6 vezes, enchendo os poços até transbordar ou utilizando o Automated Plate Washer. |
| e) Contaminação dos poços da microplaca com DR1 | Certificar-se de que todas as superfícies de trabalho estão limpas e secas. Ter cuidado durante a utilização de DR1. Evitar aerossóis. |

Resultados falso-positivos obtidos a partir de amostras reconhecidamente negativas.

- | | |
|--|--|
| a) Contaminação do DR2 | Certificar-se de que não ocorre contaminação cruzada de amostras à medida que divide o DR2 em alíquotas entre amostras. Se se utilizar apenas parte de um kit, dividir o volume necessário para esse teste em alíquotas para um reservatório de reagente descartável limpo antes de encher a pipeta. |
| b) Contaminação dos poços da microplaca com DR1 | Lavar minuciosamente os poços da microplaca com tampão de lavagem 6 vezes, enchendo os poços até transbordar ou utilizando o Automated Plate Washer. Não deverá ficar visível qualquer resíduo de líquido cor-de-rosa nos poços da microplaca após a lavagem. |
| c) Utilizar a mesma área dos lenços Kimtowels ou toalhetes de papel com libertação reduzida de pelo equivalentes em várias filas | Não secar numa área que já tenha sido anteriormente usada. |
| d) Preparação inadequada da amostra | Adicionar o volume correto de DNR e misturar cuidadosamente por agitação em vórtex. Para evitar resultados falso-positivos, certificar-se de que o líquido lava toda a superfície interna do tubo. |

Para a preparação manual de amostras em PreservCyt, assegurar que é concluída a mistura e ressuspensão adequadas do pellet de células antes da incubação para desnaturação. Consultar as instruções de utilização do kit *digene* HC2 Sample Conversion.

Comentários e sugestões

	Deverá ser observada uma alteração de cor distinta de púrpura claro para escuro. Incubar durante 45 ± 5 minutos a 65 ± 2 °C. Para a preparação manual de amostras em SurePath, assegurar que as amostras são incubadas durante 90 ± 5 minutos a 65 ± 2 °C.
e) Condições de lavagem inadequadas	Lavar minuciosamente os poços da microplaca com tampão de lavagem 6 vezes, enchendo os poços até transbordar ou utilizando o Automated Plate Washer.
f) Contaminação da ponta da pipeta com material não desnaturado durante a transferência de amostras desnaturadas para o microtubo de hibridização ou para o poço da microplaca de hibridização	O passo de desnaturação do procedimento de processamento de amostras deverá ser levado a cabo como indicado nestas instruções de utilização. A agitação em vórtex, inversão do tubo e agitação incorretas podem resultar na desnaturação incompleta de híbridos de ARN/ADN endógenos às amostras cervicais. Para amostras em PreservCyt ou SurePath em particular, é provável que estes híbridos estejam presentes nas paredes internas do tubo de desnaturação da amostra. Para evitar carry-over deste material celular não desnaturado, a ponta da pipeta não deve tocar nas partes laterais do tubo de desnaturação da amostra durante a transferência da amostra desnaturada para o microtubo de hibridização ou poço da microplaca.

Valores URL para o calibrador negativo elevados (>200 URL). O resto do teste apresenta o desempenho esperado.

a) O DR2 foi incubado a uma temperatura superior a 20–25 °C.	Repetir o teste e certificar-se de que os passos de captura e detecção são incubados a 20–25 °C.
b) O DR2 foi incubado durante mais de 30 minutos.	Ler a microplaca após 15 minutos de incubação (e não mais do que após 30 minutos de incubação) a 20–25 °C.
c) O DR2 ou tampão de lavagem foi contaminado com fosfatase alcalina ou DR1.	Consultar “Verificação de contaminação do DR2”, página 139, ou “Verificação da contaminação do aparelho de lavagem e/ou origem da água”, página 139.

Comentários e sugestões

O teste falha na validação. $PC\bar{X}/NC\bar{X}$ elevado.

Colocação inversa de HRC
e QC2-HR

Voltar a testar as amostras. Ler atentamente os rótulos nos frascos do calibrador e controlo de qualidade para evitar inverter a colocação destes reagentes.

Verificação de contaminação do DR2

1. Pipetar 75 µl do frasco de DR2 em alíquotas, residual ou original para um poço da microplaca de captura vazio.

Nota: Testar o DR2 em réplicas de 3 faculta uma avaliação ideal do desempenho.

2. Incubar a 20–25 °C durante 15 minutos. Evitar a luz direta do sol.
3. Medir a microplaca utilizando um instrumento DML.

O controlo DR2 deverá ser <50 URL.

Se os valores do DR2 foram <50 URL o DR2 pode ser utilizado para repetir o teste.

Verificação da contaminação do aparelho de lavagem e/ou origem da água

1. os poços 1–4. Pipetar 75 µl do DR2 em 4 poços da microplaca de captura separados.
O poço 1 serve como controlo DR2.
2. Pipetar 10 µl de tampão de lavagem do frasco de lavagem para o poço 2 da microplaca.
3. Permitir que o tampão de lavagem flua através da tubagem do dispositivo de lavagem.
Pipetar 10 µl de tampão de lavagem do tubo para o poço 3 da microplaca.
4. Obter uma alíquota da água usada para preparar o tampão de lavagem. Pipetar 10 µl da água para o poço 4 da microplaca.
5. Incubar a 20–25 °C durante 15 minutos. Evitar a luz direta do sol.
6. Medir a microplaca utilizando um instrumento DML.

O controlo DR2 (poço 1) deverá ser <50 URL.

Comparar o URL dos poços 2, 3 e 4 com o URL de controlo do DR2. O URL individual para os poços 2, 3 e 4 não deve exceder 50 URL do URL de controlo do DR2.

Os valores que excedam 50 URL do controlo do DR2 indicam contaminação. Consultar “Método de lavagem manual”, página 61, para obter instruções sobre como efetuar a limpeza e manutenção do aparelho de lavagem

Verificação da contaminação do Automated Plate Washer

1. Rotular os poços 1–5. Pipetar 75 µl do DR2 em 5 poços da microplaca de captura separados.
O poço 1 serve como controlo DR2.
2. Pipetar 10 µl de tampão de lavagem do frasco de lavagem do Plate Washer para o poço 2 da microplaca.
3. Pipetar 10 µl do líquido de enxaguamento do frasco de enxaguamento do Plate Washer para o poço 3 da microplaca.
4. Premir o botão **Prime** (preparar) no teclado do Plate Washer, permitindo que o tampão de lavagem (Wash Buffer) flua através das linhas. Pipetar 10 µl de tampão de lavagem (Wash Buffer) da cavidade para o poço 4 da microplaca.
5. Premir o botão **Rinse** (enxaguar) no teclado do Plate Washer, permitindo que o líquido de enxaguamento flua através das linhas. Pipetar 10 µl de tampão de lavagem (Wash Buffer) da cavidade para o poço 5 da microplaca.
6. Cobrir e incubar 15 minutos a 20–25 °C. Evitar a luz direta do sol.
7. Medir a microplaca utilizando um instrumento DML.

O controlo DR2 (poço 1) deverá ser <50 URL.

Comparar o URL dos poços 2, 3, 4 e 5 com o URL de controlo do DR2. O URL individual para os poços 2, 3, 4 e 5 não deve exceder 50 URL do URL de controlo do DR2.

Os valores que excedam 50 URL do controlo do DR2 indicam contaminação do Plate Washer.

Consultar o procedimento de descontaminação no manual do utilizador do Automated Plate Washer (Automated Plate Washer User Manual).

Informações de contacto

Utilizar a folha de informações de contacto da QIAGEN fornecida no kit de teste para contactar o seu representante local da QIAGEN.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

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

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:

A tecnologia Hybrid Capture está coberta pela patente europeia n.º 0 667 918 registada na Áustria, Bélgica, Suíça, Liechtenstein, Alemanha, Dinamarca, Espanha, França, Reino Unido, Grécia, Irlanda, Itália, Luxemburgo, Países Baixos e Suécia.

Patente nos E.U.A. do Hybrid Capture

6,228,578B1

Patentes nos E.U.A. de HPV

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

© 2012–2015 QIAGEN, todos os direitos reservados.

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